

I- Historique sur la Biotechnologie

I.1- Préambule

Depuis des millions d'années l'homme produisait plusieurs aliments transformés. En effet, des aliments souvent fermentés ont été utilisés, et cette fermentation reposait sur :

1- Fermentation anaérobie : comme

- Fermentation alcoolique ; souvent par la production de l'alcool éthylique ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$) et du dioxyde de carbone (CO_2) et les aliments traditionnellement produits par ce procédé sont :

- fabrication des boissons alcooliques comme la bière et le vin (vinification) ;
- fabrication du pain (panification).

- Fermentation lactique où des sucres se convertissent en acide lactique ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$), et les aliments traditionnellement produits par cette fermentation sont :

- fabrication des yaourts ;
- fabrication des fromages ;
- lait fermenté, *rayeb*.

2- Fermentation aérobie : comme

- La fermentation acétique (CH_3COOH) où l'alcool éthylique est transformé en acide acétique, ceci concerne le procédé de production des **vinaigres**.

L'homme utilisait tous ces aliments sans se rendre compte qu'il faisait de la Biotechnologie, néanmoins, la biotechnologie a fait ses avancées par la découverte de la pénicilline par Alexander FLEMING, lorsqu'il a mis en évidence l'antagonisme Mycète-Bactérie (figure 1):

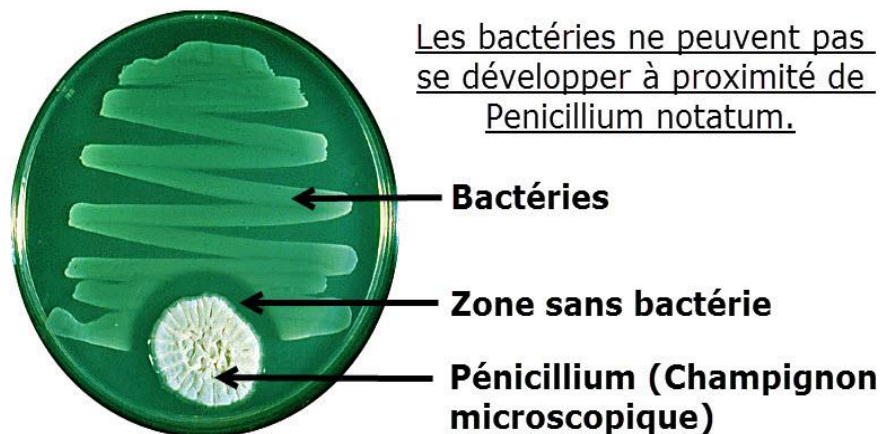


Figure 1 Antagonisme Mycète-Bactérie (Christine L. Case SkylineCollege)

Et la production de l'amylase à partir d'*Aspergillus oryzea* aux Etats Unis.

Cependant, l'avènement réel de la biotechnologie est réalisé durant la deuxième moitié du siècle précédent, en particulier, après la mise en évidence de la structure de l'acide nucléique par **Watson et Crick**, mais aussi, lorsque les chercheurs ont compris que l'ADN renferme l'information génétique qui se transfère et se transcrit. L'envol de la biotechnologie est dû, du fait, aux techniques de biologie moléculaires et de génie génétique.

En 1980, la biotechnologie est passée du stade de la curiosité scientifique à celui de l'application commerciale notamment lorsque la première entreprise de Biotechnologie moderne fut créée, en l'occurrence, **Genentech, Inc.** qui, est l'acronyme de **Genetic Engineering Technology, Incorporation.**

L'entreprise fut fondée en 1976 par **Robert A. Swanson**, un jeune investisseur, et le chercheur biochimiste **D^r Herbert W. Boyer**. L'entreprise a été pionnière de l'industrie biotechnologique.

Pour rappel, **D^r Herbert W. Boyer** est l'inventeur d'une méthode permettant à une bactérie de produire des protéines étrangères, initialisant, par ce travail, l'ingénierie du génie génétique. L'ère du génie génétique au service de la production utile est enclenchée.

Le terme « biotechnologie » a été employé pour la première fois en 1919 par Karl Ereky, un ingénieur hongrois, pour évoquer la science et les méthodes qui permettent, à partir de matières premières, de fabriquer des produits à l'aide d'organismes vivants.

En effet, sur le plan étymologique, le mot biotechnologie est composé de :

- Bio qui signifie **vivant** ;
- Et technologie = l'art d'utilisation des techniques.

Le préfixe *bio* est ancien l'ancienneté de l'homme, quant au suffixe technologie, il semble être utilisé depuis 1656 en Europe.

I.2- Définition

L'**OCDE** (Organisation de Coopération et de Développement Economique) définit la **biotechnologie** comme « l'application à des organismes vivants, des principes scientifiques, et de l'ingénierie à la transformation de matériaux vivants ou non-vivants, aux fins de la production de connaissances, de biens et de services ».

Ou, simplement est la technologie de bioconversion comme son nom l'indique, qui résulte d'un mariage entre la science des vivants – la biologie – et un ensemble de techniques nouvelles issues d'autres disciplines.

Actuellement, la biotechnologie est tellement développée qu'un seul mot ne peut les contenir ce qui a laissé immerger plusieurs branches de biotechnologie avec des appellations diverses.

En Europe ces branches sont baptisées par couleurs :

- 1- **Les biotechnologies vertes** ; concernent l'agro-alimentaire et regroupent une série de technologies utilisant l'organisme des plantes et leurs cellules pour produire et transformer des produits alimentaires, des biomatériaux et de l'énergie.
- 2- **Les biotechnologies rouges** ; incluant le domaine de la santé, en particulier l'industrie pharmaceutique dont une grande partie de la recherche actuelle repose sur les biotechnologies.
- 3- **Les biotechnologies blanches** ; regroupent les applications industrielles, par l'emploi de systèmes biologiques comme alternative aux procédés chimiques classiques.
- 4- **Les biotechnologies jaunes** ; rassemblent toutes les biotechnologies se rapportant à la protection de l'environnement et au traitement ou à l'élimination des pollutions.
- 5- **Les biotechnologies bleues** ; développent des produits en liaison avec la biodiversité marine : santé, cosmétique, aquaculture, agro-alimentaire.

Chez les américains les biotechnologies sont appelées autrement :

- *Healthcare biotech.*
- *Agrifood biotech.*
- *Industrialbiotech.*

Chaque fois qu'on évoque la biotechnologie, plusieurs concepts surgissent comme :

- **Génie génétique** : (ou ingénierie **génétique**) est un ensemble de techniques, faisant partie de la biologie moléculaire et ayant pour objet l'utilisation des connaissances acquises en **génétique** pour utiliser, reproduire, ou modifier le génome des êtres vivants.
- **Génie biomoléculaire** : La biologie moléculaire est une discipline scientifique au croisement de la génétique, de la biochimie et de la physique, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire.
- **Génie enzymatique** : Désigne l'ensemble des techniques qui mettent en œuvre, dans un but de production, les propriétés catalytiques des enzymes.
- **Organismes génétiquement modifiés (OGM)** est un organisme (animal, végétal, microorganismes) dont on a modifié le matériel génétique par le génie génétique pour lui conférer une caractéristique nouvelle souvent utile.
- **GENIE MICROBIOLOGIQUE et FERMENTATION (l'objectif de ce cours)**

Citations pour discussion

- 1- Comprendre la biotechnologie devient une sorte de nécessité socio-économique dans la société industrielle (**Jean Trémolières**), est considéré comme l'un des pères de la nutrition moderne en France.

2- Dans la vie de tous les jours même dans les pays développés, la biologie est à la croisée de tous les chemins. L'enseignement des sciences de la nature devait représenter, en moyenne, un tiers de l'ensemble des sciences si l'on veut former les jeunes des générations futures et les préparer aux graves problèmes auxquels ils seront confrontés (**Jean DAUSSET**) est un immunologue français, prix Nobel de physiologie et médecine en 1980).

1- Pour plus d'informations consulter ce lien : <http://www.genopole.fr/IMG/pdf/reperes-dev-biotechnologie.pdf>

I.3- Le contexte général de la biotechnologie microbienne

Pourquoi la biotechnologie microbienne ? Car les microorganismes sont les agents des différents processus, en particulier, dans la production de différents éléments d'utilité et de valeur économique grandissante :

Biomasse, Biogaz, Biocarburant, Acides organiques, Alcools, Acides aminés, Enzymes, Polymères, Arômes, Antibiotiques, Protéines recombinantes, Epuration des eaux.

Ce qui génère une valeur économique extrêmement importante (Tableau 1).

Tableau 1 Valeur économique de certains produits biotechnologiques

Estimation annuelle des produits biotechnologiques
<ul style="list-style-type: none">• Le marché des enzymes est d'environ 211,77 milliards de dollars ;• Le marché mondial des antibiotiques est d'environ 40 milliards de dollars ;• Le marché mondial de la levure 7 milliards de dollars ;• Le marché mondial des vaccins 35 milliards de dollars ;• Le marché mondial des probiotiques 29 milliards de dollars ;• Le marché mondial de l'alcool est 120 milliards de dollars• Le marché mondial de bioéthanol 130 milliards de dollars.

II- Microorganismes outils de la biotechnologie

A- La biotechnologie contemporaine s'articule essentiellement sur le monde des microorganismes et ce, pour 03 raisons :

- 1- Leur capacité à produire une panoplie de substances d'utilité ;
- 2- Leur reproduction rapide;
- 3- Leur aptitude à être modifiés génétiquement.

B- Les microorganismes d'intérêt sont principalement, ceux, dont le type trophique est **hétéroorganotrophe**, en particulier les saprophytes (question), ensuite, les **autotrophes**.

Application : pourquoi les microorganismes de types trophiques précédents présentent un intérêt biotechnologique grandissant ?

Réponse :

II.1- Différents groupes de microorganismes

Les micro-organismes sont présents dans toutes les structures écosystémiques. On distingue deux grands groupes :

- 1- Micro-organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau délimité comme les Bactéries ;
- 2- Micro-organismes Eucaryotes possédant un noyau comme :
 - les Mycètes (Filamenteux, levures) ;
 - les autres protistes dont les algues et protozoaires).

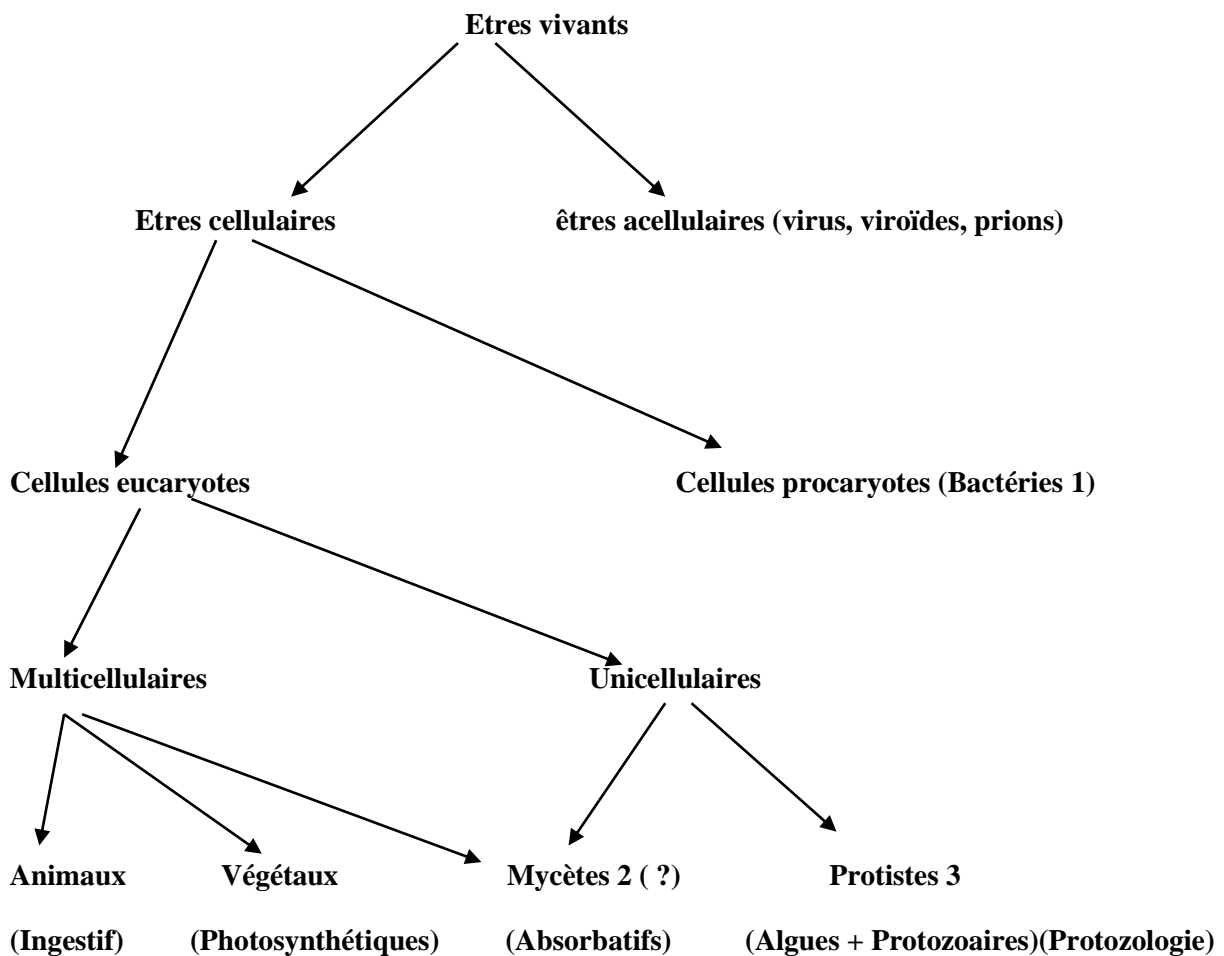


Tableau 2 : Quelques différences entre les procaryotes et les eucaryotes

CARACTÉRISTIQUE	PROCARYOTES	EUCARYOTES
ORGANISME	Bactéries	Protistes, champignons, plantes, animaux
PRÉSENCE D'UN NOYAU	Non	Oui
TAILLE DES CELLULES	Généralement plus petites que les eucaryotes (entre 1 et 10 μm)	Généralement plus grandes que les procaryotes (entre 5 et 100 μm)
ADN	Généralement un seul chromosome, de forme circulaire	Généralement plus d'un chromosome, linéaire
LOCALISATION DE L'ADN	Peu organisé (absence de noyau)	Associé aux histones (chromatine) dans le noyau
ORGANITES	Absents (ou peu)	Présents (mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, etc.)
ARN ET PROTÉINES	Transcription de l'ADN et traduction simultanées et au même endroit	Transcription de l'ADN et traduction séparées dans le temps et l'espace
INTRONS	Peu ou pas	Présents
ORGANISATION CELLULAIRE	Surtout unicellulaire Différenciation simple (spores, par exemple)	Surtout pluricellulaire Différenciation cellulaire complexe

4.1.1- Bactéries

Les bactéries seront abordées comme quatre grands groupes qui se différencient par des caractéristiques qui pourraient faire, éventuellement, d'elles dans un proche avenir des règnes distincts.

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires, procaryotes et ubiquitaires. Elles peuvent être isolées :

- principalement du sol ?
- des eaux douces,
- des eaux marines ou saumâtres,
- de l'air,
- des profondeurs océaniques,
- des déchets radioactifs,
- de la croûte terrestre,

- sur la peau,
- dans l'intestin des animaux, etc.

La structure cellulaire de la bactérie en tant que procaryote (organisme sans noyau), est relativement simple, caractérisée par la présence d'une structure particulière en l'occurrence, la paroi (figure 2,3).

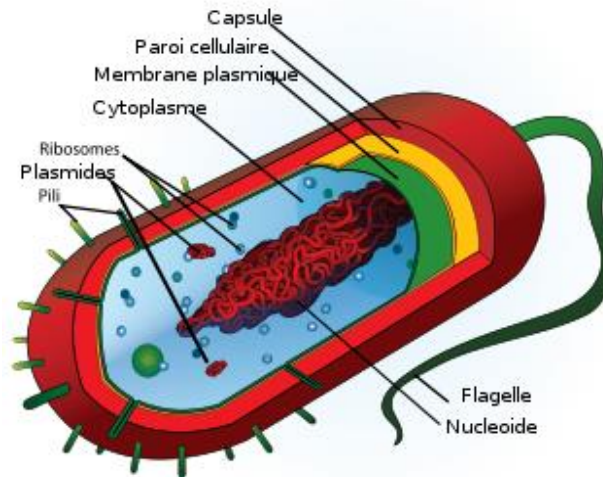


Figure 2 Structure sommaire d'une bactérie

<https://sites.google.com/site/immunomater/maladies-bacteriennes/structure-d-une-bacterie>

La paroi permet de diviser les bactéries en deux groupes: gram + et gram - et ce, suivant la sa contenance en **peptidoglycane**.

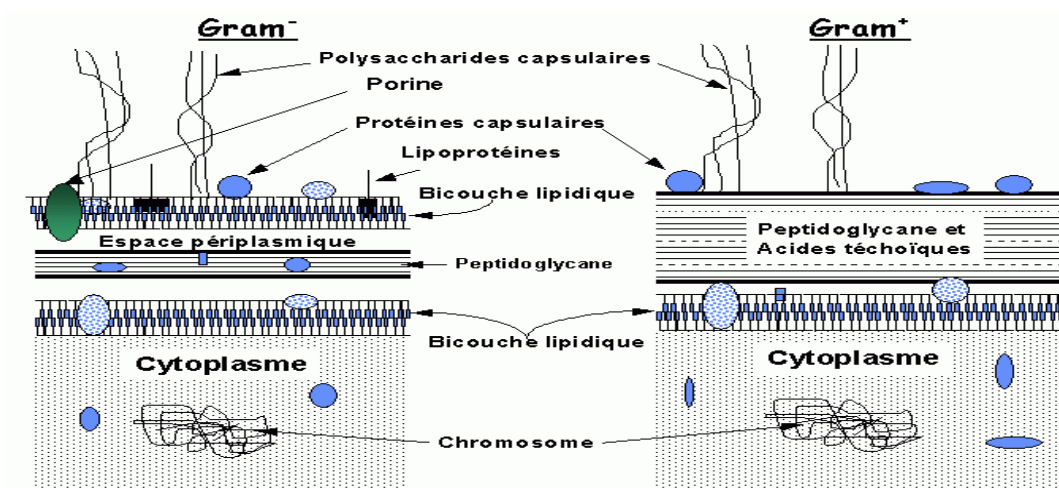


Figure 3 Parois des bactéries gram + et gram-

Mais attention, certaines bactéries ne sont pas dotées de cette paroi comme les **Mycoplasmes**, de ce fait, elles prennent toujours la forme sphérique.

Le cytoplasme est entouré par une membrane cytoplasmique très développée constituant le site de toutes les réactions d'obtention d'énergie, il renferme :

- Un chromosome : sous forme de filament d'ADN, en général circulaire ;
- Des molécules d'ADN circulaire extra-chromosomiques appelées plasmides ;
- De nombreux ribosomes ;
- Des réserves énergétiques {Granules de glycogène ; De PHB (Le poly- β -hydroxybutyrate), du soufre, de polyphosphate}.

En extracellulaire sur la paroi, les bactéries sont dotées des structures suivantes :

- Flagelles : organes de locomotion ;
- Fimbriae : pour l'attachement ;
- Pili : indispensable au phénomène de conjugaison ;
- Des sécrétions : des polysaccharides pour protection et adhésion (glycocalyx).

Nota Bene : les eubactéries (*Eubacteria*, vraies bactéries) renferment toutes les bactéries proprement dites Eubactéries ou « **bactéries vraies** », sont un groupe majeur de procaryotes. Selon la théorie des trois domaines, les eubactéries forment un des trois grands **clades** qui divisent le monde vivant (figure 4).

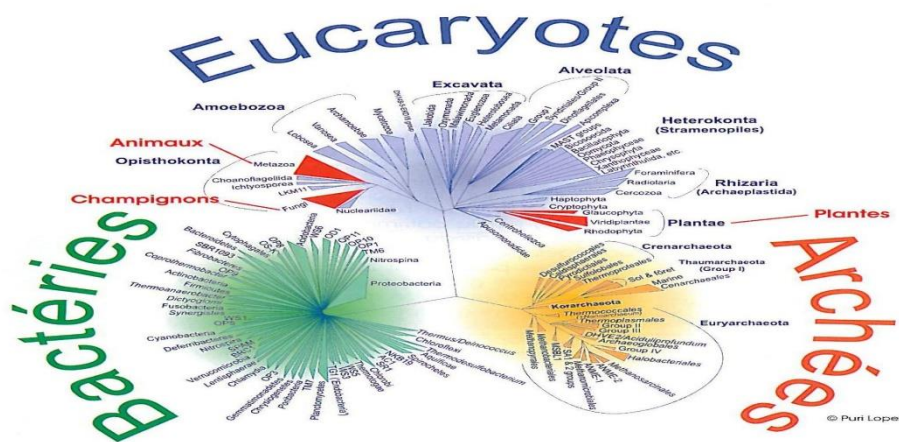


Figure4 : L'arbre universel du vivant où apparaissent les trois grands domaines (clades) : Archées, Bactéries, Eucaryotes (<http://edu.mnhn.fr/mod/page/view.php?id=337>).

Cependant, à l'intérieur des eubactéries on trouve des groupes de bactéries qui se présentent avec une morphologie et physiologie à part avec intérêt biotechnologique, parmi ces groupes on cite notamment :

- 1- **Les cyanobactéries** ; sont des bactéries aquatiques qui présentent à la fois des caractéristiques provenant des bactéries et des algues. Elles contiennent, comme les algues, de la chlorophylle, qui est le pigment responsable de la photosynthèse ; du coup, elles sont présentes de façon naturelle dans les lacs et les mers (les eaux). Donc, elles sont des autotrophes par excellence.

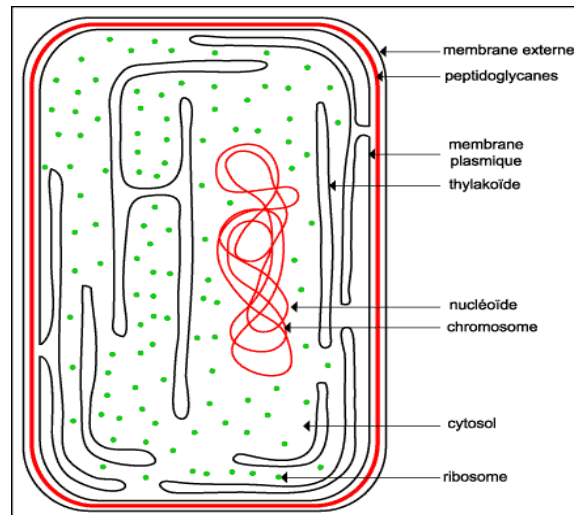


Figure 5 : Illustration d'une cellule de cyanobactéries

Importance Biotechnologique

Sur le plan biotechnologique, les cyanobactéries forment avec les micro-algues les agents utilisés dans la production de biocarburant de 3^{ème} génération et d'hydrogène.

Le biocarburant de 3^e génération est un carburant issu de microorganismes autotrophes (Microalgues, Cyanobactéries). En effet, il s'agit de biodiesel extrait à partir de cellule grâce à l'accumulation des lipides (huiles), et aujourd'hui la filière présente un intérêt grandissant.

Pour rappel

Biocarburant de 1^{ère} génération est :

- 1- Le biodiesel fabriqué à partir de plantes contenant de l'huile (colza, tournesol, soja, palme) ;
- 2- L'éthanol (alcool) produit par fermentation du sucre issu de plantes (betteraves, cannes à sucre), ou de l'amidon extrait de céréales (blé, maïs) en utilisant *Saccharomyces cerevisiae*.

Biocarburant de 2^{ème} génération

Il s'agit toujours de la production de l'éthanol par fermentation microbienne, cependant, on utilise une ressource dite « lignocellulosique », tirée de certains végétaux, du bois et de la paille, qui impose des étapes de transformation supplémentaires :

a- Des 3 constituants majeurs de la lignocellulose – cellulose, hémicelluloses et lignine – **seule la cellulose (polymère de glucose) est aujourd'hui facilement transformable en éthanol.**

Il faut donc tout d'abord extraire la cellulose de la biomasse par un traitement physico-chimique ;

b. La cellulose est ensuite **transformée en glucose** (sucre simple) par hydrolyse à l'aide d'enzymes. Les enzymes produites à partir de micro-organismes (par exemple le champignon *Trichoderma reesei* dégradent naturellement la cellulose en glucose.

c. Le glucose est ensuite **transformé en éthanol** par fermentation sous l'action de levures, selon le même processus que pour la 1^{ère} génération.

d. Enfin, **l'éthanol est purifié** par distillation et déshydratation.

2- Les actinomycètes

Le mot « Actinomycètes » signifie **Champignons à rayons (*Ray fungi*)**, ils sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradient, par croissance circulaire, tout autour du point d'ensemencement, par référence à la morphologie des jeunes colonies dont les hyphes ramifiées rayonnent à partir du centre de la croissance.

Les formes les plus évoluées des *Actinomycètes* ressemblent en complexité morphologique avec les moisissures (Champignons imparfaits), mais, en diffèrent radicalement puisque, comme toutes les autres Bactéries, **ce sont des Procaryotes** mais aussi la composition de leur paroi et leur sensibilité aux antibiotiques les rapprochent des eubactéries plus que des mycètes. Le diamètre de leurs hyphes est de l'ordre de 0,5 µm, soit, approximativement, 1/10 de celui de la plupart des hyphes fongiques. Leur longueur se situe entre 2 et 5 microns (plus petites que celle des moisissures)

Sur le plan écologique, les actinomycètes sont **telluriques par excellence**, cependant, certaines espèces sont des agents pathogènes pour l'homme dont l'immunité est affaiblie.

Dans la nature ils sont compétitifs et jouent un rôle primordial dans la dégradation de la matière organique et par conséquent, sont des agents de la dépollution.

Importance biotechnologique

Les actinomycètes sont des agents biotechnologiques par excellence : ils produisent une panoplie de métabolites tant primaires que secondaires : antibiotiques, antifongiques, enzymes, bactériocines, sidérophores, acides organiques, etc.

3- Les Bacillus

Forment un genre de bactéries à coloration gram positive ;

2- de forme bacilles ;

3- les dimensions de ces bactéries sont variables ; elles peuvent aller de (0.5 × 1.2 µm) à (2.5 × 10 µm) ;

4- sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs, et tirent leur énergie par respiration ;

5- sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires ;

6- les espèces saprophytes sont responsables de multiples dégradations de produits alimentaires ;

7- produisent des spores.

Application discuter l'importance des spores pour les applications biotechnologiques.

Importance biotechnologique

Les Bacillus sont fortement utilisés dans le domaine biotechnologique et ce pour leur résistance mais aussi pour l'importance de leur produits : ils produisent des antimicrobiens de nature lipopeptidique comme les iturines, bacillomycines, fengycine, surfactine. Ces

métabolites ont une activité antifongique très remarquable mais aussi certaines possèdent des effets stimulants chez les plantes. De ce fait, les Bacillus sont produits comme biomasse et utilisés comme des biopesticides.

4- Les bactéries lactiques

Renferment :

Les *Lactobacillus* qui sont des bactéries :

- A gram +;
- Anaérobies partiellement tolérantes à l'oxygène ;
- Ne produisant pas de spores ;
- De formes de coques ou de bâtonnets ;
- Fermentent les sucres en acide lactique.

Et les *Bifidobacteriums* qui sont des bacilles de forme irrégulière, gram +, anaérobies stricts.

Importance biotechnologique

Les deux groupes de bactéries fermentent le lait et ils sont de ce fait, utilisés dans la production des produits laitiers. En outre, ces bactéries sont aussi utilisées comme probiotiques.

II.1.2- Archées (deuxième clade du vivant)

Les archées ont une morphologie apparente de celle des autres bactéries :

- taille similaire (de 0,1 à 15 μm) ;
- développent des **flagelles pour locomotion** ;
- de différentes formes : (**coques, grappes, bâtonnets, filaments**) ;
- créent des **biofilms** (sécrétion de polysaccharides) ;
- possèdent un chromosome **circulaire** unique, et peuvent posséder un ou plusieurs éléments extra-chromosomiques, les **plasmides**.

Comparaison entre archées, bactéries et eucaryotes :

- 1- Les archées regroupent les bactéries extrêmophiles (les bactéries des milieux extrêmes);
- 2- Ces bactéries possèdent une structure cellulaire des procaryote (leur cellules ne renferment pas un vrai noyau);
- 3- Elles ont une structure particulière, qui ressemble parfois aux procaryotes, et parfois aux eucaryotes :

a- La paroi cellulaire ne renferme pas de peptidoglycane ;

b- La structure lipidique de leur membrane :

Les lipides des archéobactéries consistent en de longues chaînes d'alcool isopréniques attachées au **glycérol par des liaisons éther**, alors que, les autres organismes leur phospholipides est composés par l'attachement de chaînes d'acides gras avec une molécule de glycérol par l'intermédiaire **d'une liaison ester**;

c- La présence d'ARN polymérase beaucoup plus complexes que les **ARN-polymérase** des bactéries, et très proches de celles des eucaryotes.

d- Son chromosome circulaire est de type bactérien mais comportant des **gènes** en mosaïque similaires à ceux des **eucaryotes**.

e- Les protéines intervenant dans les processus de réplication et de réparation de l'ADN ressemblent à celles rencontrées chez les eucaryotes.

f- Les **gènes** des archées possèdent des **introns** et leur ARN messager subit des **modifications post-transcriptionnelles**, ce qui est le cas chez les eucaryotes et pas chez les bactéries.

Importance Biotechnologique

Les archées produisent plusieurs métabolites d'intérêts performants et stables comme les enzymes utilisées dans la biologie moléculaires :

- La Taq polymérase, produite par *Thermus aquaticus*
- La Pfu polymérase, produite par *Pyrococcus furiosus*,
- Production de méthane

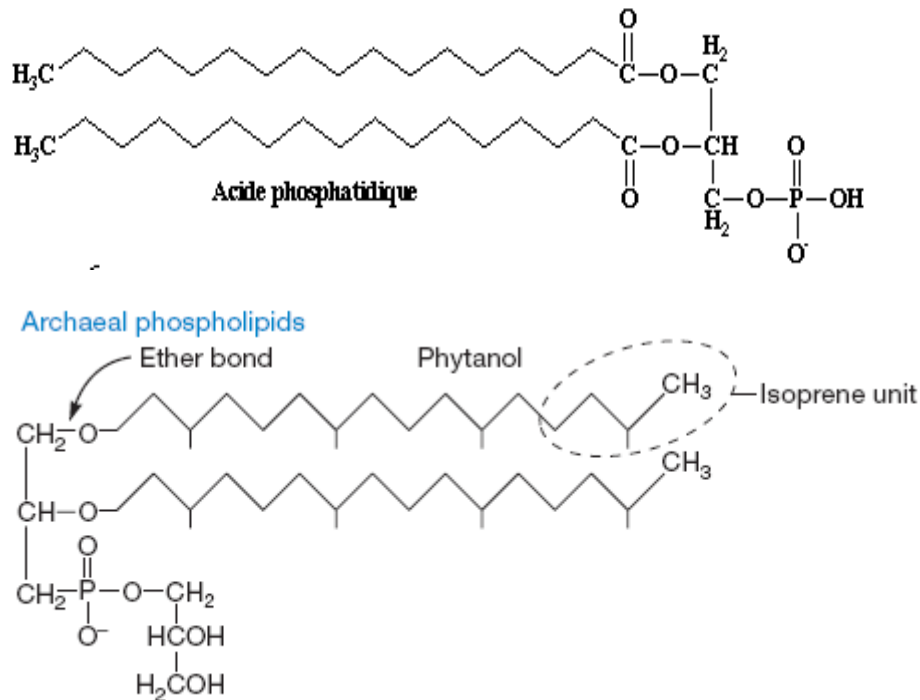


Figure 6 Structure lipidique de la membrane chez les eubactéries et les archées

II.1.3-Les mycètes (champignons) - voir cours Microbiologie des eucaryotes

Importance biotechnologique

Les mycètes forment avec les Actinomycètes le groupe de microorganismes qui produisent énormément de métabolites d'utilité. Les mycètes produisent des enzymes, des antibiotiques, des acides organiques, des arômes, ils sont utilisés dans la fabrication de fromage, dans la lutte biologique et dans la production d'éthanol (levures).

II.1.4- Algues- voir cours Microbiologie des eucaryotes

Importance biotechnologique

Voir rubrique les cyanobactéries

II.1.5- La reproduction des microorganismes

L'objectif recherché de l'étude de la reproduction des microorganismes en biotechnologie microbienne est la compréhension des mécanismes permettant d'aboutir à une biomasse conséquente, en particulier lorsque l'objectif de la fermentation est la production de la biomasse uniquement, exemple ; cas de levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*).

a- Reproduction des Bactéries

Les bactéries se reproduisent, généralement, par Scissiparité :

-L'unique molécule d'ADN circulaire se réplique (se double), de nouvelles molécules de la paroi et de la membrane plasmique sont synthétisées et les constituants cytoplasmiques voient leur stock doublé ;

-La bactérie s'allonge et se divise en deux par suite d'une invagination de la membrane plasmique et de la paroi formant un septum avec répartition des constituants dans chacune des bactéries filles ;

-Séparation des 2 bactéries filles.

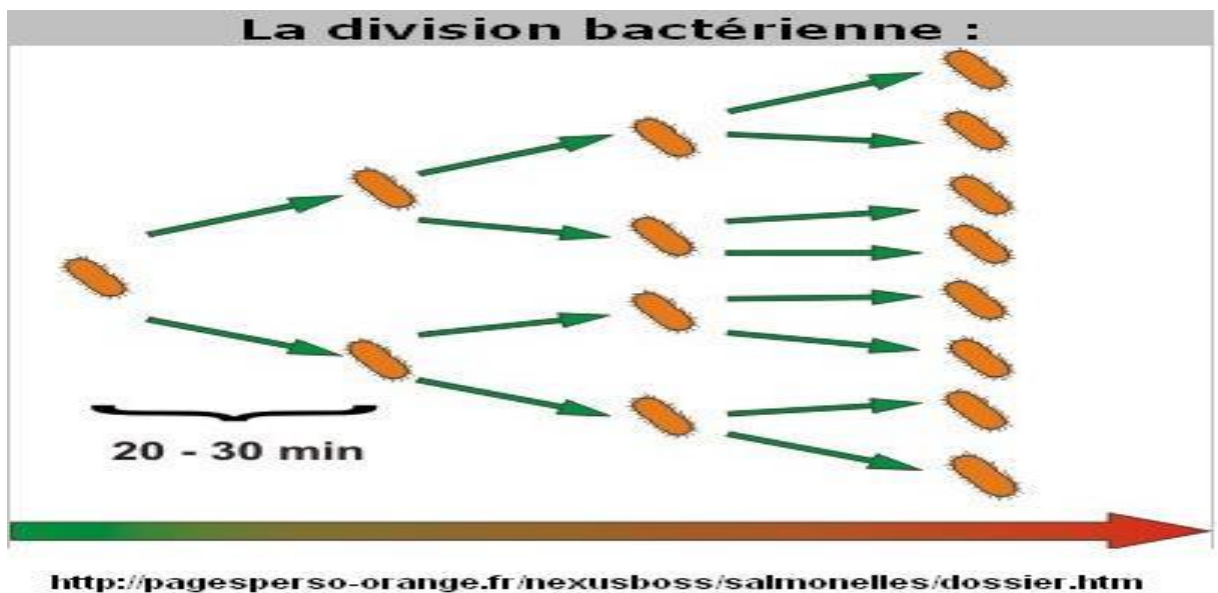


Figure 7 Reproduction des bactéries

Cependant, la reproduction des actinomycètes se fait par la formation de spores. En effet, l'élongation des filaments aériens finit par se fragmenter et chaque fragment donne une spore. La germination de la spore aboutit à la formation d'un tube germinatif et le cycle se reproduit.

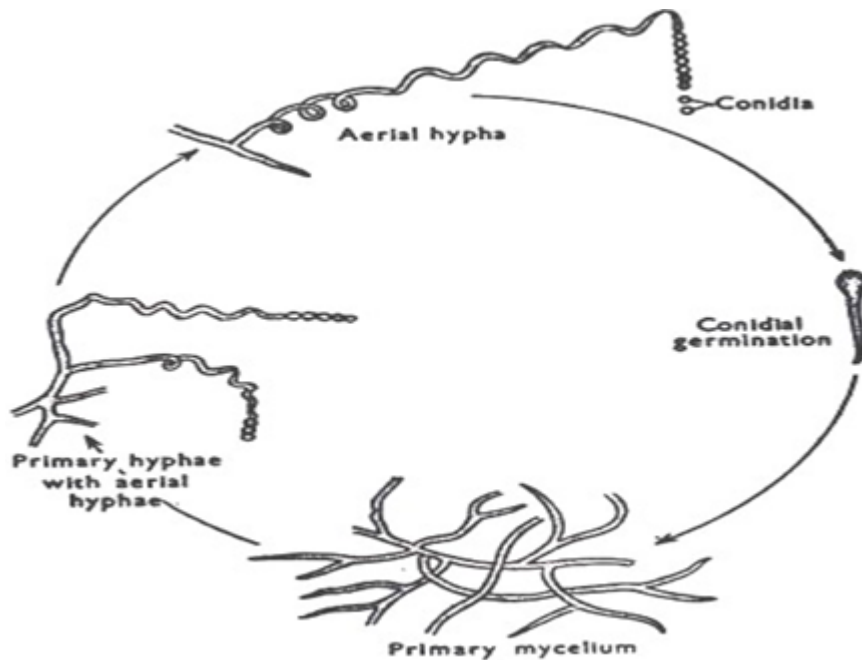


Figure 8 Cycle biologique des actinomycètes

b- Reproduction des Mycètes

La plupart des mycètes développent deux formes de reproduction :

- **Reproduction asexuée**, dite imparfaite, ou végétative, caractéristique de l'*anamorphe*.
- **Reproduction sexuée**, dite parfaite, caractéristique de *téléomorphe*.

N.B. Chez une grande partie de mycètes anciennement appelés Deutéromycètes la reproduction sexuée n'est pas mise en évidence.

La reproduction asexuée se fait par la formation de spores par les hyphes aériens, rapide et productive. Cette reproduction est développée lorsque le mycète se trouve sur un milieu solide. Dans le milieu submergé comme le milieu de fermentation le mycètes produit sa biomasse grâce à l'élongation des hyphes.

Quant à la reproduction sexuée, elle est réalisée par la formation de gamètes mâle et femelle, suivie par l'élaboration du zygote (figure 9). Cette reproduction ne s'observe pas dans les conditions de fermentation où les conditions de développement sont optimales.

Ascomycètes

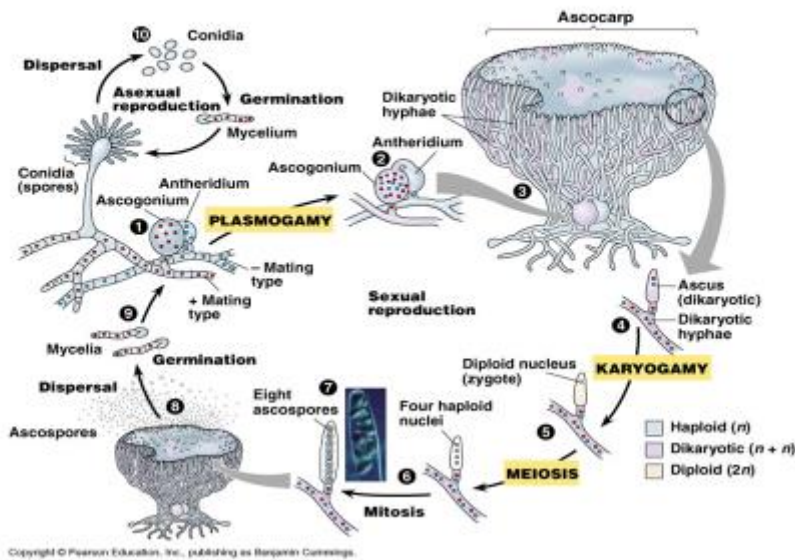


Figure 9 Reproduction des mycètes

c- Reproduction des algues

La reproduction peut être asexuée par la mitose qui produit deux cellules (bipartition) pour les algues unicellulaires, ou par bourgeonnement ou fragmentation pour les autres algues. Toutes les algues, en principe, développent ce genre de reproduction. Il existe cependant, toujours un vrai cycle de reproduction sexuée qui se compose de 2 parties distinctes (figure 10)

Le cycle commence par la germination de la spore (N) qui produit un gamétophyte (N) qui donne les cellules mâles (N) et femelles (N) ; ces dernières, après fusion, donnent un zygote (2N) qui forme un sporophyte (2N). Lorsque le sporophyte subit une méiose, il donne des spores (N). Les spores germent pour reproduire le cycle biologique.

N.B. Les algues comme les cyanobactéries sont autotrophes et par conséquent, elles ne nécessitent pas forcément un milieu de fermentation pour se reproduire.

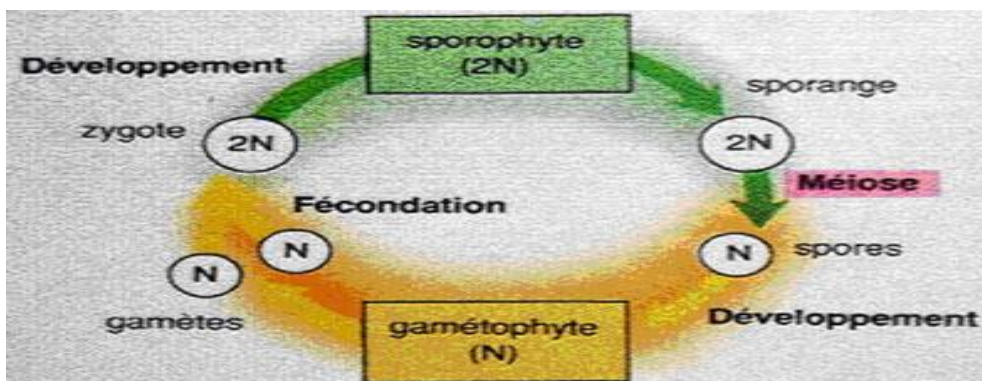


Figure 10 Cycle biologique des algues

<https://www.futura-sciences.com/planete/dossiers/botanique-algues-vegetaux-aquatiques-523/page/8>

II.2- Isolement et Sélection de microorganismes à intérêt Biotechnologique

Les microorganismes recherchés pour des applications biotechnologiques sont, généralement, ceux dont le type trophiques est hétéroorganotrophes. Ces derniers fournissent la plupart des métabolites d'intérêt par la production fermentaire.

Par conséquent il existe quatre groupes de microorganismes d'importance biotechnologique (industrielle ;

- Les levures
- Les moisissures
- Les bactéries
- Actinomycètes

Dans la production en biotechnologie microbienne on tend toujours à utiliser des microorganismes connus pour leur utilité en tant que biomasse ou/et pour leurs métabolites, cependant, la recherche de nouvelles souches forme un terrain préféré par les chercheurs et les industriels. Cette recherche repose préférentiellement sur deux étapes successives :

- 1- L'isolement des microorganismes ;
- 2- La Sélection d'un microorganisme d'intérêt.

L'isolement se fait prioritairement à partir du sol quant à la sélection, elle est réalisée par trois procédés :

- A- Sélection naturelle ;
- B- Sélection par mutation ;
- C- Sélection par génie génétique.

Avant de procéder à quelconque sélection de microorganisme, il faut impérativement définir l'objectif biotechnologique de la sélection. C'est-à-dire sélectionner quel microorganisme et pour quelle raison.

Exemple, définir le produit : enzyme, antibiotique, alcool, acide organique, autres métabolites ; puis, dans quelles conditions seraient produits (choisir les facteurs environnementaux ; température, pH, aération, etc.).

A- Sources d'isolement (échantillon, échantillonnage)

L'isolement se fait prioritairement à partir du **sol** (étant le réservoir naturel des microorganismes), cependant, d'autres sources peuvent être utilisées pour l'isolement comme : L'eau, le lait, les fruits, le tube digestif, etc.

B- Sélection, elle est réalisée par trois procédés :

- Sélection naturelle ;
- Sélection Par mutation ;
- Sélection par génie génétique.

II.2.1- Isolement des microorganismes d'intérêt

Se fait par la préparation de la solution du sol en ajoutant 10 g du sol dans 90ml d'eau physiologique stérile. La solution est laissée reposer pendant 10 minutes, ensuite ; la préparation est agitée pendant 30 minutes et la dilution 10^{-1} est obtenue à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées. L'ensemencement est réalisé sur gélose. Après incubation, la purification des isolats est réalisée pour obtenir des souches pures.

N. B. le même procédé est appliqué pour l'isolement à partir d'autres échantillons.

Lorsque les souches sont pures, des sélections à partir de celles-là sont opérées en respectant l'objectif biotechnologique.

II.2.2- Sélection naturelle de souches microbiennes

Repose sur la recherche de l'activité antagoniste : Elle consiste à détecter un effet inhibiteur d'un microorganisme sur un autre par la sécrétion d'une et/ou plusieurs substances inhibitrices, ou bien par la présence de la substance tout court. La meilleure méthode appliquée pour cet objectif est la technique de diffusion sur gélose. Cette technique est très utilisée dans la sélection de microorganismes d'intérêt biotechnologique.

a- Objectif biotechnologique 1 : Sélection souche microbienne productrices d'un antibiotique

La sélection de souches par rapport à la production d'un antibiotique repose sur la technique de diffusion sur gélose. Cette technique développée par KIRBY et BAUER et appelée par leur nom. Dans ce procédé, la souche microbienne supposée produire de l'antibiotique est ensemencée sur milieu liquide dans des conditions favorables, après la période d'incubation (suivant la nature du microorganisme) le milieu de culture est séparé de la biomasse par centrifugation ou filtration suivant les cas. Un disque de papier filtre (wattman) est imprégné d'une quantité de filtrat/surnageant (sensé contenir l'antibiotique), puis placé sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée par une bactérie sensible (bactérie test). Le disque absorbera l'humidité de la gélose réalisant la diffusion de l'antibiotique sur la gélose. La distance parcourue par l'antibiotique vers l'extérieur dépend de sa concentration (figure 11).

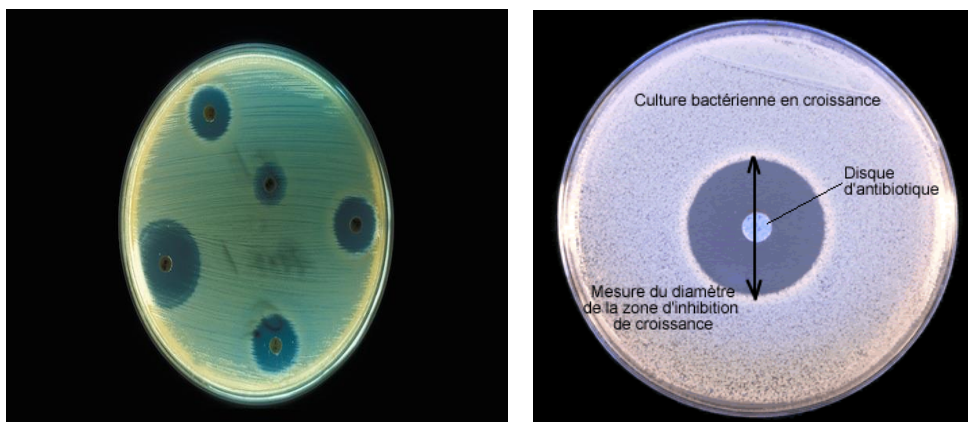


Figure 11 Méthode de diffusion sur gélose

<https://www.google.fr/search?biw=1366&bih=662&tbm=isch&sa=1&ei=c6zUWvjFB4Gb6ATzxrqQBA&q=antibiogramm>

b-Objectif biotechnologique 2 : Sélection de souches par antagonisme

Cette méthode consiste en la confrontation des deux souches sur gélose.

La capacité des bactéries isolées à inhiber le développement de l'isolat fongique est souvent testé sur milieu PDA. Dans ce test l'effet de plusieurs bactéries peuvent être examinés sur la même boîte.

Pour ce faire, un disque de gélose de chaque isolat bactérien (préalablement développé et coupé par un tube de Durham) est déposé sur la gélose et un autre disque de PDA contenant la moisissure préalablement développée (7 jours), coupé par un perforateur stérile est déposé au centre de la boîte (à 3.5 cm de distance par rapport aux isolats bactériens). Ensuite, la boîte est incubée à 28°C pendant 3 à 7 jours.

L'antagonisme développé est estimé par le calcul du Pourcentage d'Inhibition (PI) de la croissance de l'isolat fongique selon la formule :

$$PI=100*(R_1-R_2)/R_1,$$

Où,

R_1 représente le diamètre de la colonie de l'isolat fongique dans la direction en l'absence de bactéries, et R_2 représente le diamètre de la colonie fongique dans la direction en présence de la colonie bactérienne.

Les isolats bactériens qui révèlent un effet antagoniste sont sélectionnés.

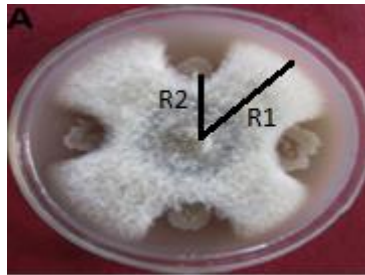


Figure 10 Sélection de souche par antagonisme
Ze-Yan Fan et al. (2016) *Journal of Ginseng Research*, 40 (2), 97-104.

C- Objectif biotechnologique 3 ; Recherche de l'activité bactériocinogénèse chez un lactobacille

En application de la Méthode de **Fleming et al., (1975)** : qui se réalise comme suit :

- Ensemencer par touche les souches de *Lactococcus* sp. sur la surface du milieu MRS solide (milieu gélosé) et laisser sécher pendant 7 minutes à une température ambiante puis, incubé les boîtes à 30°C pendant 24h;

- Couler à la surface de la boîte 7ml de gélose nutritive molle contenant une concentration de la souche bactérienne test et laisser solidifier puis incubé à 37°C pendant 24h;

- **Résultat** : L'inhibition se traduit par l'apparition d'une zone transparente autour des souches lactiques ensemencées par touche lorsque cette dernière secrète une bactériocine qui a un effet, bactéricide ou bactériostatique (figure 7).

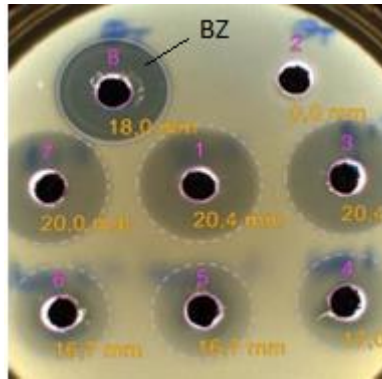


Figure 12 Activité antibactérienne des bactéries lactiques (Bactériocinogènes)
<http://docplayer.fr/72411184-Le-projet-lnc-levains-naturels-complexes.html>

d-Objectif biotechnologique 4 : Sélection des microorganismes producteurs d'enzyme, exemple la lipase

Pour sélectionner des microorganismes producteur d'enzyme, exemple la lipase les microorganismes sont ensemencés sur milieu gélosé (solide en boîte de Pétri) contenant de **l'huile d'olive(?)** comme source de carbone.

Après une incubation permettant de donner un développement de colonies, les boîtes sont observées sous lumière ultraviolette à 350 nm. Les colonies de bactéries productrices de lipase extracellulaire s'accompagnent de la formation d'halos fluorescents visibles (figure 13).

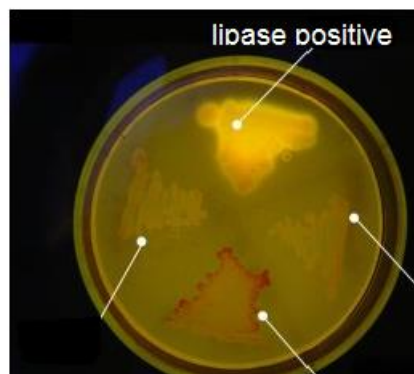


Figure 13 Détection de l'activité lipasique sur gélose
de Guzmán et al., 2008. Rev. Bol. Quim v.25

d- Application : Technique combinée (Méthode **de Barefoot et Klaenhammer**, 1983)

Elle repose sur la diffusion d'agents inhibiteurs à partir de puits creusés dans une gélose qui contient la souche bactérienne test :

- Des boîtes de Petri contenant 10 ml de gélose sont recouvertes de 15 ml de gélose molle ensemencée par la souche test ;
- Après solidification, des puits de 4 mm de diamètre, sont creusés dans la gélose à l'aide d'un tube de Durham stérile ou perforateur métallique ;
- Les boîtes sont ensuite séchées et les puits sont remplis de 50 µl d'extrait de culture de bactérie supposée active ;
- Les boîtes sont incubées pendant 24heures à 28°C,

Résultat

- La présence de zones d'inhibitions (zones claires dans une nappe trouble formée par la croissance de la bactérie test) autour des puits.

Réflexion : Comment prépare-t-on l'extrait de culture ?

II.2.3- Sélection par mutation

Cette technique s'oriente en réalité vers l'amélioration de rendement lorsqu'une souche produit peu, en particulier, dans des applications industrielles.

Exemple *Penicillium chrysogenum* souche productrice de la Pénicilline a été amélioré par mutation pour produire 55fois sa production initiale et ce, par mutation (voir planche).

A- L'objectif de l'amélioration : Est d'obtenir une souche qui répond aux critères suivants :

1-Facilité de l'emploi :

- Absence de pathogénicité ;
- Stabilité génétique ;
- Résistance à des inhibiteurs ;
 - Robustesse ;
 - Bonne résistance aux contaminations ;
 - Stabilité de systèmes enzymatiques.

2- Performance de la souche

- Production rapide ;
- Rendement élevé ;
- Productivité.

3- Coût d'utilisation :

- Exigences nutritive limitées ;
- Utilisation de substrat bon marché ;
- Absence d'auxotrophie* ;
- Se développant dans de conditions variables

*N. B. Souche Auxotrophe qui a, par mutation, perdu la capacité de synthétiser un nutriment nécessaire à sa croissance (donc, il doit se trouver dans le milieu).

4- Qualité du produit :

- Absence de sous-produits toxiques ;
- Facilité de récupération et de purification.

B- Les mutations induites

Rappel

La reproduction végétative des cellules est une reproduction conforme. Toutes les cellules conservent le génotype sauvage. Néanmoins, malgré la présence du système de protection et de réparation de l'ADN, il peut se produire des modifications génétiques, ces modifications sont les mutations.

C- Définition

Les mutations sont des modifications du bagage génétique d'une cellule, ces modifications peuvent s'opérer sur un seul ou plusieurs gènes. Une fois est là, la mutation peut se traduire

ou non au niveau phénotypique. C'est-à-dire la modification peut être apparente (visible) ou sous forme d'une fonction.

La mutation peut se produire naturellement comme les erreurs de réplication et de réparation de l'ADN, elle est appelée dans ce cas, mutation spontanée, ou bien, elle est provoquée volontairement en utilisant un agent mutagène et elle s'appelle une **mutation induite**.

N. B. Dans le domaine de l'amélioration de souches par mutation on emprunte le chemin de la mutation induite.

Les mutations induites

Tout agent altérant directement l'ADN, modifie sa chimie ou interfère avec ses mécanismes de réparation peut induire des mutations. Ces agents sont des **agents mutagènes**.

Application : définir ce qui suit :

Mutation? Mutagène? Mutagénèse ? Mutant.

Les agents mutagènes peuvent être classés suivant leurs natures et leurs mécanismes d'action. Principalement ils se trouvent sous:

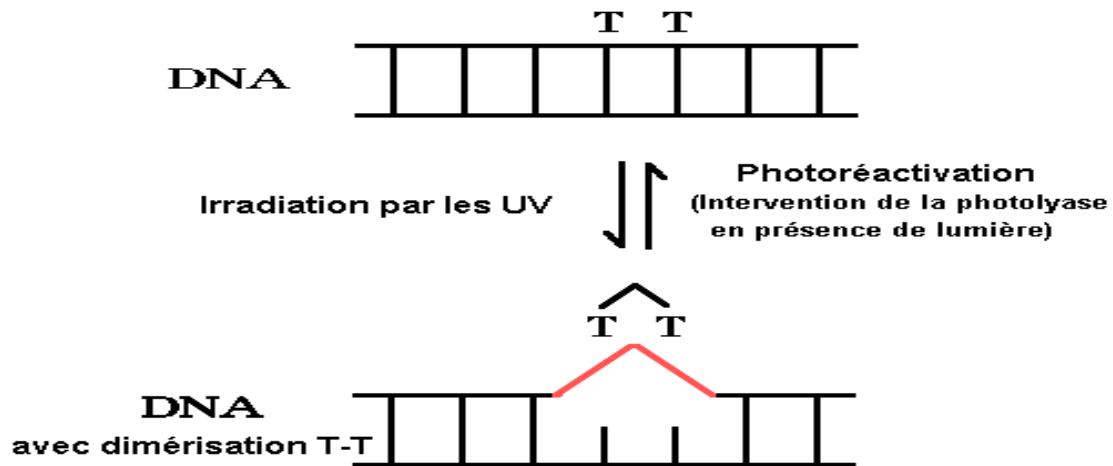
- Les **Agents physiques**
- Les **Agents chimiques**

Ces agents physiques ou chimiques altèrent la structure de l'ADN

a- Agents physiques : Parmi les agents physiques les plus utilisés on trouve :

Rayons ultra-violet (UV) :

Les plus efficaces sont ceux de longueurs d'onde comprises entre 200 et 300 nm. Ces longueurs d'ondes correspondent à l'absorption des **acides nucléiques**. Il est utilisé pour cet objectif une lampe de mercure qui émet des rayons à 245nm. L'action de ces rayons sur l'ADN, s'effectue principalement sur les bases pyrimidiniques donnant une **dimérisation** de thymine (T-T) sur le même brin.



La réparation de l'ADN par photoréactivation

Source : Beth A. Montelone, Division of Biology, Kansas State University

Figure 14 L'effet de l'UV sur l'ADN

L'erreur de **réparation** entraîne une mutation, cette mutation se classe parmi:

- Mutation de transition, où une purine est remplacée par une purine (A \leftrightarrow G) ou, pyrimidine est remplacée par une pyrimidine (T \leftrightarrow C)

- Décalage de cadre de lecture

5' AUG CCA UCA GUU UGA CGC UUC CCA UAU AUU AG- 3'

Met- Pro-Ser- Val Stop

5' AUG CCA UCA*AGU UUG ACG CUU CCC AUA UAU UAG 3'

Met-Pro-Ser- Ser- Leu- Thr- Leu- Pro- Ile- Tyr S top

- Délétion est une mutation caractérisée par la perte du matériel génétique sur un chromosome. La taille des délétions varie d'une paire de base à toute une région chromosomique.

(a) Deletion of D

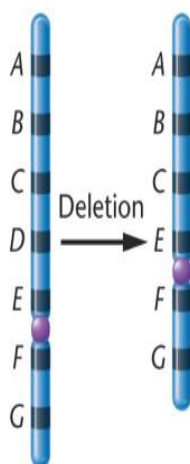


Figure 15 Mutation par délétion

Protocole expérimental

Les UV sont excessivement utilisés pour l'amélioration de souches fongiques, ces souches produisent des spores asexuées **haploïdes**. Pour ce faire, il faut passer par les étapes suivantes :

1- Préparation du matériel biologique

Les cellules à traiter (cible de la mutation) doivent être en bon état physiologique (cellules jeunes), Il est préférable qu'elles soient haploïdes (car les allèles mutés sont souvent récessifs et les mutations récessives ne s'expriment pas chez les souches diploïdes en présence d'allèle sauvages).

2- Obtention du clone haploïde

Pour les mycètes filamenteux, il suffit de les ensemercer sur le milieu de sporulation, après développement, les spores asexuées produites sont haploïdes et mononuclées.

3-Induction de mutation par UV

Préparation de spores : Une culture jeune est préparée sur milieu gélosé dans un erlenmayer ; Après développement des spores, la suspension sporale est obtenue par l'ajout de l'eau physiologique stérile dans l'erien suivi d'agitation par l'utilisation d'un barreau magnétique stérile ;

La suspension est ensuite agitée vigoureusement (pour séparer les spores) puis filtrée sur entonnoir contenant du coton cardé (pour éliminer le mycélium).

Induction de mutants : voir (figure 16)

-Un volume de 10 ml de la suspension précédente contenant une concentration de 10^7 spores/ml est mis dans une boîte de Pétri en verre, ce volume forme une couche mince inférieure à 1cm ;

- La préparation est, ensuite, exposée (boîte sans couvercle) aux rayons UV de 200 à 300erg/min-15W.

- La dose mutagène est déterminée par le temps d'exposition de la suspension, dans ce cas il peut aller de 30secondes à 20 min ;

- L'expérience doit se faire dans l'obscurité pour éviter la réaction de photo-réactivation ;

-La boîte est placée à 50 cm de la source lumineuse ;

- Dans ces conditions le taux de viabilité est de 1%.

Application : comment compter les cellules vivantes ?

L'induction et la sélection de mutants sont réalisées selon le protocole suivant :

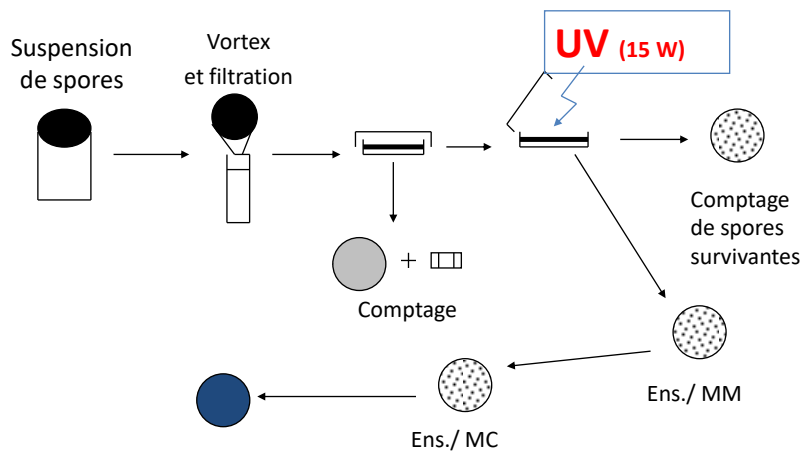


Figure 16 Induction de mutants par UV

b- Agents chimiques

Parmi les agents chimiques les plus utilisés on trouve les agents de transformation de bases, ces agents donnent des mutations ponctuelles.

Une **mutation ponctuelle** est un changement de la structure du gène, affectant un à plusieurs nucléotides (entre un et dix). Il existe quatre types de mutations ponctuelles (figure 17) :

- mutation par substitution : remplacement d'un (ou plusieurs) nucléotides par un autre (ou plusieurs autres) ;
- mutation par insertion : ajout d'un ou plusieurs nucléotides ;
- mutation par délétion : perte d'un ou plusieurs nucléotides ;
- mutation par inversion : permutation de 2 désoxyribonucléotides voisins.

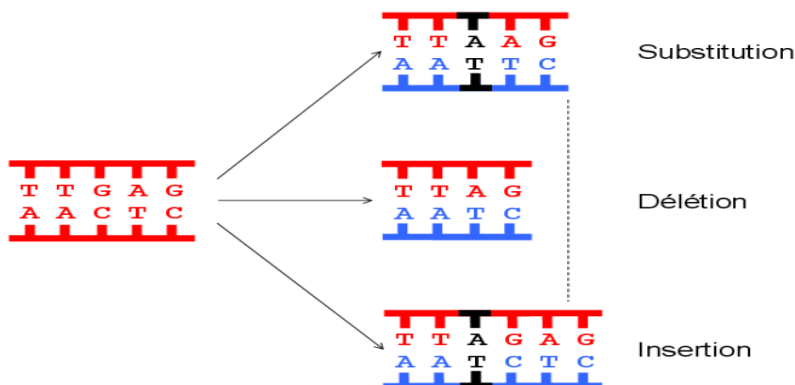
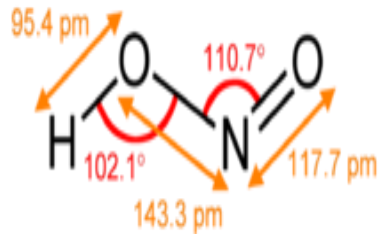


Figure 17 Types de mutations ponctuelles

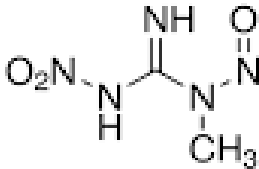
<http://raymond.rodriquez1.free.fr/Documents/Cellule-genome/mutation0.png>.

Parmi les agents chimiques les plus utilisés on cite :

- Acide nitreux (HNO_2)



- Nitrosoguanidine $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$



Protocole expérimental

- Des cellules en développement végétatif (???) sont utilisées ;
- Dans un tube à essai on met une suspension de cellules (à une concentration précise ?) à laquelle on ajoute le tampon phosphate pour ramener le pH à 4 ;
- La préparation est mise dans un bain marie à une température ambiante constante ;
- On ajoute ensuite du nitrate de sodium NaNO_3 0.2 M au temps zéro (0.15 ml de solution de NaNO_3 pour 10 ml de suspension cellulaire) ;
- La réaction est arrêtée en diluant 20 à 50 fois dans du tampon phosphate à pH 7 placé dans de la glace ;

Criblage de mutants

Cette partie consiste en repérage de cellules mutantes et de les isoler, autrement dit c'est l'étape de sélection. En effet, la recherche de mutants se fait :

- En considérant le changement phénotypique ;
- ou en cherchant une modification de fonction.

Le changement phénotypique est apparent et, par conséquent, il est repérable visuellement sur culture sur gélose (changement d'aspect, changement de couleur en comparaison avec la souche initiale).

La modification de la fonction : Cet aspect est souvent lié au développement de l'**auxotrophie**, dans ce cas, c'est une chaîne biosynthétique qui est modifiée. Si un gène codant pour une enzyme de cette chaîne est inactivé par mutation la cellule qui était **prototrophe** va devenir **auxotrophe**. Cette différence est repérable par comparaison de la croissance des mêmes cellules sur deux milieux l'un qui n'apporte que le sucre et les éléments

minéraux nommé **milieu minimum (MM)**, et l'autre qui en plus apporte un ou plusieurs acides aminés ou sur carrément sur **milieu complet (MC)**.

Autrement dit, l'auxotrophe se développe sur uniquement le milieu complet (**MC**) et le prototrophe peut se développer sur les deux milieux.

Milieu complet (CM) suivant (Pontecorvo *et al.*, Composé en g/L

Extrait de levure 1, Peptone 2, Casamino acides 1, Hydrolysate d'acides ribonucléiques 0.3 Solution de vitamine 2ml, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, $MnCl_2$, $CuSO_4$ 1mg, Source de Carbone 0.05M glucose.

Milieu Minimum (MM) Composé en g/L : Glucose 30, KH_2PO_4 0.5, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, $MgCl_2$ 0.5, $CaCl_2$ 0.5, Citrate de fer traces, Source de sels de Cu, Zn, Co, Ni, B, Ti traces.

En effet, pour repérer les mutants auxotrophes on applique la technique de **réplique sur velours (*replicaplatin*)** :

- une boîte contient des colonies issues de cellules traitées par le mutagène est appliquée sur un cylindre recouvert d'un velours,
- puis sur le même velours qui a retenu dans ses poils des cellules de chaque colonie, on ensemence plusieurs boîtes (**certaines contiennent le milieu complet ou milieu minimum additionné d'acides aminés, et les autres contiennent uniquement le milieu minimum**), en mémorisant la position des colonies sur la boîte initiale.

Dans le cas de la déficience des mutants à l'arginine, la matrice donne deux boîtes où les colonies sont disposées de la même façon, on peut repérer facilement celles qui sont auxotrophes pour cet acide aminé (figure 18).

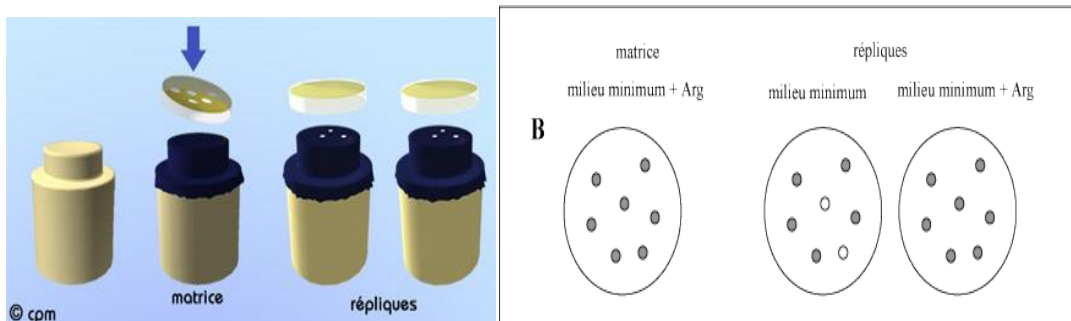


Figure 18 Répliques sur boîte et la déficience pour l'arginine sur les boîtes répliquées
http://www.edu.upmc.fr/sdv/masslot_05001/mutagenese/selection.html

Application : Proposer la méthode de criblage de mutants dans les cas suivant :

- 1- mutation souche en vue de production de Pénicilline
- 2- mutation de souche en vue de production de lipase

III-Fermentation et technologie de fermentation

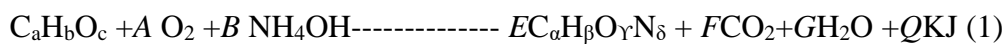
III.1- Etude de la Physiologie Microbienne

Les microorganismes sont en mesure de développer une grande diversité de réactions biochimiques. Celles-ci se traduisent soit, par la production de biomasse, soit par la production ou la transformation de substances organique, soit enfin, par le développement des deux phénomènes conjointement. Pour ce faire, les microorganismes ont besoin d'énergie et de substances de structure de squelette cellulaire. La plupart des microorganismes utilisés en biotechnologie obtiennent leur énergie et construisent leur squelette en dégradant des substances organiques qui se trouvent dans leur environnement. Ces réactions de catabolismes sont catalysées par des enzymes synthétisées par le microorganisme lui-même pour ce besoin.

Toutes ces opérations sont développées par le microorganisme lorsqu'il se trouve dans le milieu de culture (conditions environnementales optimisées).

Le milieu de culture procure aux microorganismes les éléments nécessaires pour leur croissance et cette dernière englobe, en outre, la synthèse de constituants cellulaires.

En considérant la réaction suivante :



- *A, B, E, F* et *G* sont les coefficients stœchiométriques de l'équation. $C_aH_bO_c$ représente la formule chimique de la source de carbone. Dans le cas de chimio-organotrophe, cette équation constitue aussi la source énergétique pour la cellule.

- Cette réaction exprime la croissance microbienne ;

- Obéit au type hétéroorganotrophe aérobie où $A O_2$ est la demande en oxygène des cellules ;

- $EC_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$ représente la formule brute de la biomasse microbienne, qui correspond à la formule brute de la matière sèche où 90% de la biomasse effectivement produite de la réaction et 10% sont des cendres.

La composition élémentaire des microorganismes est donnée donc par $EC_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$. Chaque microorganisme est représenté par cette structure à des compositions centésimales spécifiques : exemple un microorganisme dont la composition est $C_{4.41} H_{7.3} O_{1.19} N_{0.86}$ sa composition centésimale est : 57.96% Carbone ; 7.9% Hydrogène ; 20.95% Oxygène ; 13.18% Azote.

$(C_aH_bO_c + B NH_4OH)$ représente dans cette équation chimique la quantité du substrat dans le milieu de culture à partir duquel s'effectue la synthèse de la biomasse ($EC_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$).

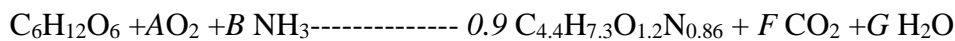
Donc, l'équation 1 permet d'aborder la formulation du milieu de culture et le substrat joue deux rôles dans le processus global ;

- Le premier rôle est de fournir de l'énergie à la cellule sous forme d'ATP, cette opération est appelée **maintenance de la cellule ou respiration endogène** ;
- Le deuxième rôle ; certains éléments du substrat, après transformation, vont servir à l'édification des constituants cellulaires (bioconversion) et assurer sa reproduction.

$EC_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$ diffèrent d'un microorganisme à l'autre.

Application

Déterminer les coefficients stœchiométriques de l'équation suivante



III.2- Composition de milieu de fermentation (voir explication)

III.3- La croissance microbienne

Lorsque le microorganisme est ensemencé dans un milieu de culture il développe une activité physiologique fonction de la nature et la composition du milieu et les conditions physico-chimiques environnantes (pH, température, aération, etc.). Cette activité se manifeste sous deux aspects étroitement liés l'un de l'autre :

- 1- Le premier aspect : les cellules microbiennes se reproduisent donnant une concentration élevée de la biomasse cellulaire, dans ce cas l'activité métabolique conduit à la biosynthèse des constituants cellulaires à partir des éléments nutritifs du milieu (cet aspect est appelé **bioconversion**) ;
- 2- Le deuxième aspect qui est conjointement lié ou pas au premier, les cellules excrètent dans le milieu des métabolites primaires ou/et secondaires qui s'accumulent dans le milieu courant la culture.

La courbe de la croissance microbienne est obtenue grâce à l'utilisation des techniques d'évaluation quantitative et qualitative d'une population microbienne. L'étude consiste à suivre, en fonction du temps (**t**), l'évolution de **X** concentration cellulaire (nombre de cellules par unité de volume) ou concentration en biomasse microbienne (g de matière sèche cellulaire microbienne par unité de volume).

Pour ce faire, il est considéré que la culture de microorganismes est réalisée dans des conditions idéales :

- La culture est de type discontinu (*culture batch*), c'est-à-dire que tous les éléments sont présents dans le milieu de culture avant l'inoculation ;
- Le réacteur est de type infiniment mélangé ce qui permet d'obtenir un système homogène (dispersion idéale de cellules) ;
- Les conditions de culture (température, pH, aération, etc.) sont maintenues constantes et égales à des valeurs favorables au développement du microorganisme étudié.

Courbe de croissance microbienne

C'est la mesure de la population cellulaire au cours de la culture (au cours du temps) (figure 1). Cette courbe permet aussi de caractériser l'activité microbienne :

- la vitesse de la division cellulaire
- le changement d'état physiologique

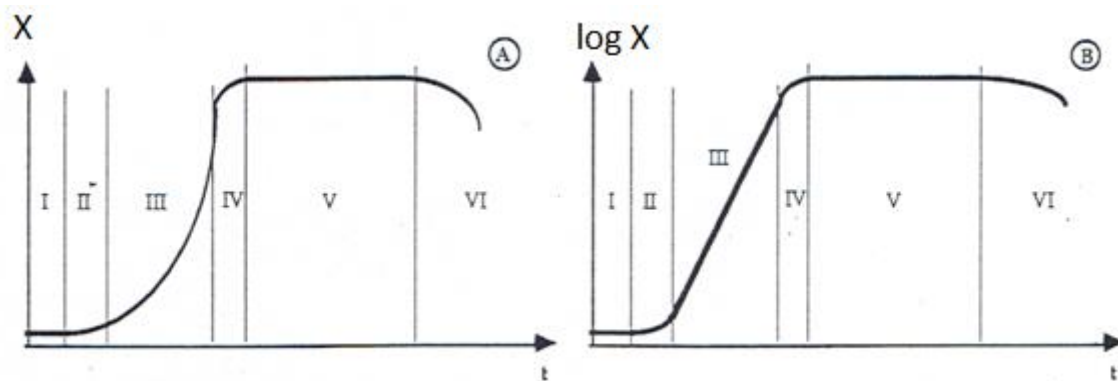


Figure 1 : Schéma d'une courbe de croissance d'un micro-organisme cultivé en fermenteur batch

Cette courbe est de type : X (biomasse par unité de volume) = f (temps) (figure 1, A). Elle est représentée en axe semi-logarithmique (figure 1, B) qui permet de distinguer six (6) périodes (ou phases) distinctes :

- Quatre (4) périodes (I, III, V, VI) : phases caractéristiques pendant lesquelles la population des cellules se trouve dans un état physiologique particulier.
- Deux (2) périodes (II, IV) : elles constituent des phases de transition entre deux phases différentes.

Il est donné

$$dX/dt = r_X = \mu \cdot X$$

Cette équation exprime la vitesse de croissance, avec :

X = masse de biomasse par unité de volume (g de matière sèche/L)

t = temps (heure)

L'unité globale de la vitesse de croissance est $\mathbf{g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}}$

μ = vitesses spécifiques de croissance (ou taux de croissance) ($\mathbf{h^{-1}}$)

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \left(\frac{dX}{dt} \right)$$

1- Phase de Latence

Cette période suit immédiatement l'inoculation de la culture et constitue une période d'adaptation des cellules au substrat présent dans le milieu. On n'observe aucune division

cellulaire. La durée de cette phase dépend **de l'âge de l'inoculum**, de la **nature du milieu de culture** et de la **taille de l'inoculum**.

$$X = \text{cte} = X_0$$

X_0 étant la concentration cellulaire au temps $t=0$

N. B. Au cours de la phase de latence, les modifications physiologiques de la culture sont négligeables.

2- Phase de départ

Lorsque la phase d'adaptation est terminée, on assiste au démarrage de la croissance proprement dite (reproduction cellulaire commence). X augmente lentement d'abord, puis plus vite. Durant cette période :

- La vitesse de croissance augmente ;
- La vitesse spécifique de croissance augmente également.

3- Phase de croissance exponentielle

Lorsque la vitesse de reproduction cellulaire atteint son maximum, ce ci signifie que la phase exponentielle ou la phase logarithmique, commence et qui dure, tant que, la vitesse de reproduction est constante. Cette reproduction peut être évaluée par le temps de doublement cellulaire (temps de génération) chez les bactéries et les levures. Le temps de doublement prend, tout au long de cette phase, sa valeur minimale. Cette valeur varie d'un microorganisme à un autre et pour le même microorganisme, cette valeur varie en fonction des conditions de fermentation (Milieu de culture, température, aération et la vitesse d'agitation {lorsque c'est aérobie}, le pH, etc.)

Exemple le temps de génération pour *E. coli* est de 15 minutes et pour *Saccharomyces cerevisiae* allant de 1h30 à 2h00.

Durant cette période :

- La vitesse de croissance dX/dt augmente
- Le taux de croissance (vitesse spécifique) de croissance atteint son maximum et demeure constant (μ_m).

Dans ces conditions, la concentration cellulaire augmente exponentiellement (figure 1, A) et sa représentation en axe semi-logarithmique demeure linéaire (figure 1, B).

Cette phase est caractérisée par :

- Une production de biomasse (cas de levure de boulanger) ;
- Un potentiel de division et de synthèse très élevé ;
- Une importance industrielle, puisqu'elle est liée à la production des protéines cellulaires, d'enzymes impliquées dans l'hydrolyse des molécules du milieu et autres métabolites primaires.

Ce qui justifie leur emploi en **biotechnologie**.

Expression cinétique

$$\mu_m = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

$$\frac{dX}{X} = \mu_m \cdot dt$$

$$\int_{X_1}^{X_2} \frac{dX}{X} = \mu \int_{t_1}^{t_2} dt \rightarrow \text{Ln}X_2 - \text{Ln}X_1 = \mu_m (t_2 - t_1) \quad \text{étant donné que } \int \frac{dX}{X} = \ln X$$

$$\text{Soit : } \mu_m = \frac{\text{Ln } X_2 - \text{Ln } X_1}{t_2 - t_1}$$

$$\text{Ou : } \text{Log } X_2 - \text{Log } X_1 = \frac{\mu_m}{2.303} (t_2 - t_1) \quad \text{soit : } \mu_m = 2.303 \cdot \frac{\text{Log } X_2 - \text{Log } X_1}{t_2 - t_1}$$

Où : X_1 = masse des cellules à t_1 min

X_2 = masse des cellules à t_2

$$\text{Ln } (X_2/X_1) = \mu(t_2 - t_1) \rightarrow e^{(\text{Ln } X_2/X_1)} = e^{\mu(t_2 - t_1)} \quad \text{d'où : } \frac{X_2}{X_1} = e^{\mu(t_2 - t_1)}$$

$$\rightarrow X_2 = X_1 \cdot e^{\mu(t_2 - t_1)}$$

$X = f(t)$ est une parabole;

$\text{Ln } X = f(t)$ est une **droite** de pente μ_m

Le taux de croissance μ est une caractéristique de la cellule microbienne étudiée, il dépend de la nature du microorganisme et des conditions de mise en culture, telles que :

- La nature et la concentration des substrats (source carbonée, azotée, etc.) ;
- Le choix des conditions d'aération (pour les microorganismes aérobies) ;
- Les conditions de T et de pH de la culture ;
- La présence d'inhibiteurs.

4- Phase de ralentissement

Il y a un ralentissement de la division cellulaire causé par :

- Epuisement du milieu de culture (disparition d'un ou de plusieurs composants nécessaires à la croissance microbienne) ;
 - Accumulation de produits inhibiteurs (métabolites), résultants du métabolisme microbien (alcool, antibiotique, etc.).
- X continue d'augmenter après l'inflexion ;

- dx/dt diminue ;
- μ diminue.

5- Phase stationnaire

La concentration des cellules atteint son niveau maximal. La croissance cellulaire s'arrête mais celle-ci conserve une bonne activité métabolique.

Le passage vers cette phase est accompagné par un changement physiologique important et des modifications de la structure biochimique de la cellule. Cette phase est caractérisée par :

- Accumulation des produits intermédiaires du métabolisme (métabolites primaires) dû au déséquilibre dans la composition du milieu de culture ;
- Production de métabolites secondaires (acides organiques, antibiotiques, Mycotoxines, etc.) ;
- Différenciation cellulaire avec formation de cellules à structures particulières (spores, etc.) (intérêt bio industriel).

6- Période de déclin (phase de mortalité)

Le nombre de cellules vivantes diminue (autolyse {autodestruction} des cellules) par l'action des enzymes.

N.B. Il y a toujours une division chez certaines cellules par consommation de la matière organique libérée par les cellules mortes, mais la vitesse de croissance est bien inférieure à celle de la mortalité cellulaire.

Les deux dernières phases sont extrêmement importantes dans le cas des microorganismes producteurs de métabolites secondaires.

Des résultats fournis par l'étude de la croissance microbienne on peut déduire la valeur du coefficient de conversion du substrat

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S}$$

S_0 est la concentration initiale du substrat, S étant la concentration résiduelle du substrat.

Etude cinétique de la production de métabolites

Dans beaucoup de cas, la division cellulaire est accompagnée par la synthèse d'un ou de plusieurs métabolites excrétés dans le milieu de culture.

Exemples :

1) Production dans laquelle la biomasse cellulaire est le seul produit intéressant :

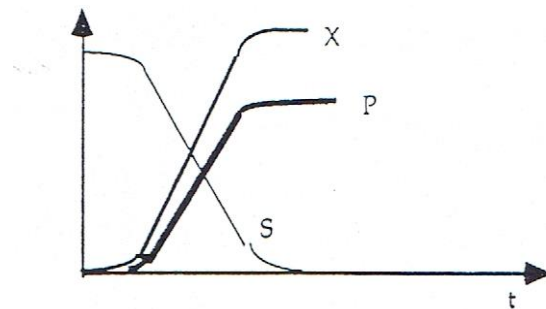
- levure boulangère (*Cassacharomyces cerevisiae*)
- biopesticides (insecticides (par *Bacillus thuringiensis*), **fongicides** (par *Bacillus subtilis*))

2) Dans beaucoup d'autres procédés de fermentation, on s'intéresse à la production d'un métabolite déterminé :

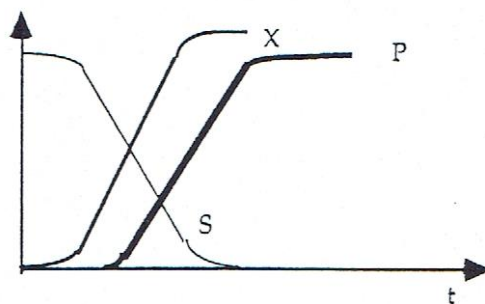
- Acides aminés (acide glutamique par *brevibacterium sp.*)
- Antibiotique (Pénicilline par *penicillium chrysogenum*)

On distingue trois situations de production d'un métabolite (classification de Gaden, 1955) :

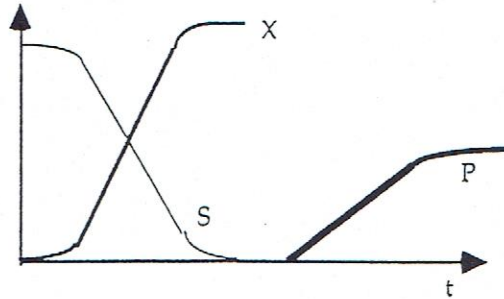
1^{er} type : la synthèse du métabolite est liée directement à la croissance des cellules et au métabolisme du substrat principal. Le métabolite formé correspond au métabolite primaire.



2^{ème} type : la synthèse du métabolite (produit) est liée à la croissance microbienne mais différée par rapport à la dégradation du substrat. Le métabolite formé est primaire.



3^{ème} type : la formation du produit n'est pas liée à la croissance et à la dégradation du substrat. Ce type est caractérisé par la production des métabolites secondaires.



Vitesse de production du métabolite

La vitesse de production d'un composé P (métabolite) est donnée par l'expression :

$$r_P = \frac{dP}{dt} \text{ (g/L de milieu.h)}$$

La vitesse spécifique de production du métabolite (produit) est :

$$r_{sp} = \frac{r_P}{X} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \text{ (g de produit / g de cellules.h)}$$

Productivité (ou rendement horaire)

C'est le critère retenu pour l'évaluation d'un procédé de fermentation, il permet l'étude de la rentabilité et le dimensionnement d'une installation de fermentation.

La productivité est exprimée par le rapport de la concentration obtenue lors de l'arrêt de la culture à la durée totale d'un cycle de production.

$$\text{Productivité} = \frac{P_f}{t_{Total}}$$

Avec : P_f = concentration finale du produit (g/L)

t_{Total} = durée totale du procédé (h)

$$t_{Total} = t_V + t_N + t_R + t_S + t_C$$

Où : t_V = temps nécessaire à la vidange du fermenteur précédent

t_N = temps nécessaire au nettoyage du fermenteur

t_R = temps nécessaire au remplissage

t_S = temps nécessaire à la stérilisation

t_C = temps nécessaire à la culture.

La technologie des fermentations

1- Introduction

Toute fermentation industrielle a pour but la production d'une substance d'intérêt, en quantité la plus grande, dans le temps le plus court et au moindre coût possible.

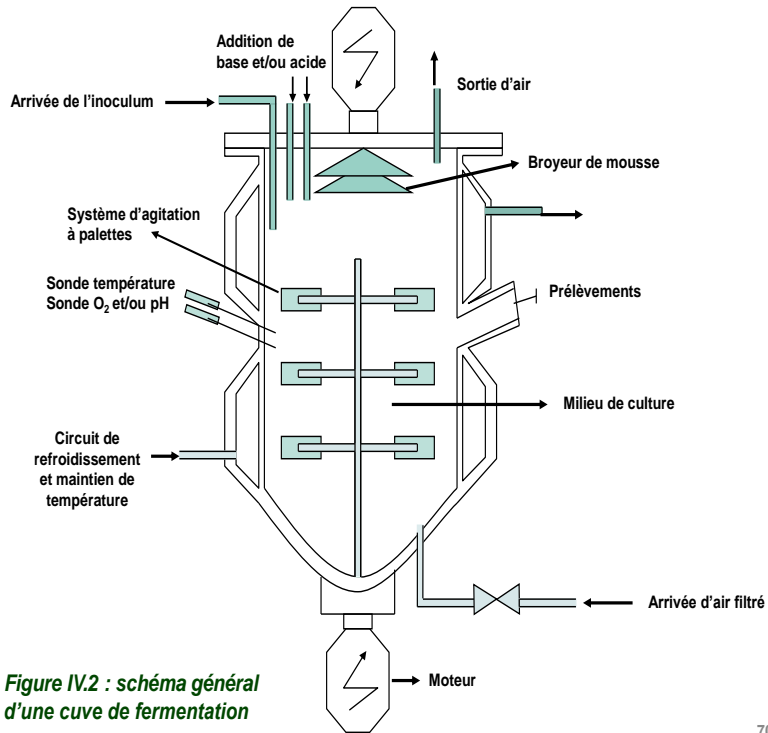
Pour ce faire, on doit cultiver un microorganisme dans des conditions physicochimiques contrôlées au sein d'une enceinte de grande volume spécialement conçue à cet effet : le bioréacteur ou fermenteur.

2- Les bioréacteurs

Un bioréacteur ou un fermenteur est essentiellement une cuve **stérilisable**, et qui peut loger un volume important de culture où on peut mesurer la température, la teneur en oxygène, le pH, la biomasse. De plus, divers contrôles et alimentations peuvent y être ajoutés. Cet ensemble peut être contrôlé par un système **contrôle-commande** assuré par ordinateur.

Plusieurs systèmes périphériques sont couplés à la cuve et permettent de contrôler de façon automatisée les paramètres susceptibles d'affecter le métabolisme microbien comme :

- la température,
- le pH,
- le débit d'air (pour les germes aérobies),
- le système d'agitation,
- la formation de la mousse,
- la pression



70

Figure 1 : schéma d'un fermenteur

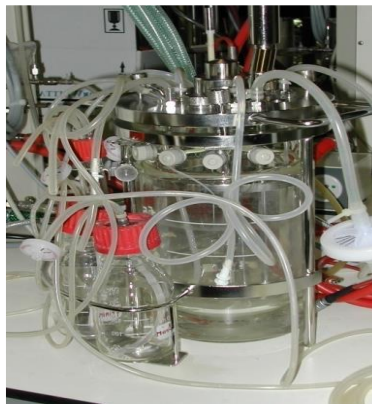


Figure2 : fermenteur 2 L



Figure 3: Fermenteur 500 L



Figure 4 : Fermenteur 2 m³

Il existe de nombreux types de bioréacteurs. Le volume de la culture logée dans le bioréacteur est le paramètre qui détermine l'échelle de fermentation appelée à s'y dérouler. Sur ce plan, on regroupe les fermenteurs en trois types :

- Bioréacteur à l'échelle laboratoire (0,5, 5,10 et 20 litres) (figure 2)
- Bioréacteur à l'échelle pilote (50, 100,150 et 500 litres) (figure 3)
- Bioréacteur à l'échelle industrielle (1000 litres et plus) (figure 4)

Les fermenteurs à l'échelle du laboratoire sont utilisés pour déterminer les facteurs qui influencent une production donnée : (T, pH, O₂ dissous, agitation, ajout de nutriments, etc.) et établir les conditions optimales de fermentation.

Les fermenteurs à l'échelle pilote servent à extrapoler les conditions optimales de fermentation.

Les fermenteurs à l'échelle industrielle permettent de produire quotidiennement des quantités massives de produits fermentés, dans une optique de rentabilisation du procédé en industrie (pharmaceutique, agroalimentaire, environnementale, etc.).

Quel que soit leur taille, la plupart des bioréacteurs sont de forme cylindrique pour permettre une bonne homogénéisation de la culture pendant la fermentation. (Quelques exceptions existantes : exemple, en brasserie, la forme du fermenteur est préférablement cylindro-

conique pour la séparation de la bière et des levures qui sédimentent dans la partie inférieure conique en fin du procédé.

3- Contrôle des paramètres

3.1- Le contrôle de la température

Dans un bioréacteur, le maintien du milieu à une température optimale pour la croissance et la production microbiennes est assuré par un échangeur de chaleur.

Au cours de la fermentation en grand volume, il y a dégagement d'une quantité de chaleur suite au catabolisme microbien et l'agitation mécanique.

Pour éviter que l'on ne dépasse la plage de température optimale de fermentation, le bioréacteur doit être doté d'un système de refroidissement, qui fait circuler de l'eau froide :

- Soit dans la double paroi du fermenteur,
- soit dans un serpentin disposé à l'intérieur de la cuve en contact direct avec la culture

Le système de refroidissement peut servir aussi à faire circuler l'eau chaude pour élever la température du bioréacteur.

Le contrôle de la température nécessite l'usage d'une sonde en contact indirect avec la culture, afin de permettre l'activation automatisée du système dès que la température de la culture le requiert.

3.2- Le contrôle du pH

Un processus de fermentation engendre dans certains cas la formation d'acides organiques. Dans d'autres cas, ce sont des substances alcalines qui sont produites. Parfois, des résidus acides et alcalins sont sécrétés en même temps. Pour compenser les variations de pH causées par la croissance microbienne, il faut corriger cette dernière de façon continue durant toute la fermentation. Pour ce faire, un agent neutralisant est injecté directement et de façon automatisée, dans le bioréacteur. Une électrode à pH, introduite par un port de la cuve et en contact permanent avec la culture, mesure le pH au cours de la fermentation.

Les sondes à pH utilisées en fermentation sont habituellement en verre, elles doivent pouvoir être pressurisées et résister à la température de stérilisation, puis qu'elles sont en contact direct avec le milieu de culture.



3.3- Le contrôle de l'oxygénation

Au cours d'une fermentation aérobie, le transfert d'oxygène dans le bioréacteur doit, en tout temps être suffisant pour que la concentration en oxygène dissous dans milieu reste supérieur à la valeur critique.

Pour satisfaire cette exigence, fondamentale pour le succès de toute fermentation aérobie, on doit contrôler :

- l'aération
- et l'agitation dans le réacteur.

3.3. 1- L'aération

L'air ambiant, comprimé sous une pression (compresseur centrifuge), est le plus utilisé pour oxygéner un bioréacteur, selon le type et la taille du fermenteur. L'air est injecté à la base du bioréacteur, à travers un diffuseur qui le disperse en bulles le plus petites possible, afin de favoriser un meilleur transfert d'oxygène.

Tout bioréacteur doit comporter une sortie de gaz, installée au sommet de la cuve et munie d'un condenseur ; étant donné que l'air injecté peut s'accumuler et causer ainsi la surpression à l'intérieur du bioréacteur. De même, le métabolisme microbien génère habituellement des gaz au cours d'une fermentation, ceux-ci peuvent contribuer à augmenter la pression interne de la cuve s'ils ne sont pas évacués, même dans le cas d'une fermentation anaérobie.

3.3.2- La stérilisation de l'air et des gaz d'échappement

Pour éviter la contamination du bioréacteur par les particules ramenées par l'air, ce dernier doit être stérilisé avant d'entrer dans le bioréacteur. Cette opération est réalisée grâce à un filtre bactériologique placé sur le trajet de la conduite d'aération.

3.3.3- La mesure de la concentration en oxygène dissous

Cette mesure se fait par l'intermédiaire d'une sonde insérée à l'intérieur du bioréacteur, de façon qu'elle soit en contact permanent avec le milieu de culture.

Lorsque la sonde détecte une concentration inférieure à une valeur programmée, un régulateur augmente automatiquement la puissance de l'agitation ou le débit d'aération, ou les deux ; tout en évitant les effets de cisaillements trop importants et la formation de mousses en trop grandes quantités.

N. B. Les sondes à oxygènes doivent pouvoir être stérilisées à la vapeur sous pression.



3.4- L'agitation

L'agitation permet d'assurer l'homogénéisation et les échanges entre les phases solide, liquide et gazeuse dans le fermenteur. Elle favorise également l'échange thermique entre le milieu et le système d'échange de chaleur.

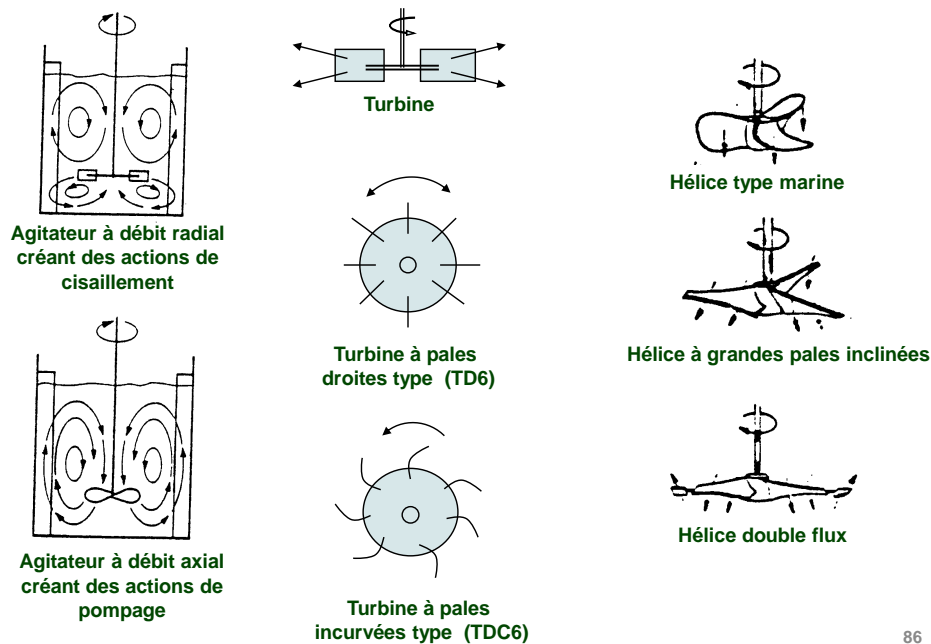
Plusieurs types d'agitateurs sont utilisés dans la pratique, le plus connu c'est le système d'agitation mécanique (rotatif).

Deux types d'agitation sont provoqués dans le fermenteur, selon la forme des pales utilisées (figure suivante) :

- **Agitation à débit radial** : turbine à pales droites et étroites (turbines Rushton), pour liquides peu visqueux. Cette turbine est peu recommandée pour certaines souches microbiennes fragiles et son usage est à proscrire pour les cultures de cellules supérieures en bioréacteurs.
- **Agitation à débit axial** : turbine en forme d'hélice (une hélice marine) disposée au fond du bioréacteur. Elle permet une bonne homogénéisation de l'air et du milieu à une vitesse de rotation réduite mais le transfert d'oxygène est nettement moindre.

Plusieurs autres types de turbines sont connus (figure..).

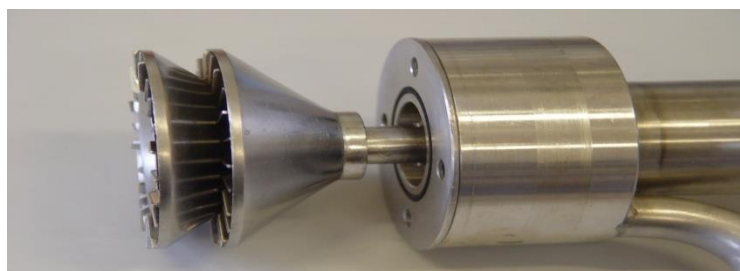
N. B. Il existe un mode d'agitation non mécanique appelé **AIR-LIFT** qui consiste à insuffler de l'air sous pression par le bas d'une cuve haute et étroite de façon à créer une turbulence, qui génère l'agitation dans la colonne de bulles.



86

35- Le contrôle antimousse

La formation de mousse dans les bioréacteurs est souvent un phénomène inévitable, en particulier dans les fermentations aérobies. Pour remédier à ce problème, de nombreux fermenteurs sont munis d'un brise-mousse mécanique qui est attaché à l'arbre d'agitation rotatif au-dessus de la surface du milieu de culture. Or ce système est rarement suffisant et l'on utilise couramment un système de contrôle basé sur l'addition automatisé d'antimousse chimique.



Brise mousse mécanique

3.6- Les systèmes de régulation

Un système de régulation établit une relation entre une valeur à maintenir et une commande dont l'action permet de modifier cette valeur dans le sens souhaité. Il fonctionne de façon

automatique grâce à une boucle de régulation formée par un capteur, un amplificateur, un comparateur et un actionneur.

3.7- La stérilisation du milieu et des équipements

Dans un procédé de fermentation, il est obligatoire de travailler dans des conditions d'asepsie (stérilisation) exemplaires afin d'éviter toute contamination microbienne de la culture et ses conséquences néfastes sur la performance du procédé.

La stérilisation parfaite doit s'effectuer sur :

- 1- **Le milieu de culture et tous les additifs liquides** : dans ce cas, deux techniques de stérilisation sont utilisées:
 - **La stérilisation à la chaleur humide** qui s'effectue pour les faibles volumes dans des autoclaves, ou pour des volumes plus importants, dans des cuves conçues pour supporter une forte pression avec de la vapeur. La plus simple est de stériliser le milieu *in situ*, directement à l'intérieur du bioréacteur en injectant de la vapeur dans l'échangeur de chaleur du fermenteur.
 - **La microfiltration** sous pression à travers un filtre membranaire absolu. Cette méthode permet de stériliser des composants du milieu sensibles à la chaleur, tels que les antibiotiques ou les protéines.

- 2- **Le bioréacteur et ses périphériques** : le fermenteur doit être stérilisé à part, avant d'y introduire le milieu stérile. Cette opération est habituellement réalisée en injectant de la vapeur dans l'échangeur de chaleur ainsi que dans la cuve vide. Les différents périphériques sont stérilisés à part. Un système de vannes permet d'isoler complètement le bioréacteur de chacun des différents périphériques et sont tous reliés indépendamment au circuit de vapeur.

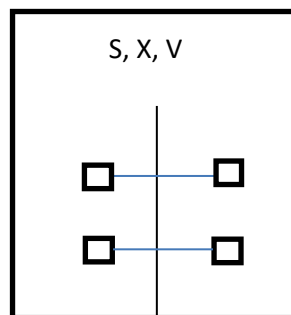
Différents modes de fermentation

Les différents modes de culture en fermenteur sont :

- Batch (fermé)
- Fed batch (fermé alimenté)
- Culture continue

1- Mode batch

Le mode batch est le mode le plus classique, il consiste à inoculer un bioréacteur rempli d'un milieu de culture stérile contenant tous les nutriments nécessaires, et on laisse se dérouler la fermentation en contrôlant les divers paramètres nécessaires à la croissance microbienne et à la production de métabolites.



Fonctionnement d'un bioréacteur en mode batch

Au cours de la culture, les concentrations en biomasse et produit augmentent jusqu'à l'atteinte d'un plateau, alors que les concentrations en substrats diminuent jusqu'à l'épuisement. Rien n'est ajouté à la cuve d'un bioréacteur en mode batch sauf de petits volumes d'acide ou de base (pour régler le pH) et au besoin, de petites quantités d'antimousse. De la même façon, on ne soutire rien de la cuve sauf des échantillons de petits volumes, pour des fins analytiques.

Considérons la culture « batch » d'une bactérie dans le but de produire de la biomasse. Afin de faciliter l'étude, nous ferons les hypothèses suivantes

2-Mode fed-batch

Une culture menée en " fed batch" consiste en une culture discontinue " batch " qui est alimentée en éléments nutritifs au cours du processus de fermentation (système semi-ouvert) (figure 4.2). L'intérêt de cette culture est remarquable dans le cas de substrat inhibiteur et elle permet d'augmenter la productivité de l'installation de fermentation par rapport au système batch.

Cette technique de culture a été utilisée, pour la première fois, par les levuriers pour remédier à l'effet glucose, comme dans le cas de la fermentation de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cuve d'alimentation

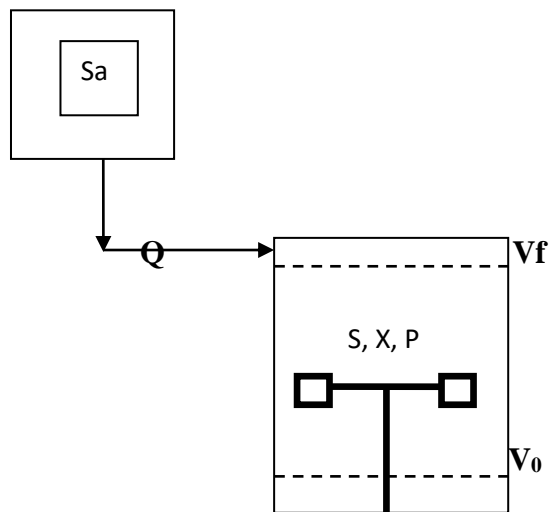


Figure 4.2 : Fonctionnement d'un bioréacteur en mode fed-batch

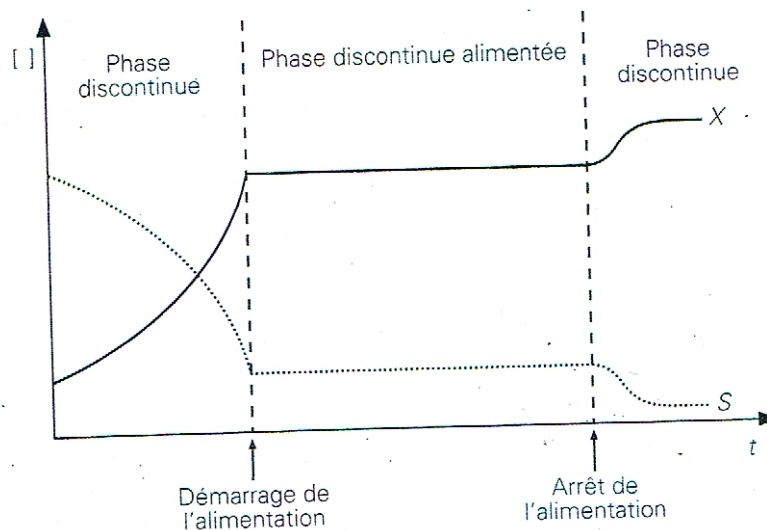


Figure 4.3 : Evolution des variables X et S au cours des deux périodes d'une fermentation en « fed-batch »

3- Mode de culture continu

La fermentation en mode continu consiste à établir un équilibre des concentrations dans la culture en alimentant constamment le bioréacteur en milieu frais tout en soutirant un volume équivalent de milieu usé. Ainsi, le milieu ne se détériore pas, comme dans une culture en mode continu, et on arrive à maintenir le microorganisme dans un état physiologique constant où il produit de façon maximale.

Une fermentation en mode continu débute en système fermé (fermentation en batch) dans laquelle la biomasse croît jusqu'au point où elle produit de façon maximale soit à la fin de la phase de croissance

exponentielle (μ_m). Une fois ce point est atteint, on démarre l'alimentation en milieu frais et l'on procède au soutirage du milieu usé à un débit permettant de maintenir les concentrations constantes dans le fermenteur. La biomasse et le produit qui se forme dans la culture à volume constant, ne s'accumulent pas car ils sont évacués vers la cuve de soutirage d'où ils pourront être récupérés (figure 4.4).

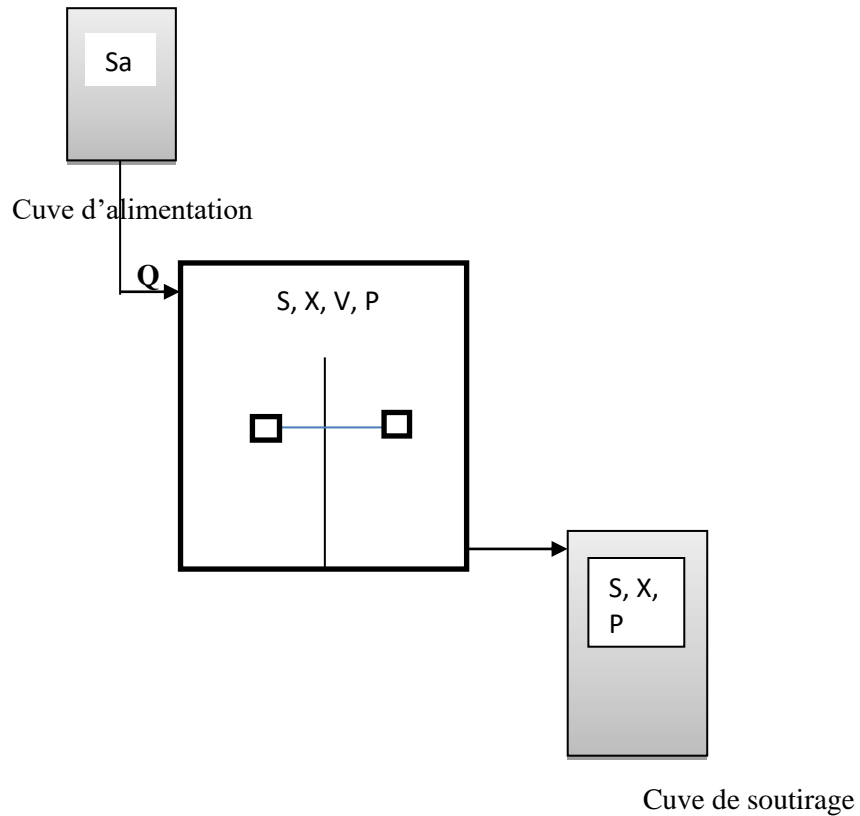


Figure 4.4 : Fonctionnement d'un bioréacteur en mode continu

Pour établir le débit d'écoulement exact permettant de maintenir la culture en croissance exponentielle dans des conditions constantes où la productivité est maximale, il faut d'abord comprendre qu'une culture en continu constitue un système en équilibre, à volume constant perpétuellement dilué à taux fixe. Ce taux de dilution (D) est fonction du débit et du volume de culture, soit :

$$D = \frac{Q}{V} = \frac{\text{Débit d'alimentation}}{\text{Volume de la culture}} \quad (\text{h}^{-1})$$

Par conséquent, lors de l'instauration de la culture continue, l'évolution de la concentration en biomasse, en substrat et en produit est déterminé par le choix du taux de dilution " D ". Ce paramètre devra être bien choisi selon les objectifs de la culture continue.

Trois cas peuvent se présenter : 1) $D > \mu_m \rightarrow$ lessivage

2) $D = \mu_m \rightarrow$ turbidostat

3) $D < \mu_m \rightarrow$ chemostat

a) 1^{er} cas : lessivage

La concentration cellulaire chute dans le fermenteur jusqu'à atteindre la disparition complète des cellules et le remplacement par du milieu frais : c'est le **lessivage** complet de la culture (figure 4.5).

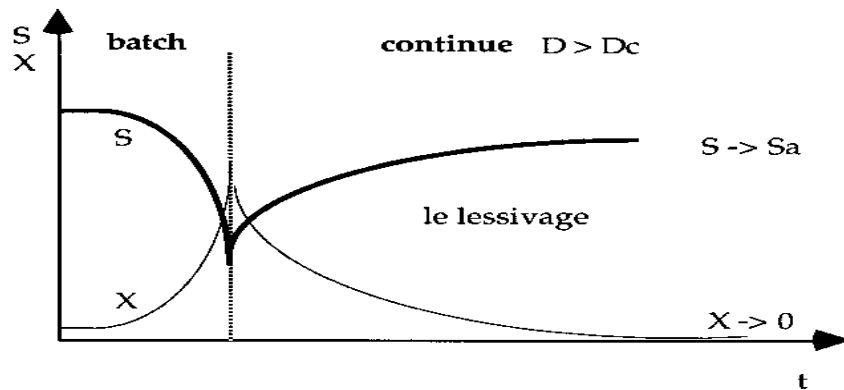


Figure 4.5 : Evolution des paramètres pour une culture continue avec lessivage (« X » tend vers 0 et « S » tend vers Sa)

b) 2^{ème} cas : Turbidostat

Ce mode de fermentation continu possède un système de régulation qui contrôle l'absorbance de la culture en agissant sur le débit d'écoulement Q et donc, sur le taux de dilution D. Un capteur d'absorbance (photomètre) intégré au bioréacteur y est couplé aux pompes qui assurent l'alimentation et le soutirage de façon à permettre le maintien de la concentration en biomasse à une valeur constante. Lorsque le photomètre détecte une augmentation ou une baisse d'absorbance, le régulateur augmente ou diminue le débit jusqu'à ce qu'elle revienne à sa valeur constante, correspondante au taux de croissance maximale μ_m .

En effet, le taux de dilution (D) peut être choisi de telle manière que celui-ci soit égal au taux de croissance initiale (μ), c'est à dire lors de l'instauration de la fermentation continue.

soit $D = \mu_m$

3^{ème} cas : Chemostat ($D < \mu_m$)

Dans un chemostat, le milieu de culture contient un élément nutritif essentiel limitant, de façon à garder le taux de croissance spécifique sous sa valeur maximale ($\mu < \mu_m$). Dans ces conditions, toute augmentation du débit Q entraîne une augmentation de la concentration en substrat limitant dans la culture et par conséquent, du taux de croissance spécifique μ . Tant que la concentration en substrat reste sous la concentration critique qui donne une valeur de vitesse spécifique maximale μ_m , le système s'autorégule, le taux de dilution (D) détermine directement le taux de croissance spécifique μ ($\mu = D$), ce qui exclut tout besoin d'un système de régulation.

Pour ce type de fermentation en mode continu, c'est la concentration en ce substrat limitant à l'équilibre qui contrôle la culture continue, d'où sa dénomination « **chemostat** » car l'état stationnaire résulte de l'action limitante de la concentration en un élément chimique du milieu de culture.

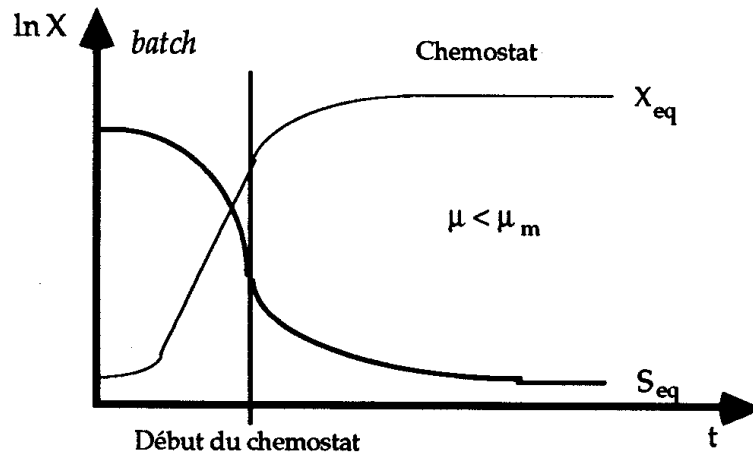


Figure 4.6 : Etablissement de l'équilibre lors d'une culture continue de type chemostat

Pour les conditions de culture déterminées et constantes, on peut résumer les différents modes de fermentation continue comme suit :

Choix du taux de dilution	Type de culture continue	Evolution des paramètres
$D > \mu_m$	Lessivage	$X \rightarrow 0$ $S \rightarrow S_a$
$D < \mu_m$	Chemostat	$X \rightarrow X_{eq}$ $S \rightarrow S_{eq}$ $\mu \rightarrow \mu_{eq} = D$
$D = \mu_m$	Turbidostat	$X = \text{constante}$ $\mu = \mu_m$