



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed-
Boudiaf USTOMB
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département du Vivant et de l'Environnement



Polycopié de Microbiologie industrielle

Destiné aux étudiants de Master 2^{ème} année Microbiologie appliquée.

Dr KALBAZA KHADIDJA

khadidja.kalbaza@univ-usto.dz

2024 - 2025

Liste des figures

Figure 1 : Produits microbiens à application médicales ou pharmaceutique.	2
Figure 2 : Production du méthane par transformation de biodéchets.....	3
Figure 3 : Biofilm formé par <i>Rhodococcus ruber</i> sur la surface de polyéthylène.	4
Figure 4 : Arbre phylogénétique montrant la relation entre les archées et les autres formes de vie.	6
Figure 5 : Réacteur à cuve agitée standard.....	19
Figure 6 : Système de chauffage par serpentins de chauffage internes ou enveloppe chauffante.	20
Figure 7 : Système d'aération par sparger.....	21
Figure 8 : Installation d'un fermenteur.	22
Figure 9 : Les étapes de la fermentation industrielle.	23
Figure 10 : Graphique illustrant les différentes phases de croissance microbienne dans une culture réalisée en mode discontinu (batch).	23
Figure 11 : Principe de la conduite de la fermentation continue.....	24
Figure 12 : Principe de la production des (P.O.U).	26

Liste des tableaux

Tableau 1 : Sous-produits agricoles et industriels et leur utilisation pour produire des P.O.U.	27
Tableau 2 : Microorganismes utilisés pour la production de P.O.U.	28
Tableau 3 : Teneur des micro-organismes en protéines et en acides nucléiques.	30
Tableau 4 : Microorganismes producteurs d'acides aminés.	32
Tableau 5 : Microorganismes producteurs d'acides organiques.	32
Tableau 6 : Applications d'enzymes industrielles.....	35

Polycopié de microbiologie industrielle

Avant-propos

1. Introduction à la microbiologie industrielle.....	1
1.1. Historique	1
1.2. Domaines d'activité de la microbiologie industrielle.....	2
1.2.1. Application médicale ou pharmaceutique	2
1.2.2. Application agricole	3
1.2.3. Applications en industrie agro-alimentaire.....	3
1.2.4. Production d'énergie	3
1.2.5. Production de solvants.....	4
1.2.6. Applications environnementales.....	4
1.2.7. Application en biologie moléculaire.....	4
2. Les Microorganismes utiles en industrie	5
2.1. Propriétés d'un micro-organisme utile en industrie	5
2.2. Les microorganismes d'intérêt industriel	6
2.2.1. Les archaebactéries.....	6
2.2.1.1. Les méthanogènes	6
2.2.1.2. Les halophiles extrêmes	7
2.2.1.3. Les thermophiles extrêmes.....	7
2.2.2. Les Protéobactéries	7
2.2.2.1. Les bactéries de l'acide acétique	7
2.2.2.2. <i>Escherichia coli</i>	8
2.2.2.3. <i>Pseudomonas fluorescences</i>	8
2.2.2.4. Le genre <i>Xanthomonas</i>	8
2.2.2.5. Le genre <i>Acidithiobacillus</i>	9
2.2.2.6. Le genre <i>Rhizobium</i>	9
2.2.2.7. Le genre <i>Agrobacterium</i>	9
2.2.2.8. Le genre <i>Zymomonas</i>	10
2.2.3. Les Firmicutes	10
2.2.3.1. <i>Clostridium</i>	10
2.2.3.2. Les genres <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> et <i>Leuconostoc</i>	10
2.2.3.3. Le genre <i>Streptococcus</i>	11

2.2.3.4.	Le genre <i>Bacillus</i>	11
2.2.4.	Actinobactéries	11
2.2.4.1.	Le Genre <i>Cellulomonas</i>	11
2.2.4.2.	Le genre <i>Corynebacterium</i>	12
2.2.4.3.	Le genre <i>Streptomyces</i>	12
2.2.5.	Champignons	12
2.2.5.1.	<i>Chytridiomycètes</i>	12
2.2.5.2.	<i>Glomeromycètes</i>	12
2.2.5.3.	<i>Zygomycètes</i>	13
2.2.5.4.	<i>Ascomycètes</i>	13
2.2.5.5.	<i>Basidiomycètes</i>	13
2.2.5.6.	<i>Deuteromycetes</i>	14
2.2.6.	Les levures.....	14
2.3.	Les collections culturelles et la conservation des microorganismes	14
3.	Milieux de culture industriels	15
3.1.	Sources de carbone	16
3.1.1.	Mélasses.....	16
3.1.2.	Extrait de malt	16
3.1.3.	Amidon et dextrines.....	16
3.1.4.	Liqueur de résidus au sulfite.....	16
3.1.5.	Cellulose	16
3.1.6.	Le lactosérum	17
3.1.7.	Alcanes et alcools	17
3.1.8.	Graisses et huiles	17
3.2.	Sources d'azote	17
3.2.1.	Liqueur de maïs	17
3.2.2.	Extraits de levure	17
3.2.3.	Peptones.....	17
3.2.4.	Farine de soja.....	18
3.3.	Eau.....	18
3.4.	Minéraux	18
3.5.	Vitamines et facteurs de croissance.....	18
3.6.	Précurseurs	18
3.7.	Inducteurs	18
3.8.	Inhibiteurs.....	18

3.9.	Modificateurs de perméabilité cellulaire	18
3.10.	Antimousses.....	19
4.	La conception des fermenteurs	19
4.1.	Pièces composantes des bioréacteurs	19
4.2.	Contrôle de la température	20
4.3.	Agitation et aération	20
4.4.	Ports d'alimentation	21
4.5.	Contrôle de la mousse	21
4.6.	Utilisation de l'ordinateur dans le fermenteur	21
5.	Conduite de fermentation industrielle.....	22
5.1.	Préparation de la fermentation industrielle	22
5.2.	Les différentes conduites de fermentation.....	23
5.2.1.	Culture discontinue (en batch).....	23
5.2.2.	Processus de fermentation continue	24
5.2.2.1.	Le mode continu sans recyclage de la biomasse.....	25
5.2.2.2.	Le mode continu avec recyclage de la biomasse	25
5.3.	Culture Fed-Batch	25
6.	Les protéines d'organismes unicellulaires	25
6.1.	Production de P.O.U.....	26
6.1.1.	Les conditions de culture	26
6.1.2.	Le choix du microorganisme	28
6.2.	Les micro-organismes utilisés pour la production de P.O.U et leurs propriétés	28
6.2.1.	Les bactéries	29
6.2.2.	Les levures	29
6.2.3.	Les champignons	29
6.2.4.	Les algues	29
6.3.	Valeur nutritionnelle des P.O.U	29
6.4.	Séparation et traitement en aval	30
6.5.	Limites du SCP.....	30
6.6.	Le processus BEL.....	30
6.7.	Le processus SYMBA	31
6.8.	Le processus PEKILO	31
6.9.	Le processus BIOPROTÉINE	31
7.	Les produits de fermentations industrielles	31
7.1.	Les acides aminés.....	31

7.2.	Les acides organiques.....	32
7.3.	Les Biogaz (H ₂ , CH ₄).....	33
7.4.	Les vitamines.....	33
7.5.	Les vaccins	33
7.5.1.	Production d'anatoxines bactériennes	33
7.5.2.	Production de vaccins bactériens tués	33
7.6.	Production d'éthanol et de composés associés	34
7.6.1.	Production d'éthanol	34
7.6.2.	Production de Glycérol.....	34
7.6.3.	Production de 1,3-propanediol	34
7.7.	Antibiotiques	34
7.8.	Polysaccharides	34
8.	Les enzymes industrielles	35
8.1.	Introduction	35
8.2.	Préparation des enzymes	36
8.2.1.	Le choix d'un microorganisme producteur de l'enzyme.....	36
8.2.2.	Milieux de la production des enzymes	36
8.2.3.	Méthodes d'extraction et de purification des enzymes	36
8.2.3.1.	Extraction.....	36
8.2.3.2.	La purification.....	37
8.1.1.1.	La conservation.....	37
8.2.	Les enzymes immobilisées.....	38
8.3.	Applications des enzymes immobilisées.....	38
8.3.1.	Applications analytiques.....	38
8.3.2.	Applications thérapeutiques	38
8.3.3.	Applications agro-alimentaires.....	38
	Références bibliographiques.....	39

Avant-propos

Chers étudiants de la 2^{ème} année Master en microbiologie appliquée,

Il m'est particulièrement gratifiant de vous accueillir dans ce polycopié dédié à l'étude de la microbiologie industrielle. En tant que futurs professionnels en microbiologie appliquée, vous êtes sur le point d'explorer des domaines de recherche et de pratique qui contribueront grandement à façonner l'avenir des applications de la microbiologie et de la valorisation des micro-organismes dans différents secteurs industriels.

Ce polycopié a été conçu pour vous offrir un aperçu complet des processus de production de métabolites microbiens ou de la biomasse sur la base de sous-produits agricoles ou industriels. Nous aborderons au début les différentes applications de la microbiologie industrielle, les micro-organismes industriels et les milieux de culture industriels.

Nous plongerons également dans l'univers des fermentations industrielles, en explorant la conception des fermenteurs industriels, les mécanismes de contrôle des fermentations et les principes des cultures industrielles.

Enfin, nous nous pencherons sur la production de la biomasse et des métabolites microbiens.

J'encourage vivement votre engagement actif dans l'apprentissage de ces concepts essentiels. Je souhaite que cette ressource vous serve de source d'inspiration et d'éclaircissement tout au long de votre parcours académique et professionnel. J'ai hâte de voir les connaissances et les compétences que vous développerez grâce à ce polycopié, et je suis convaincue que vous contribuerez de manière significative à l'avancement de ce secteur.

Bonne lecture et réussite dans vos études !

1. Introduction à la microbiologie industrielle

La microbiologie industrielle peut être définie comme l'étude de la production à grande échelle de micro-organismes ou de leurs produits. Elle est principalement associée à l'exploitation commerciale des micro-organismes, et implique des processus et des produits qui sont d'importance économique, environnementale et sociale à travers le monde. Il existe deux aspects clés de la microbiologie industrielle, le premier relatif à la production de produits microbiens précieux via des processus de fermentation. Il s'agit notamment des aliments et des boissons fermentés traditionnels, tels que le pain, la bière, le fromage et le vin... De plus, plus depuis une centaine d'années, les micro-organismes ont été également utilisés dans la production de nombreuses matières premières chimiques, sources d'énergie, enzymes, ingrédients alimentaires et produits pharmaceutiques. Le deuxième aspect est le rôle des micro-organismes dans le traitement des déchets et le contrôle de la pollution, qui utilise leurs capacités à dégrader pratiquement tous les produits naturels et les produits fabriqués par l'homme.

1.1. Historique

L'idée que les microbes étaient responsables des fermentations n'a été introduite qu'en 1857, lorsque Louis Pasteur a publié un article décrivant la cause de l'échec industriel de la fermentation alcoolique. Il a également décrit la croissance microbienne et le métabolisme pour la première fois et a suggéré un traitement thermique (pasteurisation) pour améliorer la qualité de conservation des vins.

En 1883, Emil Christian Hansen a commencé à utiliser des cultures de levure pure pour la production de bière au Danemark. La bière et le vin ont été produits à relativement grande échelle à partir du XVIIIe siècle pour satisfaire les exigences de la croissance populations urbaines. Au milieu du XIXe siècle, la production de l'éthanol pour être utilisée comme un solvant industriel et un carburant.

La première fermentation aseptique à grande échelle a été la fermentation acétone-butanol, que la Grande-Bretagne et l'Allemagne ont poursuivi dans les années précédant la guerre mondiale l'objectif initial était de fournir du butanol comme un précurseur du butanediol, destiné à être utilisé dans le caoutchouc synthétique.

Après le début de la guerre, l'acétone été produit par fermentation pour être utilisée pour fabrication de munitions. Au fur et à mesure que le processus a été développé et mis à l'échelle industrielle et exécuté dans des conditions aseptiques en utilisant *Clostridium acetobutylicum*,

Dans les années 1920 et 1930, l'accent mis sur la fermentation s'est déplacé vers les acides organiques, principalement l'acide lactique et acide citrique.

La production à grande échelle de la pénicilline, qui a été découverte en 1929 en Grande-Bretagne, s'est développée dans les années 1930, et commercialisé en 1942 aux États-Unis. C'était le premier médicament "miracle", guérissant régulièrement les infections bactériennes.

Dans les années 1960, les fermentations d'acides aminés ont été développées au Japon. Initialement, l'acide L-glutamique,

La production commerciale d'enzymes à utiliser dans les procédés industriels a commencé à grande échelle dans les années 1970. Ainsi la découverte des outils du génie génétique a élargi les possibilités pour les produits fabriqués par fermentation. L'insuline a été la première fermentation génétiquement modifiée commercialisée, développée en 1977. Depuis lors, de nombreux produits génétiquement modifiés ont été produits à grande échelle.

Les connaissances en microbiologie se développent de manière exponentielle grâce à la détermination des séquences génomiques de centaines de micro-organismes et l'invention de nouvelles technologies, telles que la génomique, la transcriptomique et la protéomique.

1.2. Domaines d'activité de la microbiologie industrielle

1.2.1. Application médicale ou pharmaceutique

L'application médicale de la microbiologie industrielle est la production de nouveaux médicaments synthétisés dans un organisme spécifique à des fins médicales. Certains antibiotiques, précurseurs naturels, acides aminés sont produits par fermentation. Les micro-organismes se développent dans un milieu liquide où la taille de la population est contrôlée afin d'obtenir la plus grande quantité de produit. Les vitamines sont également produites par fermentation ou biotransformation (figure 1).

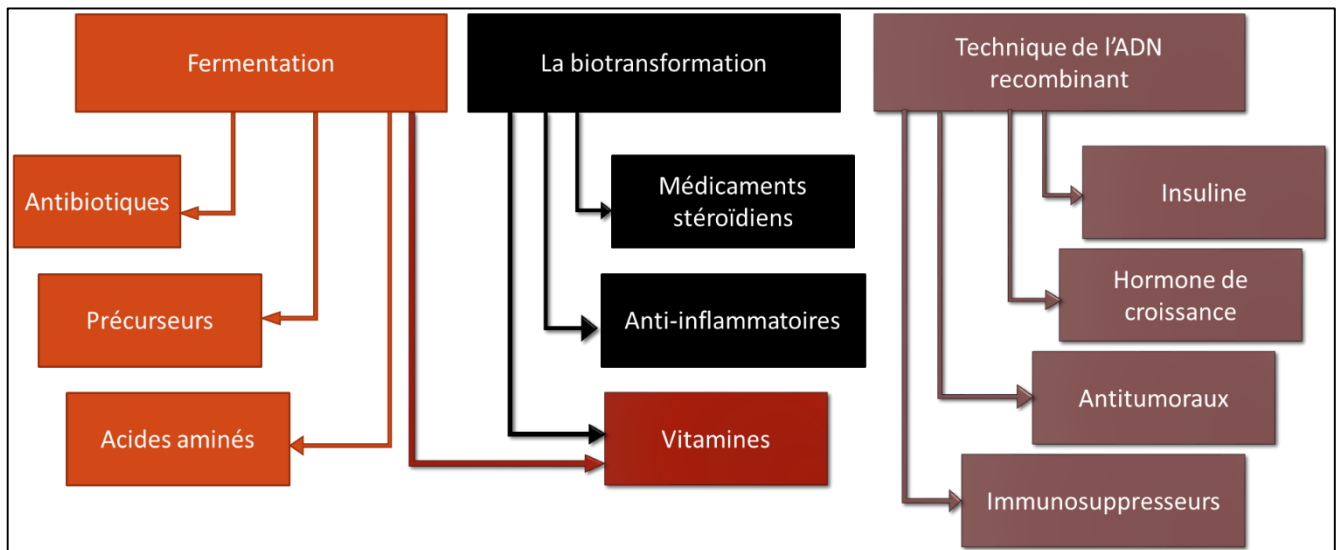


Figure 1 : Produits microbiens à application médicales ou pharmaceutique.

1.2.2. Application agricole

L'utilisation excessive d'engrais chimiques et de pesticides a des effets à long terme. Dans ce cas, les biofertilisants, les biopesticides et l'agriculture biologique viennent à la rescousse. Les pesticides microbiens, généralement constitués d'un virus, d'une bactérie ou d'un champignon, sont utilisés pour contrôler les populations de parasites de manière plus spécifique.

1.2.3. Applications en industrie agro-alimentaire

Les micro-organismes ont longtemps joué un rôle majeur dans la production d'aliments et de boissons. Les aliments fermentés traditionnels comprennent :

- a) Les boissons alcoolisées, en particulier bières, vins et spiritueux, qui sont dérivés de sucres et d'amidons ;
- b) Les produits laitiers, en particulier fromages, yaourt, les crèmes et le kéfir ;
- c) Les produits à base de poisson et de viande, tels que la sauce de poisson et les saucisses fermentées ;
- d) Les produits végétaux, notamment les pains à base de céréales et produits à base de riz fermenté ; les fruits fermentés, légumes et légumineuses, y compris les olives en conserve et cornichons, choucroute, sauce soja, tofu, cacao et grains de café.

1.2.4. Production d'énergie

Les microorganismes jouent un rôle primordial dans le domaine d'énergie renouvelable, en effet, par l'intervention de plusieurs microorganismes, les déchets organiques peuvent être convertis en biogaz (méthane) (figure 2) ou bioéthanol, qui sont ensuite utilisés comme carburants pour remplacer l'énergie fossile.

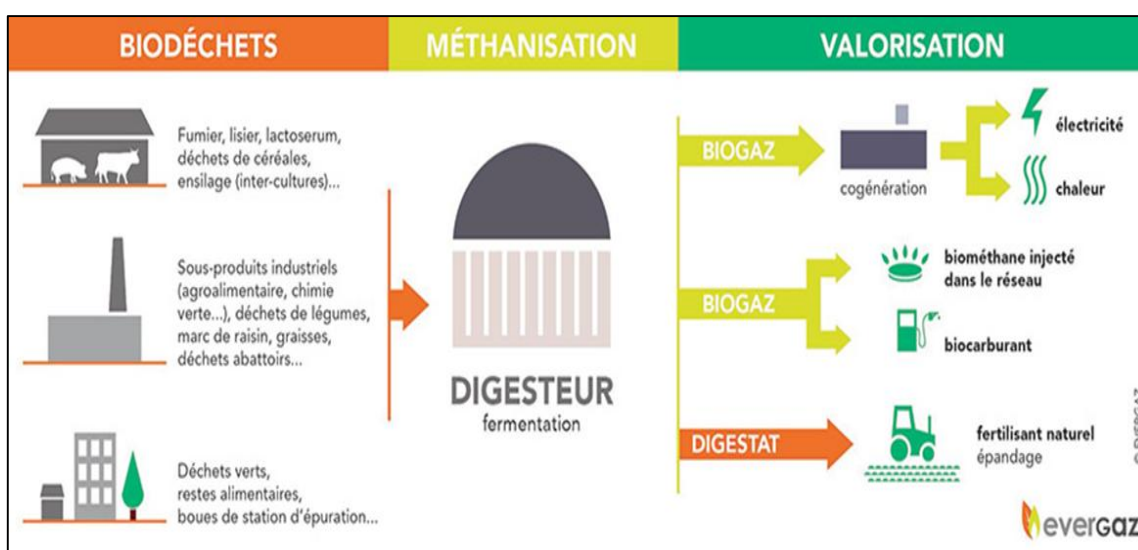


Figure 2 : Production du méthane par transformation de biodéchets.

1.2.5. Production de solvants

Des composés tels que l'acétone, le méthanol, le butanol et l'éthanol ont de multiples applications dans l'industrie, souvent comme matières premières pour les processus industriels. Le microbiologiste est impliqué dans la recherche, l'amélioration de la production et de la détection de nouvelles voies métaboliques.

1.2.6. Applications environnementales

Les micro-organismes jouent un rôle fondamental dans le recyclage de la matière en libérant du carbone, de l'azote, du phosphore et du soufre et d'une immense variété de composés organiques complexes pour être réutilisés par les organismes vivants et générer de l'énergie. La polyvalence métabolique spectaculaire des procaryotes et des champignons se manifeste dans les principaux domaines de la microbiologie environnementale (figure 3).

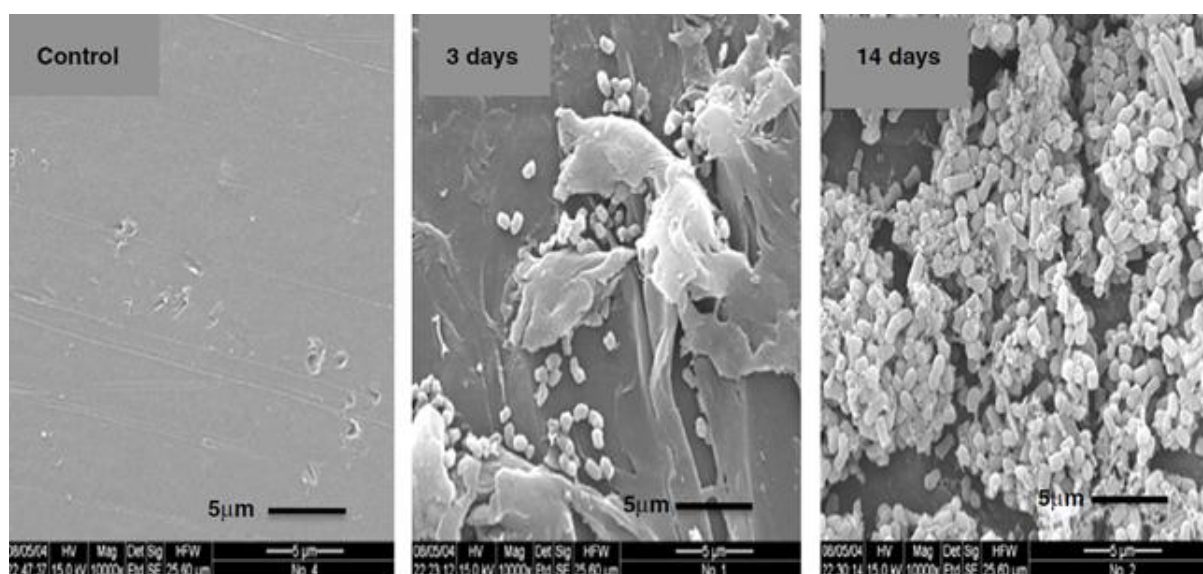


Figure 3 : Biofilm formé par *Rhodococcus ruber* sur la surface de polyéthylène.

1.2.7. Application en biologie moléculaire

Les enzymes microbiennes catalysent une énorme variété de réactions chimiques dans des conditions très variables qui transforment d'innombrables composés organiques. Cet immense réservoir d'enzymes peut être exploré en criblant des micro-organismes disponibles en culture pure.

2. Les Microorganismes utiles en industrie

Les micro-organismes sont largement utilisés pour fournir une vaste gamme de produits. Ils se sont avérés particulièrement utiles en raison de la facilité de leur culture en masse, de leur rapidité de croissance, de l'utilisation de substrats bon marché (qui sont dans de nombreux cas des déchets) et de la diversité des produits potentiels. Leur capacité à subir facilement des manipulations génétiques a également ouvert d'autres possibilités illimitées pour de nouveaux produits et services de l'industrie de la fermentation.

Les fermentations traditionnelles étaient à l'origine réalisées (et le sont toujours dans certains cas) par un mélange de micro-organismes sauvages, les micro-organismes employés étaient souvent isolés de l'environnement naturel, ce qui impliquait le criblage aléatoire d'un grand nombre d'isolats. Alternativement, des micro-organismes appropriés ont été acquis à partir de collections de culture. La plupart de ces micro-organismes, quelle que soit leur origine, ont ensuite été modifiés par des stratégies classiques d'amélioration des souches, en utilisant programmes de mutagenèse ou de sélection, afin d'améliorer leurs propriétés pour une utilisation industrielle. Plusieurs procédés développés au cours des 20 dernières années ont impliqué des micro-organismes recombinants et la technologie du génie génétique a été de plus en plus utilisée pour améliorer les souches industrielles.

2.1. Propriétés d'un micro-organisme utile en industrie

Un micro-organisme utilisé dans un processus industriel doit avoir d'autres caractéristiques en plus de pouvoir produire la substance d'intérêt avec un rendement élevé.

- a) L'organisme doit être capable de croître et de former des produits dans une culture à grande échelle.
- b) Il doit produire des spores (s'il s'agit de champignons ou de levures) ou une autre forme de cellule reproductrice afin qu'il puisse être facilement inoculé dans les fermenteurs utilisés pour faire pousser l'organisme producteur à l'échelle industrielle.
- c) Il doit également se développer rapidement et produire le produit souhaité dans un délai relativement court.
- d) Il doit également pouvoir se développer dans un milieu de culture liquide pouvant être obtenu en grande quantité à bas prix. De nombreux processus microbiologiques industriels utilisent des déchets de carbone provenant d'autres industries comme ingrédients principaux ou supplémentaires pour les milieux de culture à grande échelle.
- e) Un micro-organisme industriel ne doit pas être pathogène. En raison des fortes densités cellulaires dans les processus microbiens industriels et de la quasi-impossibilité d'éviter la contamination de l'environnement à l'extérieur du récipient de croissance.
- f) Enfin, un micro-organisme industriel doit pouvoir être manipulé génétiquement, car des rendements accrus sont souvent obtenus au moyen de mutations et de techniques classiques de sélection génétique. Un micro-organisme génétiquement stable et facilement manipulable est donc un avantage évident pour un procédé industriel.

2.2. Les microorganismes d'intérêt industriel

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de caractériser les gènes qui codent pour les ARN ribosomiaux (ARNr). En comparant une multitude de séquences d'ARNr 16S, appartenant à divers organismes vivants, il est arrivé à diviser les organismes vivants en trois domaines. Le domaine des Bacteria ou Eubacteria, le domaine des Archaea et le domaine des Eucarya (animaux, plantes, mycètes et protistes) (figure 4).

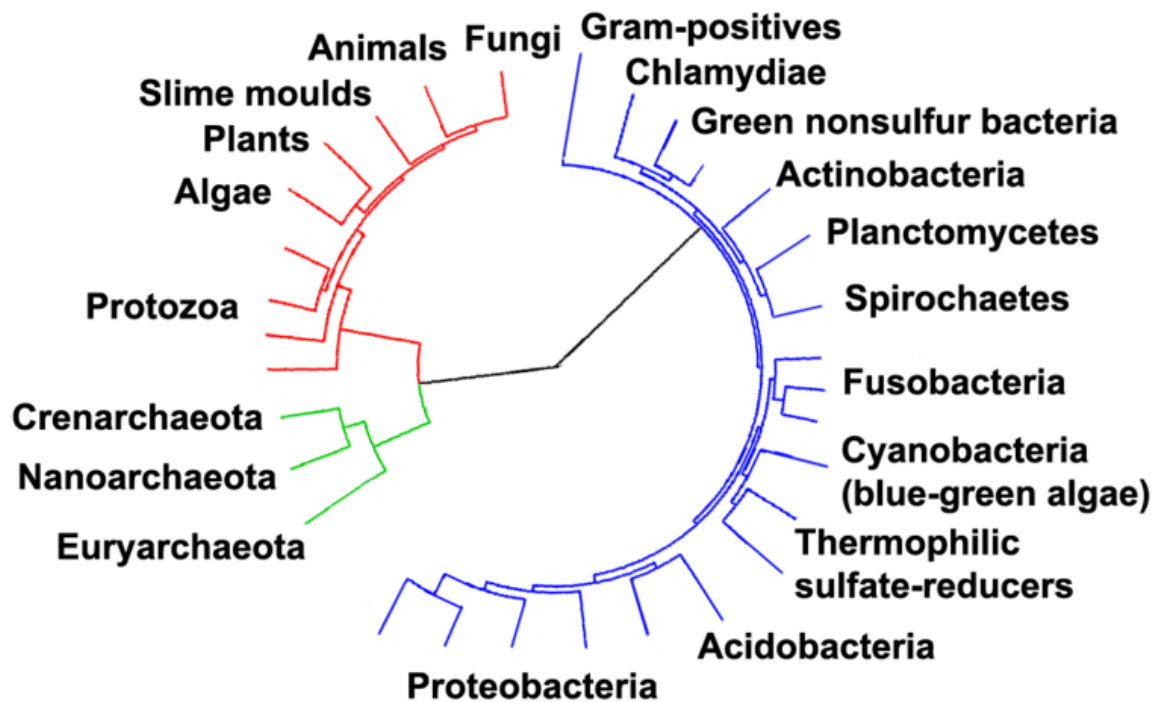


Figure 4 : Arbre phylogénétique montrant la relation entre les archées et les autres formes de vie.

Les eucaryotes sont de couleur rouge, les archées de couleur verte et les bactéries en bleu. Adapté de Ciccarelli *et al.*

2.2.1. Les archaeobactéries

Les archaeobactéries sont adaptées à la vie dans des conditions de vie extrêmes (forte salinité, haute température, faible pH, sans oxygène). Des conditions qui ressemblent à celles de la terre lors de l'apparition de la vie. Ce sont des bactéries primitives.

2.2.1.1. Les Méthanogènes

Les méthanogènes est un groupe de micro-organismes qui produisent du méthane par la décomposition de substrats simples tels que l'hydrogène, l'acétate et d'autres composés simples du carbone dans un environnement anaérobie.

Selon l'industrie, ces organismes peuvent avoir des effets bénéfiques :

Le traitement biologique des eaux usées est un processus énergivore. Pour aider à la récupération d'énergie, de nombreuses usines de traitement des eaux usées commencent à installer des digesteurs anaérobies afin de produire du méthane (ou biogaz) à partir de leurs boues résiduelles. Ce biogaz peut être utilisé pour produire de l'électricité ou de la chaleur.

2.2.1.2. Les halophiles extrêmes

Les halophiles extrêmes nécessitent une présence de sel à 9%. Ils tolèrent des pH basiques de l'ordre de 11.5. On les trouve dans les lacs salés, les marais salants, saumures (eau très salée). Les microorganismes halophiles ont la capacité de produire une grande variété de molécules biologiques stables et uniques, qui peuvent être utiles pour des applications pratiques. Divers mécanismes de réponse des halophiles dans des conditions de salinité élevée provoquent la production de diverses biomolécules d'intérêt comme les protéases alcalines qui sont des enzymes thermophiles d'une utilisation principale dans les détergents pour blanchisserie.

2.2.1.3. Les Thermophiles extrêmes

La température optimale de croissance est de l'ordre de 80°C et même plus. Les thermophiles extrêmes sont des anaérobies et résistants aux pH acides extrêmes. Ils sont thermoacidophiles.

Les enzymes des thermophiles sont beaucoup plus résistantes, sont plus faciles à conserver, à utiliser et permettent ainsi de réduire dans certains cas le nombre d'étapes des procédés industriels, et ainsi d'augmenter la productivité. Elles permettent aussi d'accéder à des domaines d'application non explorés jusqu'alors.

2.2.2. Les Protéobactéries

Les protéobactéries sont un groupe majeur de bactéries Gram-négatives, avec une membrane externe principalement composée de lipopolysaccharides. Beaucoup se déplacent à l'aide de flagelles, mais certains sont immobiles ou dépendent du glissement bactérien. Il existe également une grande variété dans les types de métabolisme. Elles sont facultativement ou obligatoirement anaérobies et hétérotrophes, mais il existe de nombreuses exceptions.

Les protéobactéries sont divisées en cinq groupes : (alpha), (bêta), (gamma), (delta), (epsilon). Les seuls organismes d'importance industrielle actuelle dans les protéobactéries sont *Acetobacter* et *Gluconobacter*, qui sont des bactéries de l'acide acétique et appartiennent à la famille des protéobactéries. Un organisme appartenant également aux Alphaprotéobactéries et qui a le potentiel de devenir important sur le plan industriel est *Zymomonas*. Il produit de grandes quantités d'alcool, mais son utilisation industrielle n'est pas encore très répandue.

2.2.2.1. Les bactéries de l'acide acétique

Les bactéries de l'acide acétique sont *Acetobacter* (flagellé péritriche) et *Gluconobacter* (flagellé polaire). Ils ont les propriétés suivantes :

- a) Ils réalisent une oxydation incomplète de l'alcool conduisant à la production d'acide acétique et sont utilisés dans la fabrication du vinaigre.
- b) *Gluconobacter* n'a pas le cycle complet de l'acide citrique et ne peut pas oxyder l'acide acétique.
- c) *Acetobacter* possède toutes les enzymes de l'acide citrique et peut oxyder l'acide acétique en CO₂.
- d) Ils supportent des conditions acides de pH 5,0 ou moins.

Leur propriété de « sous-oxyder » les sucres est exploitée dans les cas suivants :

- La production d'acide glucuronique à partir de glucose, d'acide galactonique à partir de galactose et d'acide arabonique à partir d'arabinose ;
- La production de sorbose à partir de sorbitol, une étape importante dans la fabrication de l'acide ascorbique (appelé aussi Vitamine C).
- Les bactéries acétiques sont capables de produire de la cellulose pure lorsqu'elles sont cultivées dans une culture non agitée. Ceci n'est pas encore exploité industriellement

2.2.2.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie à Gram-négative appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, sous-classe *γ-Proteobacteria*. *E. coli* est utilisées pour la production de plusieurs acides aminés, notamment le L-tryptophane (tryptophanase) et le L-thréonine, Elle est utilisée aussi pour la production de certains sucres comme la bioconversion du L-rhamnose en L-rhamnulose. L'enzyme glucose isomérase d'***E. intermedia*** et ***E. freundii*** est utilisée dans la production de fructose (conversion du glucose en fructose).

2.2.2.3. *Pseudomonas fluorescentes*

Les pseudomonades fluorescentes excrètent des composés fluorescents vert jaunâtres dans le milieu de culture. Ils ne peuvent pas fabriquer d'ATP par fermentation ; ce sont des aérobies obligatoires. Contrairement à *E. coli*, certaines espèces sont réputées pour utiliser une large gamme de composés organiques comme sources d'énergie.

De nombreux membres du groupe fluorescent dégradent des composés tels que le camphre, le toluène et l'octane, ainsi que certaines substances synthétiques, telles que les composés aromatiques halogénés. Ainsi, les souches fluorescentes naturelles et fabriquées en laboratoire font l'objet d'études actives en tant que candidats possibles pour la remise en état de sites qui ont été contaminés par des niveaux élevés de composés organiques toxiques.

Les souches sauvages de *P. syringae* ont été mises en pratique pour fabriquer de la neige dans les stations de ski, avec des économies appréciables sur le coût du refroidissement.

2.2.2.4. Le genre *Xanthomonas*

Xanthomonas est un phytopathogène est apparenté aux pseudomonases fluorescentes et produit des pigments jaunes caractéristiques, qui ont donné son nom au genre (grec xanthos, signifiant « jaune »). Comme de nombreux autres agents pathogènes animaux et végétaux, cet

organisme sécrète des polysaccharides dans le milieu. Le polysaccharide de *Xanthomonas campestris*, le xanthane, a été mis à de nombreuses utilisations dans l'industrie alimentaire ainsi que dans la récupération assistée du pétrole.

2.2.2.5. Le genre *Acidithiobacillus*

Les espèces de ce genre sont de petits bâtonnets aérobies à Gram négatif, obligatoirement acidophiles (pH optimal < 4,0), qui oxydent les composés soufrés réduits ou Fe [II] pour la production d'énergie. *Acidithiobacillus thiooxidans* (anciennement *Thiobacillus thiooxidans*) utilise des composés soufrés réduits pour sa croissance mais ne peut pas oxyder Fe²⁺, tandis qu'*Acidithiobacillus ferrooxidans* (anciennement *Thiobacillus ferrooxidans*) se développe sur Fe²⁺ comme seul substrat énergétique. En absence d'oxygène, cet organisme est capable d'oxyder des formes réduites de soufre en utilisant du fer ferrique comme accepteur d'électrons alternatif. Les espèces d'*Acidithiobacillus* trouvent une large utilisation dans la lixiviation en tas des minerais métalliques.

2.2.2.6. Le genre *Rhizobium*

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont des bâtonnets Gram-négatifs flagellés. Les souches de *Rhizobium* sont des chimiohétérotrophes aérobies qui vivent dans le sol et envahissent les poils absorbants des plantes légumineuses, où ils forment des nodules racinaires dans lesquels ils fixent l'azote en grande partie au profit de la plante. Les micro-organismes fixateurs d'azote convertissent chaque année environ 200 millions de tonnes d'azote en ammoniac, et la majeure partie de cette fixation biologique de l'azote est réalisée par les fixateurs d'azote symbiotiques, tels que *Rhizobium*.

2.2.2.7. Le genre *Agrobacterium*

Agrobacterium regroupe des bâtonnets Gram-négatifs flagellés, chimiohétérotrophes aérobies abondants dans le sol. Ils portent un grand plasmide, le plasmide Ti, qui code diverses fonctions pour le transfert d'une petite partie de l'ADN plasmidique, appelé ADN-T, dans les cellules végétales. L'ADN-T s'intègre dans l'ADN chromosomique de la plante et stimule la synthèse d'une hormone de croissance végétale, provoquant ainsi la croissance de galles ou de tumeurs dans la plante hôte.

La capacité de ces souches à transférer des gènes dans des cellules végétales est, à ce jour, le seul exemple connu de transfert naturel de gènes entre un procaryote et un eucaryote. C'est un phénomène d'une immense importance potentielle en biotechnologie car il ouvre la porte au transfert stable de gènes étrangers dans les plantes cultivées. On peut imaginer que le plasmide Ti soit utilisé pour introduire des gènes pour les protéines de stockage modifiées, enrichies en certains acides aminés essentiels dans les grains céréaliers ; transférer des gènes pour la fixation de l'azote ; ou pour introduire des gènes de résistance à des maladies ou à des herbicides spécifiques dans des plantes.

2.2.2.8. Le genre *Zymomonas*

Les bactéries de ce genre sont des bâtonnets à Gram négatif avec des flagelles polaires se trouvent dans des extraits de plantes en fermentation riches en sucre tels que le vin de palme (fabriqué à partir de sève de palmier), l'extrait de canne à sucre et les cidres de pomme. Ils peuvent croître soit par fermentation, soit par respiration. Cependant, les sucres ne sont pas fermentés par la voie Embden-Meyerhof utilisée par les espèces entériques, mais par la voie Entner-Doudoroff, l'éthanol étant pratiquement le seul produit final plutôt qu'un mélange de lactate, éthanol, formiate, acétate et autres produits finaux. À certains égards, *Zymomonas* offre des avantages par rapport aux levures dans la production d'éthanol à grande échelle.

2.2.3. Les Firmicutes

Les Firmicutes sont à Gram positif, À l'origine, les Firmicutes étaient censées inclure toutes les bactéries Gram-positives, mais plus récemment, elles ont tendance à se limiter à un groupe central de formes apparentées, appelé le groupe à faible GC%, contrairement aux Actinobactéries, qui ont des rapports GC% élevés. Les firmicutes contiennent de nombreuses bactéries d'importance industrielle.

2.2.3.1. *Clostridium*

Les espèces de *Clostridium* sont des bactéries Gram-positives en forme de bâtonnet, généralement flagellées, qui sont strictement anaérobies et forment des endospores dans des conditions défavorables. Certains sont utiles dans les applications biotechnologiques car ils synthétisent des produits utiles tels que l'éthanol, l'acétylméthylcarbinol, le butanol et l'acétone.

Clostridium acetobutylicum, a produit 12 tonnes d'acétone à partir de 100 tonnes de mélasse.

2.2.3.2. Les genres *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*

Ces genres font partie du groupe communément appelé « bactéries lactiques ». Ils obtiennent de l'énergie par fermentation de sucres simples comme le glucose en produisant de l'acide lactique chez certaines espèces ou l'acide lactique, l'éthanol et le dioxyde de carbone chez les espèces hétérofermentaires. Ils poussent mieux à faible tension d'oxygène dans les habitats riches en sucres solubles, peptides, purines, pyrimidines et vitamines. Ces bactéries tolèrent bien les conditions acides et ne sont pas inhibées par la baisse de pH qui accompagne la transformation du glucose en acide lactique. La croissance de nombreuses autres bactéries ralentissent lorsque le pH est bas,

Diverses souches de ces genres sont utilisées dans les cultures starter pour produire des fromages et des produits laitiers fermentés comme le beurre, le babeurre et le yogourt.

2.2.3.3. Le genre *Streptococcus*

Les cellules des streptocoques sont sphériques et génèrent de l'ATP en convertissant le glucose en deux molécules d'acide lactique. Contrairement à *Leuconostoc* et *Pediococcus*, ce genre est apparenté de loin au genre *Lactobacillus*. Certains streptocoques sont associés à des animaux supérieurs et certains sont pathogènes. D'autres se produisent en association avec des plantes. *Streptococcus cremoris* est le principal organisme utilisé pour la fabrication des fromages à pâte dure comme le gouda et le cheddar ainsi que des fromages à pâte molle comme le camembert. Les streptocoques jouent également un rôle important dans la production d'autres produits laitiers fermentés.

Avec *Lactobacillus* les streptocoques représentent une production mondiale de produits laitiers de plus de 20 millions de tonnes métriques par an et une valeur d'environ 50 milliards de dollars. Les souches de streptocoques et de lactobacilles sont fournies à l'industrie laitière et de la viande par des entreprises commerciales spécialisées dans la production de ferments lactiques.

2.2.3.4. Le genre *Bacillus*

Bacillus sont des organismes mobiles en forme de bâtonnets qui forment des endospores lorsque les conditions sont défavorables à la croissance. La majorité des souches de *Bacillus* sont des saprophytes inoffensifs. Certaines souches sont thermophiles et poussent bien entre 65°C et 75°C. Un certain nombre d'espèces de *Bacillus* produisent des enzymes hydrolytiques extracellulaires qui décomposent les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides. Certaines de ces enzymes sont produites commercialement en grande quantité : les enzymes protéolytiques sont utilisées dans les lessives, et les enzymes hydrolysant les polysaccharides sont utilisées dans la dégradation de l'amidon. *Bacillus thuringiensis*, est la seule bactérie exploitée à grande échelle comme insecticide biologique. Les antibiotiques synthétisés par certaines souches de *Bacillus* sont produits à l'échelle commerciale, par exemple la bacitracine de *Bacillus subtilis* et la polymyxine de *Bacillus polymyxa*.

2.2.4. Actinobactéries

Les Actinobactéries sont un phylum de bactéries Gram-positives dont l'ADN a une forte teneur en GC. La plupart sont essentiellement des bactéries du sol aérobies à métabolisme respiratoire ; la plupart n'ont pas de flagelles et sont en forme de bâtonnets, sont souvent minces et longs, et ont tendance à se diviser de manière irrégulière et à former des filaments ramifiés.

2.2.4.1. Le Genre *Cellulomonas*

Les cellules de *Cellulomonas* sont des bâtonnets irréguliers avec un métabolisme respiratoire. La principale caractéristique biochimique distinctive des souches de *Cellulomonas* est leur capacité à décomposer la cellulose. Les enzymes de dégradation de la cellulose de *Cellulomonas* ont été étudiées de près ces dernières années en raison de l'intérêt porté à l'utilisation de matières végétales riches en cellulose comme source de matière première pour la production d'alcool et de protéines.

2.2.4.2. Le genre *Corynebacterium*

Une espèce, *Corynebacterium glutamicum*, est devenue célèbre lorsqu'on a découvert qu'elle avait la capacité de convertir une très grande partie de sa matière première en acide glutamique et de l'excréter dans le milieu. Ce processus, qui implique des particularités remarquables dans sa régulation des voies de biosynthèse des acides aminés combinées à une sous-alimentation accidentelle en vitamine (biotine) et en oxygène,

2.2.4.3. Le genre *Streptomyces*

Les souches de *Streptomyces* se développent sous forme de filaments ramifiés appelés hyphes, qui forment des mycéliums. Les streptomyces, comme la plupart des membres de la lignée des actinomycètes, sont des habitants du sol. Ils dégradent les substrats polymères tels que les polysaccharides (amidon, pectine et chitine) ainsi que les protéines. Ils ont des exigences de croissance simples

En 1943, Selman Waksman et ses collaborateurs ont découvert une puissante substance antibactérienne, la streptomycine, libérée dans le milieu de croissance par *Streptomyces griseus*. Il s'agissait du deuxième antibiotique de très grande utilité à être caractérisé, peu après la caractérisation de la pénicilline. Depuis lors, de nombreux autres antibiotiques ont été isolés à partir de streptomycètes, notamment la tétracycline, l'érythromycine, la néomycine et la gentamicine.

2.2.5. Champignons

Les Champignons englobent les moisissures et les levures, Certains sont invisibles à l'œil nu. D'autres poussent à plus de deux pieds de diamètre.

2.2.5.1. *Chytridiomycètes*

Les chytrides sont un groupe morphologiquement diversifié avec environ 1000 espèces connues. Leurs parois cellulaires contiennent de la chitine (un polymère à liaison β -(1-4) de la N-acétylglucosamine) ; Beaucoup sont saprophytes. Par exemple, *Rhizophlyctis rosea* est un décomposeur de cellulose couramment rencontré dans les sols. D'autres sont des parasites des plantes, des insectes et de certains amphibiens.

2.2.5.2. *Glomeromycètes*

Les champignons mycorhiziens arbusculaires (AM) sont placés dans cette division. Ce sont des organismes obligatoirement symbiotiques et asexués.

Les champignons AM ont une grande importance écologique et économique. Plus de 80% des familles de plantes terrestres vasculaires participent aux mycorhizes. Dans le cas de certaines plantes, l'association avec leur partenaire fongique AM est essentielle au développement normal. Les champignons AM améliorent la biodiversité et aident à lutter contre les ravageurs tels que les nématodes et les agents pathogènes fongiques.

2.2.5.3. Les Zygomycètes

Les membres de *Zygomycota* produisent des spores asexuées non mobiles (zygospores) formées dans un sporocarpe. Le thalle est généralement mycélien et généralement asepté (sans parois transversales). La paroi cellulaire est composée de chitosane (un polymère mal acétylé ou non acétylé de glucosamine) et de chitine. Les organismes représentatifs sont les saprophytes du sol *Mucor* et *Rhizopus*. *Rhizopus nigricans* a longtemps été utilisé dans la production d'acide citrique. *Entomophthora* est un important parasite commun des insectes tels que les mouches domestiques et les pucerons.

2.2.5.4. Ascomycètes

Ascomycota est la plus grande subdivision de champignons, contenant 15 000 espèces. La structure végétative se compose soit de cellules uniques (comme dans les levures), soit de filaments cloisonnés (segmentés), la plupart des segments contenant plusieurs noyaux. Deux organismes de cette subdivision, *Neurospora* (moisissure du pain) et *Saccharomyces* (levure de boulanger et de bière), sont particulièrement familiers aux généticiens

Ces organismes unicellulaires se multiplient par bourgeonnement. *S. cerevisiae* sont largement utilisés dans la fermentation de certaines bières et vins, dans la production de levure de boulanger et dans de nombreuses applications biotechnologiques. Une bière africaine à base de mil, et l'arack, une bière asiatique à base de mélasse, de riz ou de sève de palmier à cacao, sont tous deux des produits de la fermentation de *Schizosaccharomyces pombe*. Les levures *Schizosaccharomyces* se divisent par fission binaire et sont appelées levures à fission.

2.2.5.5. Les Basidiomycètes

Les basidiomycètes forment des spores sexuelles sur une cellule spéciale appelée baside. Les parois cellulaires sont composées de glucane et de chitine.

Les espèces *d'Agaricus*, les champignons les plus couramment cultivés pour la consommation humaine dans le monde occidental, sont incluses chez les *Basidiomycota*. Les champignons sont cultivés commercialement sur des composts organiques.

Certains Basidiomycètes sont connus depuis les temps anciens pour leurs propriétés médicinales ; par exemple *Ganoderma*, *Trametes versicolor*, *Amadouvier*, *Tremella fuciformis* et *shiitake* Ils étaient déjà connus dans la médecine traditionnelle chinoise. Il est maintenant reconnu par l'établissement médical pour leurs propriétés thérapeutiques plus de 270 espèces de Basidiomycètes, dont certaines sont produites à l'échelle industrielle.

Certains champignons tels que *Trametes odorata*, produire un arôme doux monoterpènes (linalol) Ou rose (géraniol et nerol). D'autres sont utilisés dans la production de menthol.

Les champignons pourriture blanche sont les seuls organismes capables de minéraliser complètement lignine. L'utilisation de ces champignons ou leurs enzymes ces dernières années

a considérablement augmenté à la fois à l'échelle industrielle, principalement dans l'industrie du papier, à la fois l'environnement, dans les processus de biorestauration.

2.2.5.6. *Deuteromycetes*

Ce groupe artificiel a été créé pour accueillir les champignons connus sous le nom de «champignons imparfaits ». Leur structure végétative est soit unicellulaire (levures) soit un mycélium cloisonné semblable à ceux des ascomycètes et des basidiomycètes.

Les membres de genres dont d'importance économique considérable, comme *Aspergillus* et *Penicillium*, *Aspergillus niger* est utilisé dans la production d'acides citrique et gluconique. *Aspergillus oryzae* est utilisé dans l'industrie alimentaire dans les fermentations de produits à base de riz et de soja et dans la production industrielle d'enzymes protéolytiques et amylolytiques.

Les espèces de *Penicillium* poussent sur toutes sortes de matériaux en décomposition et sont cosmopolites dans leur distribution. La souche de *Penicillium notatum* purifiée par Fleming a été la première utilisée pour la production de pénicilline, bien qu'à la suite d'un dépistage intensif, elle ait depuis été remplacée par d'autres souches.

Penicillium griseofulvum est une source de griséofulvine, qui est administrée par voie orale pour traiter les infections fongiques de la peau ou des ongles.

Plusieurs espèces de *Penicillium* sont importantes dans l'industrie alimentaire : Par exemple, *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* sont utilisés dans la fabrication des fromages qui portent leur nom. Les espèces de *Penicillium* sont également d'importants producteurs de mycotoxines

2.2.6. Les levures

Plusieurs centaines de milliers de tonnes de levure sont cultivées chaque année. Beaucoup de ces champignons unicellulaires sont utilisés dans la fabrication du vin, le brassage et la boulangerie et comme sources d'enzymes. Les levures récupérées comme sous-produits des fermentations alcooliques sont vendues pour l'alimentation animale. Les souches *Torulopsis* et *Candida* sont cultivées spécifiquement pour l'alimentation sur mélasse.

Les levures qui utilisent des hydrocarbures et du méthanol sont cultivées pour la production de protéines. La levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*, est produite en grande quantité.

2.3. Les collections culturelles et la conservation des microorganismes

Les utilisateurs de micro-organismes ont besoin de sources fiables de cultures pures et authentifiées. Dans le monde, il existe plus de 500 collections de cultures contenant des souches de bactéries et de champignons disponibles, généralement les collections obtiennent la plupart de leurs souches auprès de microbiologistes travaillant dans des universités ou des instituts de recherche ; d'autres souches proviennent d'industries. De plus, la loi exige maintenant que si un

processus utilise un micro-organisme il doit être breveté, une culture du micro-organisme doit être déposée auprès d'une collection de culture reconnue.

Aucune procédure de conservation unique n'est appropriée pour tous les organismes. Il existe quatre méthodes de base qui diffèrent par leur coût et leur commodité.

- Conservation sur gélose inclinée.
- Lyophilisation
- Conservation de longues périodes à la température de l'azote liquide.
- De nombreuses bactéries et champignons sporulés peuvent être conservés sur gel de silice ou billes de verre.

3. Milieux de culture industriels

Les milieux de fermentation doivent répondre à toutes les exigences nutritionnelles du microorganisme et remplir les objectifs techniques du procédé. Les nutriments doivent être formulés pour favoriser la synthèse du produit cible, soit la biomasse cellulaire, soit un métabolite spécifique. Les milieux adoptés dépendent également de l'ampleur de la fermentation. Pour les fermentations de laboratoire à petite échelle, des produits chimiques purs sont souvent utilisés dans des milieux bien définis. Cependant, cela n'est pas possible pour la plupart des procédés de fermentation à l'échelle industrielle, simplement en raison du coût, car les composants du milieu peuvent représenter jusqu'à 60 à 80 % des dépenses du procédé. Les fermentations à l'échelle industrielle utilisent principalement des substrats complexes rentables, où de nombreuses sources de carbone et d'azote sont presque indéfinissables. La plupart sont dérivés de matières végétales et animales naturelles, souvent des sous-produits d'autres industries.

Les principaux facteurs qui affectent le choix final des matières premières individuelles sont les suivants.

- a) Coût et disponibilité : idéalement, les matériaux doivent être peu coûteux, de qualité constante et disponibles toute l'année.
- b) Facilité de manipulation sous forme solide ou liquide, ainsi que les coûts de transport et de stockage associés, par ex. exigences en matière de contrôle de la température.
- c) Exigences de stérilisation et tout problème potentiel de dénaturation.
- d) Caractéristiques de formulation, de mélange et de viscosité qui peuvent influencer l'agitation, l'aération et le moussage pendant la fermentation et les étapes de traitement en aval.
- e) La concentration de produit cible atteinte, sa vitesse de formation et son rendement par gramme de substrat utilisé.
- f) Les niveaux et la gamme d'impuretés, et la possibilité de générer d'autres produits indésirables au cours du processus.
- g) Conséquences globales pour la santé et la sécurité.

3.1.Sources de carbone

Une source de carbone est nécessaire pour toute biosynthèse menant à la reproduction, à la formation de produits et à l'entretien des cellules.

3.1.1. Mélasses

La mélasse, un sous-produit de la production de sucre de canne et de betterave, est une source de saccharose moins chère et plus courante. C'est un sombre sirop visqueux coloré contenant 50 à 60 % (p/v) de glucides, principalement du saccharose, avec 2 % (p/v) des substances azotées, ainsi que des vitamines et des minéraux.

3.1.2. Extrait de malt

Des extraits aqueux d'orge maltée peuvent être concentrés pour former des sirops qui sont des sources de carbone particulièrement utiles pour la culture de champignons filamenteux, de levures et d'actinomycètes. La composition des extraits de malt varie dans une certaine mesure, mais ils contiennent généralement environ 90 % de glucides, sur une base de poids sec. Celui-ci comprend 20% d'hexoses (glucose et de petites quantités de fructose), 55% de disaccharides (principalement du maltose et des traces de saccharose), ainsi que 10% de maltotriose, un trisaccharide. De plus, ces produits contiennent une gamme de dextrines ramifiées et non ramifiées (15 à 20 %), qui peuvent ou non être métabolisées, selon le micro-organisme. Les extraits de malt contiennent également quelques vitamines et environ 5% de substances azotées, protéines, peptides et acides aminés.

3.1.3. Amidon et dextrines

Ces polysaccharides ne sont pas aussi facilement utilisables que les monosaccharides et les disaccharides, mais peuvent être directement métabolisés par des micro-organismes producteurs d'amylase.

3.1.4. Liqueur de résidus au sulfite

Les déchets contenant du sucre provenant de l'industrie papetière sont principalement utilisés pour la culture de levures.

3.1.5. Cellulose

La cellulose se trouve principalement sous forme de lignocellulose dans les parois cellulaires végétales, composée de trois polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Elle est principalement utilisée dans les fermentations sur substrat solide pour produire divers champignons. Cependant, c'est potentiellement une source renouvelable très précieuse de sucres fermentescibles une fois hydrolysés.

3.1.6. Le lactosérum

Le lactosérum est un sous-produit aqueux de l'industrie laitière, largement utilisé dans les fermentations de pénicilline et il est toujours utilisé pour produire de l'éthanol, des protéines unicellulaires, de l'acide lactique, de la gomme xanthane, de la vitamine B12 et de l'acide gibbérélique.

3.1.7. Alcanes et alcools

Les n-alcanes de longueur de chaîne C10-C20 sont facilement métabolisés par certains micro-organismes. Les mélanges, plutôt qu'un seul composé, conviennent généralement mieux aux fermentations microbiennes.

3.1.8. Graisses et huiles

Les graisses animales dures qui sont principalement composées de glycérides d'acides palmitique et stéarique sont rarement utilisées dans les fermentations. Cependant, les huiles végétales (principalement de coton, de lin, de maïs, d'olive, de palme, de colza et de soja) et occasionnellement l'huile de poisson, peuvent être utilisées comme source primaire ou complémentaire de carbone.

3.2. Sources d'azote

La plupart des microbes industriels peuvent utiliser à la fois des sources d'azote inorganiques et organiques.

3.2.1. Liqueur de maïs

La liqueur de maïs est un sous-produit de l'extraction de l'amidon du maïs et sa première utilisation dans les fermentations était pour la production de la pénicilline dans les années 1940. Les extraits concentrés de la liqueur de maïs contiennent généralement environ 4 % (p/v) d'azote, comprenant une large gamme d'acides aminés, ainsi que vitamines et minéraux.

3.2.2. Extraits de levure

Des extraits de levure peuvent être produits à partir de déchets de boulangerie et levure de bière ou d'autres souches de *S. cerevisiae*. Les sources sont *Kluyveromyces marxianus* (anciennement classé comme *K. fragilis*) cultivé sur du lactosérum et *Candida utilis* cultivé avec de l'éthanol, ou des déchets de bois et de papier en traitement. Les extraits utilisés dans la formulation des milieux de fermentation sont normalement des concentrés sans sel des composants solubles des cellules de levure hydrolysées.

3.2.3. Peptones

Les peptones sont généralement trop chères pour les fermentations industrielles à grande échelle. Ils sont préparés par hydrolyse acide ou enzymatique de matières riches en protéines : viande, caséine, gélatine, kératine, arachides, farine de soja, graines de coton, etc.

3.2.4. Farine de soja

Les résidus restant après que les graines de soja ont été transformées pour extraire la majeure partie de leur huile sont composés de 50 % de protéines, 8 % de composés azotés non protéiques, 30 % de glucides et 1 % d'huile.

3.3.Eau

Tous les processus de fermentation, à l'exception des fermentations sur substrat solide, nécessitent de grandes quantités d'eau.

3.4.Minéraux

Parfois, les niveaux d'ions calcium, magnésium, phosphore, potassium, soufre et chlorure sont trop faibles pour répondre aux besoins ceux-ci peuvent être ajoutés sous forme de sels spécifiques.

3.5.Vitamines et facteurs de croissance

De nombreuses bactéries peuvent synthétiser toutes les vitamines nécessaires à partir d'éléments de base. Pour les autres bactéries, champignons filamenteux et levures, ils doivent être ajoutés en complément du milieu de fermentation.

3.6.Précurseurs

Certaines fermentations doivent être complétées par des précurseurs spécifiques, notamment pour la production de métabolites secondaires. Au besoin, ils sont souvent ajoutés en quantités contrôlées et sous une forme relativement pure.

3.7.Inducteurs

Les inducteurs sont souvent nécessaires dans les fermentations de micro-organismes génétiquement modifiés (MGM). En effet, la croissance des MGM peut être altérée lorsque les gènes clonés sont « activés », en raison des niveaux très élevés de leur transcription et de leur traduction. Par conséquent, des systèmes inductibles pour les gènes clonés sont incorporés.

3.8.Inhibiteurs

Les inhibiteurs sont utilisés pour rediriger le métabolisme vers le produit cible et réduire la formation d'autres intermédiaires métaboliques ; d'autres arrêtent une voie à un certain point pour empêcher la poursuite du métabolisme du produit cible.

3.9.Modificateurs de perméabilité cellulaire

Ces composés augmentent la perméabilité cellulaire en modifiant les parois et/ou membranes cellulaires, favorisant la libération des produits intracellulaires dans le milieu de fermentation.

3.10. Antimousses

Les antimousses sont nécessaires pour réduire la formation de mousse pendant la fermentation. La formation de mousse est en grande partie due aux protéines du milieu qui se fixent à l'interface air-bouillon où elles se dénaturent pour former une mousse stable.

4. La conception des fermenteurs

Un fermenteur est un récipient de croissance de micro-organismes qui, tout en ne permettant pas la contamination, permet de réunir les conditions nécessaires à la production maximale des produits recherchés.

4.1. Pièces composantes des bioréacteurs

Les constituants de base d'un réacteur à cuve agitée standard (STR) (figure 5) sont :

- Une unité de base connectée aux composants de la tuyauterie pour le contrôle de la température, l'agitation, le gazage et les ajouts de réactifs.
 - Une cuve de culture avec des raccords et des orifices pour faciliter le transfert de gaz, l'ajout/le retrait de liquide, le mélange, l'échantillonnage et l'installation de capteurs.
 - Équipements périphériques tels que conteneurs de réactifs, capteurs supplémentaires et systèmes spéciaux pour la stérilisation, le refroidissement, la séparation et l'élimination des constituants de la culture
 - Instrumentation pour la mesure et/ou le contrôle des paramètres de processus clés avec des liens vers un logiciel de supervision et une installation de contrôle à distance
- L'exemple utilisé pour illustrer cet aspect est le plus petit et le plus simple de tous les systèmes de fermentation (c'est-à-dire un bioréacteur de paillasse).

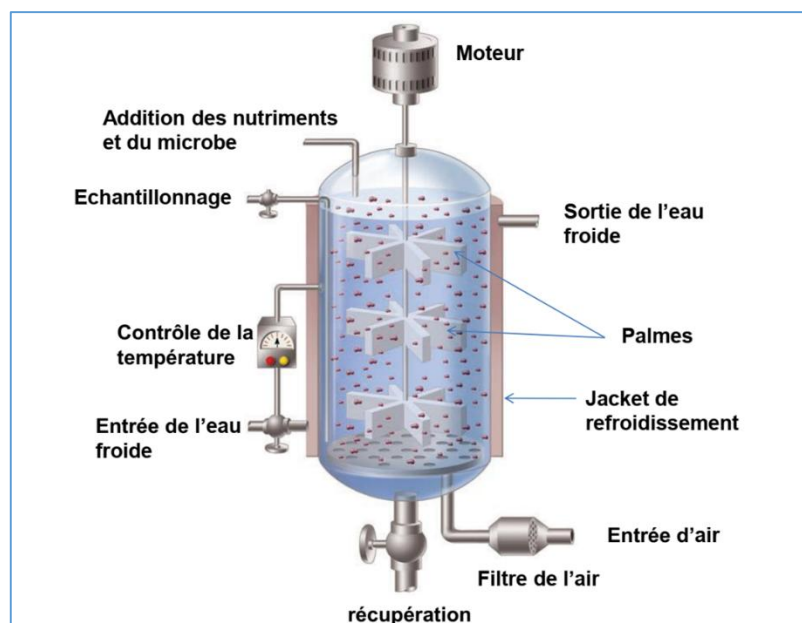


Figure 5 : Réacteur à cuve agitée standard.

4.2. Contrôle de la température

Normalement, dans la conception et la construction d'un fermenteur, il doit y avoir des dispositions adéquates pour le contrôle de la température. La chaleur sera produite par l'activité microbienne et l'agitation mécanique et si la chaleur générée par ces deux processus n'est pas idéale pour le processus de fabrication particulier, il peut alors être nécessaire de chauffer ou de refroidir le système. À l'échelle du laboratoire, peu de chaleur est normalement générée et une chaleur supplémentaire doit être fournie en plaçant le fermenteur dans un bain thermostaté, ou en utilisant des serpentins de chauffage internes ou une enveloppe chauffante à travers laquelle l'eau est diffusée (figure 6). Dès qu'une certaine taille est dépassée, la surface couverte par l'enveloppe chauffante devient trop petite pour évacuer la chaleur produite par la fermentation. Lorsque cette situation se produit, des serpentins internes doivent être utilisés et de l'eau froide est mise en circulation pour atteindre la bonne température.

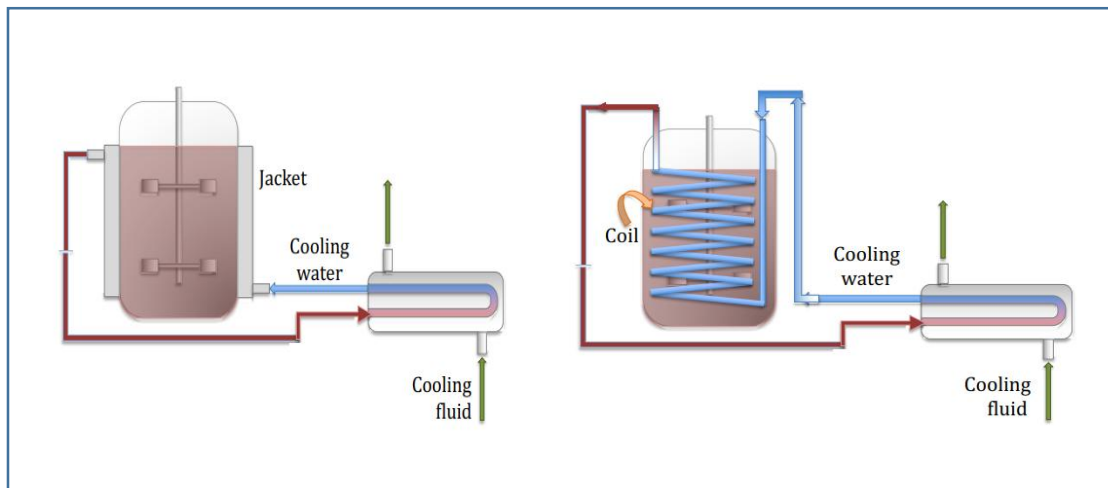


Figure 6 : Système de chauffage par serpentins de chauffage internes ou enveloppe chauffante.

4.3. Agitation et aération

L'air utilisé dans la fermentation est forcé sous pression dans le fond du fermenteur. L'air entre par un sparger qui est un tuyau avec de fins trous (figure 7). Plus les trous sont petits, plus les bulles sont fines et plus l'apport d'oxygène aux micro-organismes est efficace. Les agitateurs avec leurs roues attachées servent à plusieurs fins. Ils aident à répartir l'air entrant sous forme de fines bulles, à mélanger uniformément les organismes, à créer des turbulences locales et à assurer une température uniforme.

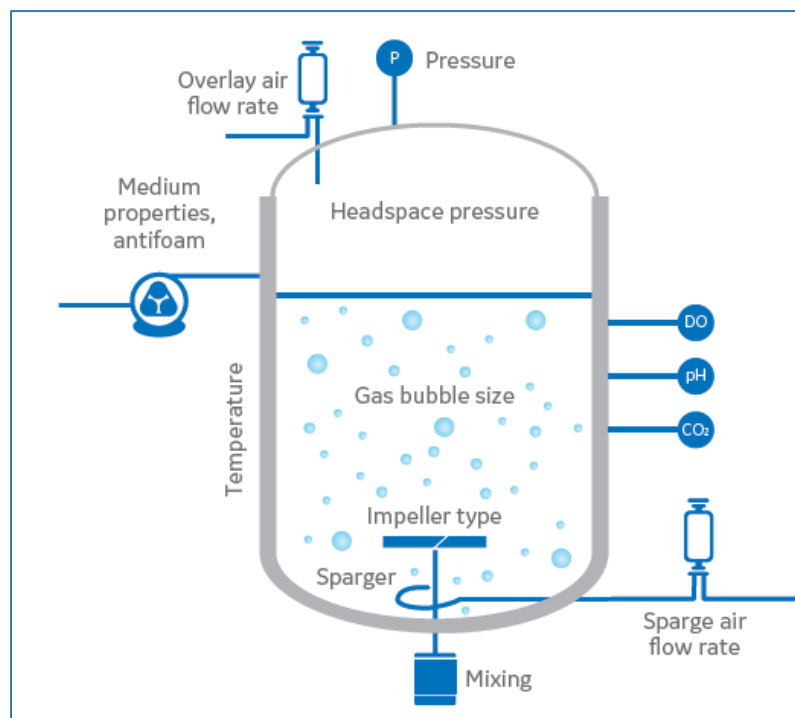


Figure 7 : Système d'aération par sparger

4.4.Ports d'alimentation

Ils sont utilisés pour ajouter des nutriments et des solutions acides ou basiques au fermenteur. Les orifices d'alimentation sont des tubes en silicone.

4.5.Contrôle de la mousse

Le niveau de mousse dans le récipient doit être minimisé pour éviter la contamination, c'est un aspect important du fermenteur. La mousse est contrôlée par deux unités, une détection de mousse et une unité de contrôle. Un dispositif de contrôle de la mousse est monté sur le dessus du fermenteur, avec une entrée dans le fermenteur.

4.6.Utilisation de l'ordinateur dans le fermenteur

Pour une surveillance et une collecte de données efficaces, les fermenteurs sont généralement couplés à des ordinateurs et à des bases de données automatisés et semi-automatisés modernes (figure 8).



Figure 8 : Installation d'un fermenteur.

5. Conduite de fermentation industrielle

La fermentation est dérivée du mot latin « fervere » qui signifie bouillir, un processus qui se manifeste généralement par l'action des levures sur le grain malté. La fermentation pourrait être considérée comme un processus métabolique impliqué dans la conversion du sucre en acides, gaz et/ou alcool.

5.1.Préparation de la fermentation industrielle

Scale up (ou mise à l'échelle) est le transfert du procédé d'un bioréacteur de laboratoire de petit volume à celui d'un bioréacteur industriel à grande échelle.

Le *scale up* s'effectue en plusieurs étapes : de la fiole d'Erlenmeyer au bioréacteur de paillasse, du bioréacteur de paillasse au bioréacteur pilote de laboratoire et du bioréacteur pilote de laboratoire au bioréacteur industriel.

La préparation de la fermentation industrielle passe par plusieurs étapes :

1. Fabrication du milieu de culture ;
2. Stérilisation du bioréacteur et de ses équipements ainsi que du milieu de culture ;
3. Préparation de l'inoculum ;

La croissance des micro-organismes entraîne généralement la production de métabolites, mais un métabolite spécifique nécessite des conditions de culture optimales à un taux de croissance particulier pour une délivrance sûre (figure 9).

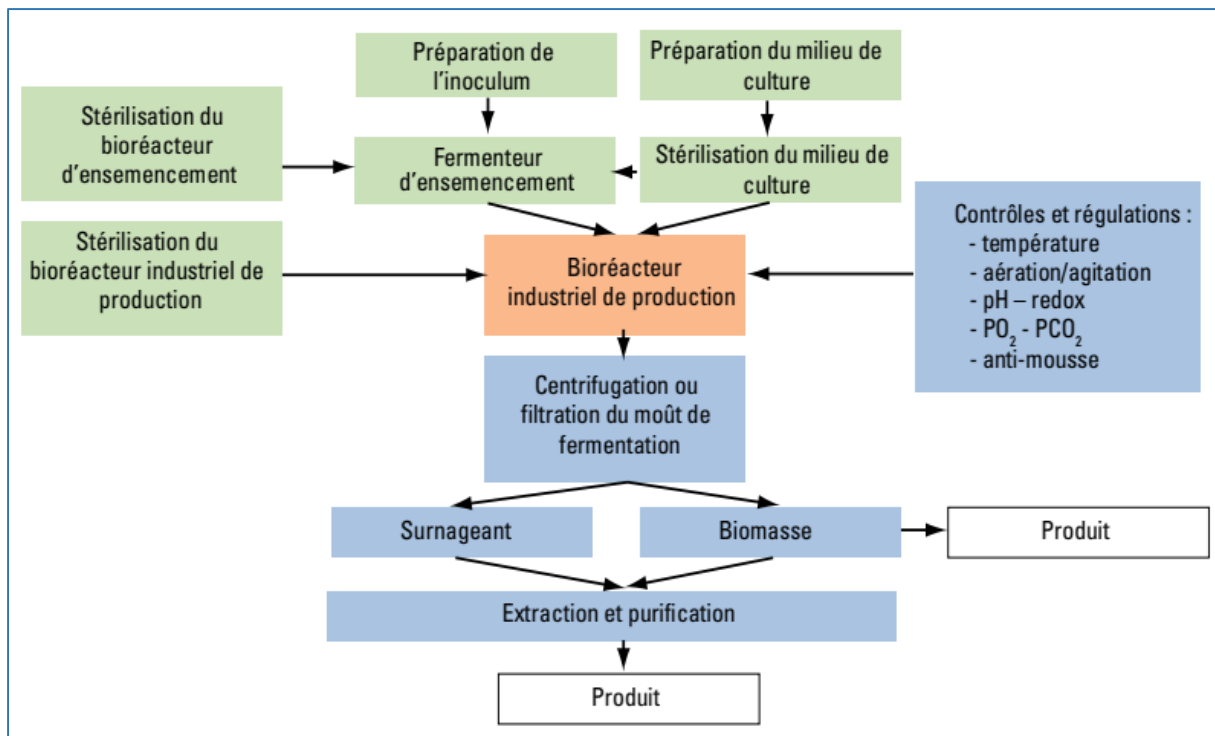


Figure 9 : Les étapes de la fermentation industrielle.

5.2. Les différentes conduites de fermentation

5.2.1. Culture discontinue (en batch)

La culture discontinue est un système de culture fermé qui contient une quantité initiale limitée de nutriments. La culture inoculée passera par un certain nombre de phases, comme illustré dans la figure 10.

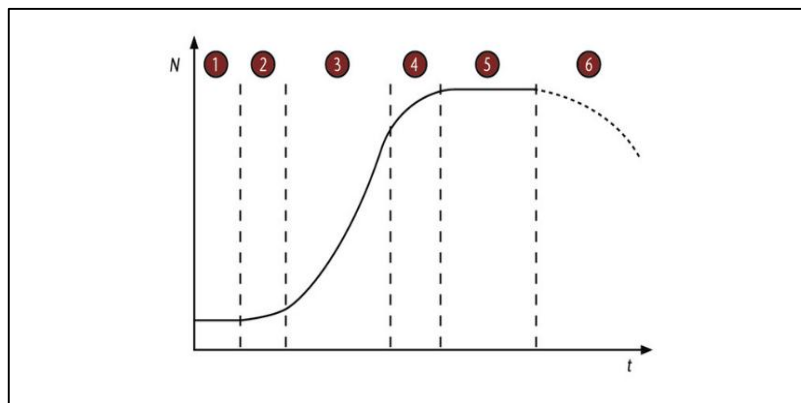


Figure 10 : Graphique illustrant les différentes phases de croissance microbienne dans une culture réalisée en mode discontinu (batch).

- 1 : Phase de latence.
- 2 : Phase d'accélération.
- 3 : Phase de croissance exponentielle.
- 4 : Phase de ralentissement ou de décélération.
- 5 : Phase stationnaire.
- 6 : Phase de déclin.

Les paramètres de la croissance sont aussi appelés constantes de la croissance : **N** : nombre de cellules au temps **t** ; **G** : temps de génération ; **μ** : taux de croissance.

Le temps de génération (G) : Le temps nécessaire au doublement du nombre de cellules : 1 bactérie pour produire 2 bactéries, 4 bactéries pour donner 8 bactéries. Il correspond au temps qui sépare deux divisions successives.

$$G = t/n$$

t : temps connu ; **n** : nombre de division

Le taux de croissance (μ) : Le nombre de divisions effectuées par unité de temps.

$\mu = n / t$: nombre de génération Il exprime la vitesse de multiplication des bactéries.

L'unité est temps⁻¹ : H⁻¹ , min⁻¹

Remarque : Le taux de croissance est l'inverse du temps de génération.

$$\mu = 1 / G$$

5.2.2. Processus de fermentation continue

En fermentation continue, le substrat est ajouté au fermenteur en continu à un taux fixe. Cela maintient les organismes dans la phase de croissance logarithmique. Les produits de la fermentation sont prélevés en continu. La fermentation continue est également appelée chemostat (figure 11).

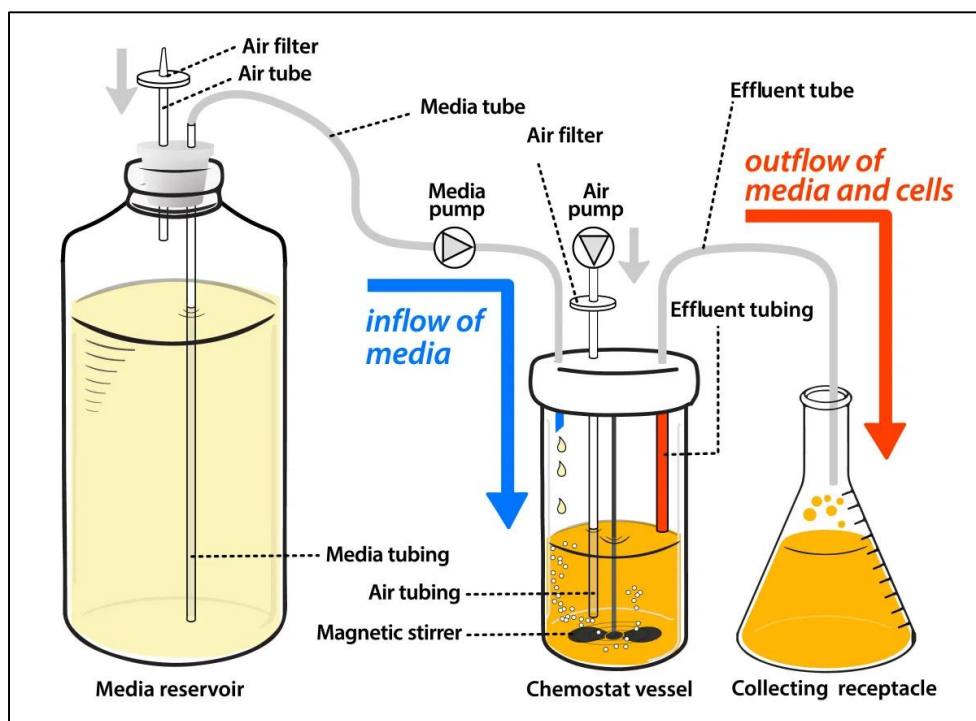


Figure 11 : Principe de la conduite de la fermentation continue.

5.2.2.1. Le mode continu sans recyclage de la biomasse

La fermentation en mode continu débute en système fermé, comme une fermentation en mode discontinu, afin de permettre à la biomasse de croître jusqu'au point où elle produit de façon maximale, soit à la fin de la phase de croissance exponentielle alors que la biomasse est très élevée et que les taux de croissance et de production spécifiques sont maximaux. Lorsque ce point de la croissance 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.

5.2.2.2. Le mode continu avec recyclage de la biomasse

Dans une fermentation en mode continu, le taux de dilution de la culture est limité par le taux de croissance spécifique maximal ($\mu_{\max}$) du microorganisme. De plus la concentration en biomasse ne peut pas être augmentée puisque les cellules sont soutirées du réacteur au même rythme qu'elles sont formées.

5.3. Culture Fed-Batch

Lorsqu'une culture discontinue est en conduite alimentée du milieu nutritif frais sans enlever la culture microbienne en croissance, on parle de culture fed-batch. La culture fed-batch permet de compléter le milieu avec des nutriments qui sont épuisés ou qui peuvent être nécessaires pour les stades terminaux de la culture, par exemple, production de métabolites secondaires. La fermentation fed-batch peut être de trois types :

- **Culture Fed Batch à volume variable** : Le même milieu est ajouté entraînant une augmentation de volume.
- **Culture Fed Batch à Volume Fixe** : Une solution très concentrée du substrat limitant est ajoutée à un très peu de quantité entraînant une augmentation insignifiante du volume de milieu.
- **Culture Fed Batch cyclique** : Au cours de ce processus, lorsque la fermentation atteint la phase stationnaire et qu'il n'y a pas de changements significatifs dans la croissance des cellules (soit en raison de l'épuisement du substrat ou de l'inhibition du produit), une certaine quantité de bouillon usé du fermenteur est retirée, suivie de l'ajout de milieu nutritif frais. Avec cette élimination et cet ajout, la concentration du substrat augmente dans le fermenteur, ce qui entraîne une augmentation du taux de croissance spécifique.

6. Les protéines d'organismes unicellulaires

Le développement de la production de protéines unicellulaires (P.O.U) a permis de fournir un substitut alimentaire riche en protéines. La population mondiale croissante est confrontée à des problèmes de carence en protéines en raison de la pénurie alimentaire. Pour cette raison, en 1996, de nouvelles sources, principalement des bactéries, des levures, des champignons et des algues, ont été utilisées pour produire de la biomasse protéique appelée SCP (figure 12).

La production impliquait un grand nombre de différents types de substrats et différents micro-organismes. Le terme (P.O.U) a été inventé en 1966 par Carol L. Wilson. Les (P.O.U) sont des cellules séchées de micro-organismes, qui sont utilisées comme suppléments protéiques dans l'alimentation humaine ou animale. En plus de la teneur élevée en protéines (environ 60 à 82 % du poids des cellules sèches), le (P.O.U) contient également des lipides, des glucides, des acides nucléiques, des vitamines et des minéraux. Un autre avantage du (P.O.U) est qu'il est riche en certains acides aminés essentiels comme la lysine et la méthionine.

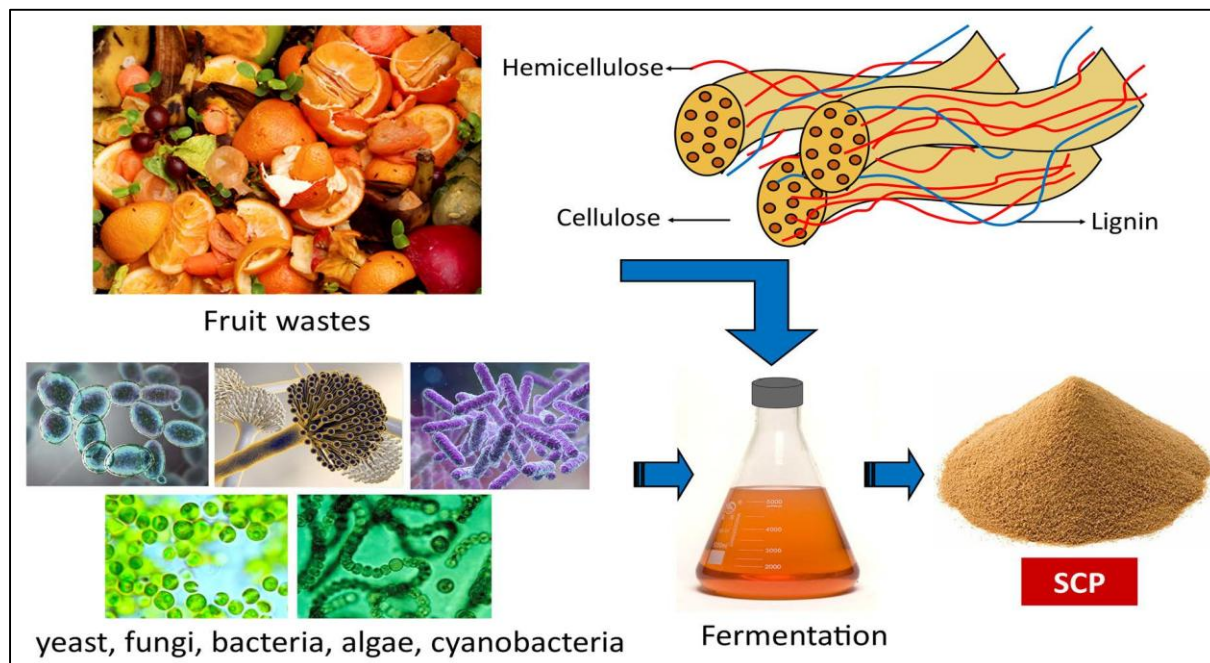


Figure 12 : Principe de la production des (P.O.U).

6.1. Production de P.O.U

6.1.1. Les conditions de culture

Le rapport idéal pour les différentes sources de carbone, d'azote et de phosphore, entrant dans la composition de milieu de culture pour la production des P.O.U, doit être égal à (100/5/1). La température d'incubation est généralement comprise entre 30 et 35 °C, selon le microorganisme, alors que le pH doit être maintenu entre 4.0 et 5,5. Un paramètre critique est la concentration en oxygène dissout. Pour des fermentations aérobies, le milieu devrait être saturé à 40 % en oxygène.

Le (P.O.U) peut être produit en utilisant différents substrats tels que les déchets agricoles, les déchets d'agrumes, la liqueur résiduaire au sulfite, la mélasse, le fumier animal, le lactosérum, l'amidon et les eaux usées (Tableau 1).

Tableau 1 : Sous-produits agricoles et industriels et leur utilisation pour produire des P.O.U.

Source	Catégorie	Exemple de sous-produit	Exemple d'espèces
Agriculture	Sources riches en mono et disaccharides	Mélasse , Lactosérum Déchets de banane	<i>Scenedesmus acutus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i>
	Sources riches en amidon	Son de blé, Son de riz Jus de feuilles	<i>Candida utilis</i>, <i>Rhizopus oligosporous</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Torula utilis</i>
	Sources riches en polysaccharides	Coque de soja Transformation de l'amidon de pomme de terre, Orange (pulpe, jus, écorce), Déchets de chou chinois, Drêches de brasserie, Déchets de carapaces de crevettes	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Rhodococcus opacus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Candida sp</i>
	Sources riches en protéines ou en lipides	Eaux usées, Déchets de poudre de capsicum Corne de bœlier Tourteau de soja	<i>Spirulina maxima</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilus</i>
	Sources riches en polymères	Eaux usées de sulfite Déchets de papier Résidus de lignine Eaux usées de feuilles de caoutchouc latex	<i>Methylomonas sp.</i> <i>Bacteria isolated from soil</i> <i>Bacteria isolated from soil</i> <i>Methylococcus capsulatus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>BP yeast</i> <i>Methylophilus methylotrophus</i>
Industries	Composés riches en carbone	Méthane Acide acétique Acide formique Gaz résiduels Glycérol Gazole Méthanol	<i>Methylomonas sp.</i> <i>Bacteria isolated from soil</i> <i>Bacteria isolated from soil</i> <i>Methylococcus capsulatus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>BP yeast</i> <i>Methylophilus methylotrophus</i>
	Sources de microorganismes photosynthétiques	Effluents d'eaux usées salines Effluents d'usines de biogaz Effluents des eaux usées	<i>Chlorella salina</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Micractinium</i>, <i>Scenedesmus</i> <i>Oocystis</i>, <i>Franceia</i> <i>Euglena</i>

6.1.2. Le choix du microorganisme

Le choix du microorganisme pour la production de P.O.U dépend de nombreux critères tels que la vitesse de croissance, et la possibilité de sa culture sur une gamme large de matériaux. Les autres critères peuvent être nutritionnels (valeur énergétique, teneur en protéines et équilibre en acides aminés) et techniques (type de culture, type de séparation et besoins nutritionnels).

Les micro-organismes souhaités doivent être cultivés sur le milieu dans des conditions stériles. Ils doivent avoir les propriétés suivantes :

- Non pathogène pour les plantes, les humains et les animaux,
- Utilisable comme denrées alimentaires et aliments pour animaux,
- Doit avoir de bonnes valeurs nutritionnelles,
- Ne pas contenir de composés toxiques,
- Le coût de production doit être faible.

6.2. Les micro-organismes utilisés pour la production de P.O.U et leurs propriétés

Plusieurs types de microorganismes peuvent être utilisés pour la production des P.O.U (tableau 2). Cependant l'utilisation de micro-organismes pour la production présente à la fois des avantages et des inconvénients.

Tableau 2 : Microorganismes utilisés pour la production de P.O.U.

Bactéries	Algues	Levures	Champignons
<i>Brevibacterium</i>	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Chaetomium celluloliticum</i>
<i>Methylophilus methylitropus</i>	<i>Chlorella sorokiana</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Acromobacter delvaeate</i>	<i>Chondrus crispus</i>	<i>Candida novellas</i>	<i>Aspergillus fumigates</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Scenedus musacutus</i>	<i>Candida intermedia</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Lactobacillus species</i>	<i>Porphyrium sp</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Rhizopus chinensis</i>
<i>Cellulomonas species</i>	<i>Spirulina maxima</i>		<i>Tricoderma viridae</i>

6.2.1. Les bactéries

Ils sont généralement riches en protéines et possèdent un taux de croissance plus rapide. Les inconvénients comprennent la petite taille des cellules bactériennes et la faible densité qui affecte la récolte de la biomasse, ce qui augmente finalement le coût d'exploitation. La teneur en acide nucléique est assez élevée chez les bactéries qui ont tendance à augmenter le niveau d'acide urique dans le sang humain lors de la consommation.

6.2.2. Les levures

La plus grande taille de levure facilite la récolte du produit. La faible teneur en acide nucléique, la teneur élevée en lysine et la capacité à se développer à un pH acide sont les avantages supplémentaires de la levure. Malgré cela, la levure a un taux de croissance plus faible, une faible teneur en protéines et une faible teneur en méthionine, par rapport aux bactéries.

6.2.3. Les champignons

Les champignons filamenteux sont faciles à récolter, mais ils ont une faible productivité, en raison de leur faible taux de croissance et de leur faible teneur en protéines.

6.2.4. Les algues

Depuis l'Antiquité, la spiruline était cultivée par les peuples près du lac Tchad en Afrique et les Aztèques près de Texcoco au Mexique. Ils l'ont utilisé comme nourriture après l'avoir séché. La spiruline est l'algue la plus utilisée à tel point que même les astronautes l'emmènent dans l'espace lors de leurs voyages spatiaux. L'algue est utilisée comme aliment de différentes manières et ses avantages incluent une culture simple, une utilisation efficace de l'énergie solaire, une croissance plus rapide et une teneur élevée en protéines.

Les algues contiennent des parois cellulaires cellulosiques difficiles à digérer par l'homme. Il existe également des risques de concentration de métaux lourds dans le produit, lorsque des algues sont utilisées dans le milieu.

6.3. Valeur nutritionnelle des P.O.U

- Les P.O.U de levure et de champignons ont un rapport élevé de protéines (50% à 55% de protéines) et de glucides.
- Contient plus de lysine moins de méthionine et de cystéine.
- Contient un bon équilibre en acides aminés,
- Contient des vitamines et une teneur élevée en vitamine B et convient mieux comme aliment pour volaille.
- Certaines souches sont aux propriétés probiotiques.

Tableau 3 : Teneur des micro-organismes en protéines et en acides nucléiques.

Microorganisme	% de protéines	% des acides nucléiques
bactéries	50-85	10-16
levures	54-55	5-12
champignons	30-55	3-10
algues	45-65	4-6

6.4.Séparation et traitement en aval

Les cellules sont séparées du milieu utilisé par filtration ou centrifugation et peuvent être traitées afin de réduire le niveau d'acides nucléiques. Cela implique souvent un choc thermique pour inactiver les protéases cellulaires. L'activité RNase est conservée et dégrade l'ARN en nucléotides qui diffusent hors des cellules. Selon le milieu de croissance utilisé, une purification supplémentaire peut être nécessaire, comme un lavage au solvant, avant la pasteurisation, la déshydratation et le conditionnement.

6.5.Limites des P.O.U

- La concentration élevée d'acides nucléiques, qui est de 6 à 10 %, élève les taux sériques d'acide urique et devient une cause de formation de calculs rénaux.
- Environ 70 à 80% de l'azote total est présent dans les acides aminés, tandis que le reste se produit dans les acides nucléiques, et cette concentration d'acides nucléiques est supérieure à la protéine conventionnelle, caractéristique de tous les organismes à croissance rapide.
- Un autre problème est la présence de paroi cellulaire non digestible. Dans le cas des algues et des levures, il peut y avoir une couleur et des saveurs inacceptables,
- Les cellules des organismes doivent être tuées avant la consommation,
- Il y a un risque de réaction cutanée due à la prise de protéines étrangères et des réactions gastro-intestinales peuvent se produire entraînant des nausées et des vomissements.
- La production de P.O.U a également gagné moins d'importance en raison du manque d'acceptabilité du P.O.U en tant que complément nutritif.

6.6.Le processus BEL

L'industrie laitière mondiale génère plus de 80 millions tonnes de lactosérum chaque année. Ce sous-produit du fromage contient environ 45 g/L de lactose et 10 g/L de protéines. Il est particulièrement adapté à la production de SCP utilisant de la levure utilisant du lactose, pour produire une protéine, Protibel, qui est utilisé à la fois pour la consommation par l'homme et les animaux.

6.7.Le processus SYMBA

Le procédé Symba a été développé en Suède pour produire SCP pour l'alimentation animale à partir des déchets de transformation de la pomme de terre ou l'amidon.

6.8.Le processus PEKILO

Ce procédé a commencé de fonctionner en 1975 et a été le premier procédé commercial fonctionnant en continu pour la production d'un champignon filamenteux. Le procédé a été mis au point en Finlande pour l'utilisation de la liqueur de sulfite usée, Ce processus continu est opéré de manière aseptique et produit plus de 10 000 tonnes de SCP Protéine Pekilo contenant jusqu'à 59 % de protéine, est utilisé dans la préparation d'aliments pour animaux.

6.9.Le processus BIOPROTÉINE

Le procédé Bioprotéine, développé dans les années 1990 par Norferm, utilise du gaz naturel riche en méthane comme seule source de carbone et d'énergie pour la croissance de *Methylococcus capsulatus*. Le produit final contient 70 % de protéines et est actuellement commercialisé sous le nom de Pronin. Il est approuvé dans l'UE pour une utilisation en tant que aliments pour poissons et animaux.

7. Les produits de fermentations industrielles

7.1.Les acides aminés

Plusieurs acides aminés sont produits en quantités industrielles via des procédés de fermentation directe utilisant des souches microbiennes surproductrices, ou par biotransformation microbienne. Ils sont principalement utilisés comme compléments alimentaires et composés aromatiques. Cependant, plusieurs acides aminés ont également des utilisations pharmaceutiques et cosmétique, et dans l'industrie chimique pour la fabrication de polymères. **Ex : Acide l-glutamique, L-Lysine, L-Thréonine, L-Tyrosine, L-Valine.**

Tableau 4 : Microorganismes producteurs d'acides aminés.

Acides aminés	Microorganismes producteurs
Acide aspartique	<i>Bacillus megaterium, Pseudomonas</i>
Alanine	<i>Pseudomonas, Corynebacterium</i>
Arginine	<i>Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum</i>
Acide glutamique	<i>Brevibacterium, Micrococcus</i>
Méthionine	<i>Corynebacterium glutamicum, Candida, Rhodotorula</i>
Lysine	<i>Corynebacterium sp, Saccharomyces, Candida</i>
Tryptophane	<i>Bacillus subtilis</i>

7.2. Les acides organiques

Une large gamme d'acides organiques a été produite à l'aide de micro-organismes (tableau 5). Les acides acétique, citrique, gluconique et lactique sont les principaux acides organiques à application commerciale en tant que produits chimiques, dont au moins certains sont produits industriellement par fermentation. D'autres comprennent les acides pyruvique, fumarique, succinique, glycérique, propionique et itaconique. La production a été améliorée par mutation classique, par des techniques de criblage et de sélection, ainsi que par l'ingénierie métabolique. Le marché mondial des acides organiques a atteint 1,5 milliard de dollars.

Tableau 5 : Microorganismes producteurs d'acides organiques.

Acides organiques	Microorganismes producteurs
Acide acétique	<i>Gluconacetobacter, Acetobacter, Acetobacter aceti ssp. xylinium</i>
Acide citrique	<i>Aspergillus nige, Candida</i>
Acide lactique	<i>Lactobacillus sp.</i>
Acide pyruvique	<i>Torulopsis glabrata, Saccharomyces cerevisiae</i>
Acide fumarique	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Acide succinique	<i>Actinobacillus succinogenes</i>
Acide propionique	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>

7.3. Les Biogaz (H₂, CH₄)

Le biogaz est une source d'énergie renouvelable prometteuse, formé d'un mélange de gaz (CH₄, CO₂, H₂S, H₂,), il est produit à partir de la dégradation biologique de la matière organique par une communauté microbienne méthanogène (*Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanothrix*, ...) dans des conditions anaérobies. Ce processus peut s'effectuer dans des digesteurs continus ou discontinus où plusieurs paramètres physicochimiques (température, pH) sont contrôlés, ce qui permet d'optimiser le déroulement de la digestion anaérobie. Le biogaz issu de la digestion anaérobie doit être épuré selon le mode de valorisation envisagé (thermique, électrique...) pour l'obtention de méthane pur qui constitue un composé énergétiquement intéressant.

7.4. Les vitamines

Les microorganismes prototrophes sont capables de synthétiser tous les facteurs de croissance, et en particulier toutes les vitamines dont ils ont besoin (panthoténate, pyridoxine, biotine, thiamine, acide folique, acide lipoïque, nicotinamide, riboflavine, cyanocobalamine, précurseurs des vitamines A, C, D, vitamine K, coenzyme Q, inositol...).

Certaines de ces productions ont un grand intérêt industriel, comme la vitamine B₂ ou riboflavine et surtout la vitamine B₁₂ ou cyanocobalamine dont la seule source est microbienne. En outre, le β -carotène, précurseur de la vitamine A, est souvent préparé par voie microbiologique.

7.5. Les vaccins

7.5.1. Production d'anatoxines bactériennes

De nombreuses clostridies provoquent des maladies chez l'homme et les animaux par la production d'exotoxines. (*Cl. tétani* – tétanos, *Cl. botulique* – botulisme, *Cl. welchii* - gangrène gazeuse)

Les aérobies peuvent également provoquer des maladies par la production d'exotoxines (*Corynebacterium*). Il est possible de collecter les toxines ainsi produites dans des extraits acellulaires issus d'une culture in vitro. La toxine peut ensuite être inactivée par traitement au formaldéhyde. Ces toxines inactivées connues sous le nom d'anatoxines peuvent amener le corps à produire des anticorps

7.5.2. Production de vaccins bactériens tués

La biomasse produite par fermentation est tuée généralement par la chaleur. Pour les bactéries non sporulées, un traitement à 60°C pendant une demi-heure est généralement suffisant.

7.6. Production d'éthanol et de composés associés

7.6.1. Production d'éthanol

L'éthanol est un métabolite primaire produit par fermentation de sucre ou d'un polysaccharide qui peut être dépolymérisé en un sucre fermentescible. *S. cerevisiae* est utilisé pour la fermentation des hexoses, alors que les espèces *Kluyveromyces fragilis* ou *Candida* peuvent être utilisées si le lactose ou un pentose, respectivement, est le substrat.

Dans des conditions optimales, *Clostridium thermocellum*, un thermophile anaérobie, peut convertir les déchets de cellulose et de cellulose cristalline directement en éthanol

E. coli a été converti en un excellent producteur d'éthanol en clonant et en exprimant l'alcool déshydrogénase et les gènes de pyruvate décarboxylase de *Zymomonas mobilis* et *Klebsiella oxytoca*.

7.6.2. Production de Glycérol

Le glycérol est largement utilisé dans la fabrication de médicaments, d'aliments, de produits cosmétiques, de peintures et de nombreux autres produits.

7.6.3. Production de 1,3-propanediol

Une souche de *Clostridium butyricum* convertit le glycérol en 1,3-propanediol (PDO) dans une fermentation continue.

7.7. Antibiotiques

La production de **la pénicilline** se fait maintenant par *Penicillium chrysogenum* sur divers déchets, y compris la mélasse, la liqueur de maïs, les déchets de l'industrie sucrière et du maïs.

Les céphalosporines ont en général un spectre plus large que les pénicillines. La première céphalosporine a été découverte en 1948 et a été produite par *Cephalosporium acremonium*. Il a été démontré que l'organisme produisait en fait cinq antibiotiques. La céphalosporine est maintenant connue pour être produite par les champignons et les actinomycètes. **Les céphamycines** sont produites par *Streptomyces lipmanni* et *S. clavuligenis*.

Acide clavulanique

Acide clavulanique, céphalosporines et la pénicilline N sont produites par des souches de *Streptomyces clavuligerus*.

7.8. Polysaccharides

Plusieurs micro-organismes produisent des exopolysaccharides.

- Les alginates formés par les espèces *Pseudomonas* et *Azotobacter vinlandii* peuvent être utilisés comme agents d'encollage dans le papier et les textiles, ou comme stabilisants alimentaires.
- Le b-1,4 glucane, formé par *Acetobacter xylinum* est utilisé comme additif alimentaire.
- Les dextranes sont des glucanes ramifiés courts produits par plusieurs micro-organismes, dont *Leuconostoc mesenteroides*

8. Les enzymes industrielles

8.1.Introduction

L'utilisation des enzymes sous leurs principales formes (préparation enzymatique ou purifiée) connaît son essor essentiellement au XXe siècle. Le développement et la maîtrise des procédés d'extraction des enzymes de toutes les cellules à savoir microbienne, végétales et animale ont permis les diverses utilisation largement connues aujourd'hui. Les industries alimentaires, pharmaceutiques et chimiques sont les principaux utilisateurs d'enzymes.

Les tableaux ci-dessous résument quelques applications industrielles de certaines enzymes courantes.

Tableau 6 : Applications d'enzymes industrielles.

Enzyme	Application	Secteur
Protéase	Dégradation des protéines	Détergents
Cellulase	Dégradation du cellulose	Détergents
Lipase	Dégradation des lipides	Détergents
Amylase	Dégradation de l'amidon	Détergents
Amylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucoamylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucose Isomérase	Production du sirop de glucose à haute teneur en fructose	Traitement de l'amidon
Xylanase	Améliorer l'assimilation des nutriments chez les volailles	Aliments pour animaux
Phytases	Améliorer la disponibilité des nutriments	Aliments pour animaux
Protéases	Améliorer la digestion des protéines	Aliments pour animaux
Xylanase	Élimination du lignine « blanchiment biologique »	Papeterie
Arabinanase	Élimination du trouble après macération	Traitement des fruits et légumes
Amylase	Élimination du trouble d'amidon dans les jus	Traitement des fruits et légumes
Polygalacturonanase	Augmenter le rendement en jus	Traitement des fruits et légumes
Hydrolases	Casser les gels de biopolymères	Gaz et pétrole
Chymosine	Caillage lors de la production de fromages	Produits laitiers
Uréease	Élimination de l'urée	Vin
Pectinase	Augmenter le rendement en jus	Vin
Protéase	Attendrissement des viandes	Boucherie
Amylase	Désencollage	Textiles
Amylase	Contrôle de procédé	Boulangerie
Beta-glucanase	Éviter les problèmes de filtration	Bière
Protéase	Augmenter le rendement de surface	Tannerie

8.2. Préparation des enzymes

8.2.1. Le choix d'un microorganisme producteur de l'enzyme

Seules les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu une expansion significative, et sont préparées industriellement, car les microorganismes présentent de nombreux avantages comme source d'enzymes : croissance exponentielle et la disponibilité. Dans les secteurs non alimentaires (chimie, diagnostic, analyses diverses...), le choix des souches n'est pas soumis aux mêmes contraintes. De façon générale, les micro-organismes sont sélectionnés selon les principaux critères suivants :

- Fournir une bonne production d'enzymes.
- En un minimum de temps
- Les enzymes extracellulaires (généralement des hydrolases) sont préférables aux endocellulaires (dont l'extraction est difficile à réaliser).
- La souche doit pouvoir se développer sur des substrats moins coûteux.

8.2.2. Milieux de la production des enzymes

Les milieux de productions sont soit des milieux synthétiques ou complexes. Les matières premières apportant les éléments nutritifs (énergie, carbone, azote, phosphore, soufre, vitamines...)

Les fermenteurs utilisés atteignent des volumes de 100 à 200 m³, la fermentation dure de 30 à 150 heures. Elle se fait dans un milieu riche, où les paramètres physico chimiques sont régulés en continu : oxygène, pH, température, moussage (réduit par l'addition d'anti-mousse). De plus, la mesure de l'activité enzymatique est effectuée à intervalles réguliers.

8.2.3. Méthodes d'extraction et de purification des enzymes

L'enzyme produite peut être excrétée dans le milieu de culture (enzymes extracellulaires) ou peut être présente dans les cellules (enzymes intracellulaires). Selon l'exigence, l'enzyme commerciale peut être brute ou très purifiée. En outre, elle peut être sous forme solide ou liquide.

8.2.3.1. Extraction des enzymes

L'extraction désigne l'action de séparer une enzyme du composé dont elle fait partie. Cette méthode consiste à libérer l'enzyme de la cellule par éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire par des procédés physique ou chimique.

En général, l'extraction d'une enzyme extracellulaire présente dans le bouillon est relativement plus simple par rapport à une enzyme intracellulaire. Pour la libération d'enzymes intracellulaires, des techniques spéciales sont nécessaires pour la perturbation

cellulaire. Les cellules microbiennes peuvent être décomposées par des moyens physiques (sonication, haute pression, perles de verre) ou chimiques (solvants organiques). Les parois cellulaires des bactéries peuvent être lysées par l'enzyme lysozyme. Pour les levures, on utilise l'enzyme β -glucanase.

8.2.3.2. Purification des enzymes

La purification est un ensemble d'opérations visant à enlever toutes les impuretés d'un extrait brut contenant l'enzyme d'intérêt. En principe, n'importe quelle méthode destinée au fractionnement de protéines peut être employée pour la purification d'enzymes.

Les étapes de la purification (séparation)

Les étapes de récupération et de purification (brièvement décrit ci-dessous) seront les mêmes pour les enzymes intracellulaires et extracellulaires, une fois que les cellules sont perturbées et que les enzymes intracellulaires sont libérées. La considération la plus importante est de minimiser la perte de l'activité enzymatique souhaitée.

- a) **Enlèvement des débris cellulaires** : La filtration ou la centrifugation peuvent être utilisées pour éliminer les débris cellulaires.
- b) **Enlèvement des acides nucléiques** : Les acides nucléiques interfèrent avec la récupération et la purification des enzymes. Ils peuvent être précipités et éliminés en ajoutant des substances spécifiques comme les polyamines.
- c) **Précipitation enzymatique** : Les enzymes peuvent être précipitées en utilisant des sels (sulfate d'ammonium) ou solvants organiques (isopropanol, éthanol et acétone). La précipitation est avantageuse puisque l'enzyme précipitée peut être dissoute dans un volume minimal pour concentrer l'enzyme.
- d) **Séparation par chromatographie** : Il existe plusieurs techniques chromatographiques pour la séparation et la purification des enzymes. Ceux-ci comprennent l'échange d'ions, l'exclusion de taille, l'affinité et l'interaction hydrophobe. Parmi ceux-ci, la chromatographie d'échange d'ions est la plus couramment utilisée pour la purification enzymatique.

8.1.1.1. Conservation des enzymes

La forme concentrée de l'enzyme peut être obtenue par séchage. Cela peut se faire par des évaporateurs ou des lyophilisateurs. L'enzyme séchée peut être emballée et commercialisée. Pour certaines enzymes, la stabilité peut être obtenue en les gardant dans des suspensions de sulfate d'ammonium.

Toutes les enzymes utilisées dans les aliments ou les traitements médicaux doivent être de pureté élevée. Ces enzymes doivent être totalement exemptes de substances toxiques, de microorganismes nuisibles et ne doivent pas provoquer de réactions allergiques.

8.2. Les enzymes immobilisées

Pour compenser les problèmes liés à l'instabilité des enzymes au cours de l'extraction ou de l'utilisation, il est nécessaire de les immobiliser artificiellement. Ainsi immobilisées, sur des supports solubles ou insolubles ces catalyseurs offrent la possibilité d'une utilisation répétée.

Enzyme immobilisée : Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en **surface ou à l'intérieur** d'un support solide.

On cherche généralement à conserver son activité enzymatique, qui a tendance :

- ✓ à diminuer après immobilisation du fait de possibles gênes stériques et de limitations dans l'accessibilité au site actif.
- ✓ à augmenter sa stabilité dans le temps.

8.3. Applications des enzymes immobilisées

Grâce à leur grande spécificité d'action (biospécificité), les enzymes immobilisées constituent un outil de fabrication et d'analyse important dans de nombreux secteurs, médical, la recherche le contrôle et de la production industrielle de métabolites.

8.3.1. Applications analytiques

En médecine, des papiers imprégnés de solutions enzymatiques sont utilisés dans certains tests cliniques (dosage du cholestérol, de l'acide urique, des hormones...). Les techniques ELISA utilisent également des enzymes fixées (liées à des anticorps eux-mêmes fixés par adsorption sur les parois de petites cuvettes en plastiques), destinées à des dosages cliniques.

8.3.2. Applications thérapeutiques

Le traitement de certains troubles pathologiques (dus à une déficience enzymatique) par l'administration d'enzymes se heurte à des difficultés : destruction par les protéases ou hydrolyse par les macrophages. Dans ce cas l'enzyme est associée à une molécule protectrice (albumine, dextrane, polyéthylène-glycol), ou alors incluse dans des microcapsules.

8.3.3. Applications agro-alimentaires

L'utilisation des enzymes immobilisées dans le domaine agro-alimentaire vise l'exploitation des propriétés catalytiques des enzymes, le contrôle, l'inhibition des enzymes qui peuvent altérer la qualité organoleptique des aliments ou des constituants alimentaires, l'Amélioration des propriétés de boissons alimentaires: viscosité, clarification, digestibilité, goût et l'amélioration de la production de produits lactés.

Références bibliographiques

- **Baltz, R.H., Davies, J.E., Demain, A.L., (2010a).** Manual Of Industrial Microbiology And Biotechnology. *American Society for Microbiology*. Ed 3, Reference Manual, ASM Press. ASM Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.1128/9781555816827>
- **Baltz, R.H., Demain, A.L., Davies, J.E., (2010b).** Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. *American Society for Microbiology Press*.
- **Benson, H.J., (2007).** Benson's Microbiological Applications: General Microbiology, Complete Version, Lab Manual edition. Ed. *McGraw-Hill Science Engineering*, Boston.
- **Doran, P.M., (2013).** Bioprocess Engineering Principles. Academic Press.
- **El-Mansi, E.M.T., Bryce, C. F. A., Demain, L., Allman, A.R., (2011).** Fermentation Microbiology and Biotechnology. Ed3 edn. *Boca Raton: CRC Press*. <https://doi.org/10.1201/b11490>.
- **Glazer, A.N., Nikaido, H., (2007).** Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. Cambridge University Press.
- **Kumar, P., Singh, J., (2024).** Industrial Microbial Bioprocess Development: Strategies, Applications, Environmental Management, and Challenges, Verma, P. (Ed.), *Industrial Microbiology and Biotechnology: A New Horizon of the Microbial World*. Springer Nature, Singapore, pp. 3–34. https://doi.org/10.1007/978-981-97-6270-5_1
- **Lang, J., (2022).** Principles of Fermentation Technology. Larsen and Keller Education.
- **Okafor, N., (2017).** Modern Industrial Microbiology and Biotechnology, Ed2. *Taylor & Francis*.
- **Okafor, N., (2016).** Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. CRC Press.
- **Okafor, N., Okeke, B.C., (2017).** Modern Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/b22421>
- **Schwan, R.F., Joshi, V.K., Dias, D.R., (2024).** Bioreactor Technology in Food Processing. CRC Press.
- **Singh, J., Vyas, A., Wang, S., Prasad, R. (Eds.), (2020).** Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications, Environmental and Microbial Biotechnology. Springer, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-2817-0>
- **Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., (2013).** Principles of Fermentation Technology. Elsevier.
- **Ulín, M., (2011).** Fermentation Microbiology and Biotechnology.
- **Waites, M.J.; Morgan, N.L.; Rockey, J.S.; Higton, G., (2001).** Industrial Microbiology: An Introduction; Wiley: Hoboken, NJ, USA.
- **Yadav, H., Singh, S., Sinha, R., (2024).** Fermentation Technology for Microbial Products and Their Process Optimization, in: Verma, P. (Ed.), *Industrial Microbiology and Biotechnology: A New Horizon of the Microbial World*. Springer Nature, Singapore, pp. 35–64. https://doi.org/10.1007/978-981-97-6270-5_2