

Microbiologie industrielle

La **microbiologie industrielle** utilise des micro-organismes, cultivés à grande échelle soit pour élaborer des produits à valeur ajoutée, soit pour effectuer des étapes chimiques difficiles par des procédés qui sont en fait des améliorations de *réactions métaboliques* déjà accomplies par des micro-organismes. Le but est dans la majorité des cas de surproduire le produit visé. À ce titre, la microbiologie industrielle diffère de la biotechnologie qui, souvent, procède à des manipulations génétiques pour faire engendrer un nouveau produit au micro-organisme. La biocatalyse décrit les réactions effectuées par les microorganismes en microbiologie industrielle. Dans ce chapitre, nous décrirons plusieurs procédés de biocatalyse industrielle et les problèmes associés entre autres aux cultures microbiennes à grande échelle. Une revue des micro-organismes et des produits industriels sera suivie d'un aperçu des procédés de fermentation alcoolique conduisant à la fabrication de la bière ou du vin qui sont à l'origine de la microbiologie industrielle. Ensuite nous décrirons les procédés développés ultérieurement dans le domaine des produits pharmaceutiques, puis dans ceux des additifs alimentaires, des enzymes et de produits chimiques tels que le butanol et l'acide citrique. Nous verrons comment ces procédés microbiologiques ont été rendus viables à une échelle industrielle.

Micro-organismes d'intérêt industriel et leurs produits

Les micro-organismes les plus utilisés en microbiologie industrielle sont les champignons et certains procaryotes, en particulier du genre *Streptomyces*. Ceux d'intérêt industriel ont des métabolismes spécialisés capables de synthétiser un ou plusieurs produits avec un rendement élevé. Pour obtenir ces métabolismes, on modifie souvent les génomes des souches par mutation ou recombinaison pour augmenter le rendement en un métabolite particulier. Les souches de micro-organismes réellement utilisées dans l'industrie sont généralement très éloignées de la souche sauvage initialement isolée de l'environnement. Une fois ces souches développées industriellement avec un rendement élevé en produit désiré, elles sont conservées soit dans les laboratoires de microbiologie des industriels, soit dans de grandes collections nationales de micro-organismes, telles que l'American Type Culture Collection aux États-Unis, ou le Centre de ressources biologiques de l'Institut Pasteur en France, ou encore le **Centraalbureau voor Schimmelcultures** aux Pays-Bas. Ces collections fournissent des souches pour l'enseignement, la recherche et l'industrie. Toute souche ayant la capacité d'effectuer un nouveau procédé biocatalytique doit être déposée dans une de ces collections nationales. Cependant, pour des raisons de confidentialité, les souches déposées ne sont pas les véritables souches à fort rendement, mais des souches effectuant le procédé avec un rendement plus faible.

Propriétés des micro-organismes d'intérêt industriel

Un micro-organisme approprié à un procédé industriel doit posséder, outre la caractéristique de produire la substance d'intérêt, celle de croître et de sécréter cette substance dans des cultures à grande échelle. De plus, il est préférable qu'il produise des spores ou des cellules végétatives facilitant l'inoculation de grands fermenteurs. Il doit aussi croître rapidement et produire le métabolite désiré sur une échelle de temps courte. Une souche industrielle doit également pouvoir croître dans un milieu de culture relativement bon marché et disponible en grande quantité. Dans beaucoup de procédés, on utilise des déchets carbonés provenant d'autres industries comme ingrédients majeurs ou comme suppléments des milieux de culture à grande échelle. C'est le cas par exemple de la corn steep liquor, sous-produit de la mouture humide du maïs, riche en azote et en facteurs de croissance, et du sérum de fromagerie, contenant du lactose et des minéraux. Un micro-organisme industriel ne doit pas être pathogène, en particulier à l'encontre des humains ou d'animaux et de plantes de grande importance économique. En effet, à cause des densités cellulaires très fortes présentes dans les fermenteurs industriels et de l'impossibilité virtuelle d'éviter la contamination de l'environnement par celles-ci, un tel micro-organisme pourrait présenter de sérieux problèmes de sécurité. Enfin, un micro-organisme doit pouvoir être manipulé génétiquement. L'augmentation des rendements a souvent été obtenue en jouant sur la

génétique par mutation et sélection. Un micro-organisme génétiquement stable et facilement manipulable possède donc un avantage indéniable.

Exemples de produits industriels

Les produits microbiens d'intérêt industriel comprennent les cellules microbiennes elles-mêmes, par exemple les levures alimentaires destinées à la boulangerie, à la brasserie ou à la nourriture et les substances produites par ces cellules. Parmi ces dernières, on trouve des enzymes comme la glucose isomérase, enzyme importante dans la production de sirops à haute teneur en fructose, des agents pharmaceutiques actifs comme les antibiotiques, les stéroïdes et les alcaloïdes, des produits chimiques particuliers, des additifs alimentaires comme l'aspartame® et des produits chimiques bon marché produits en grande quantité comme l'éthanol, l'acide citrique et de nombreux autres.

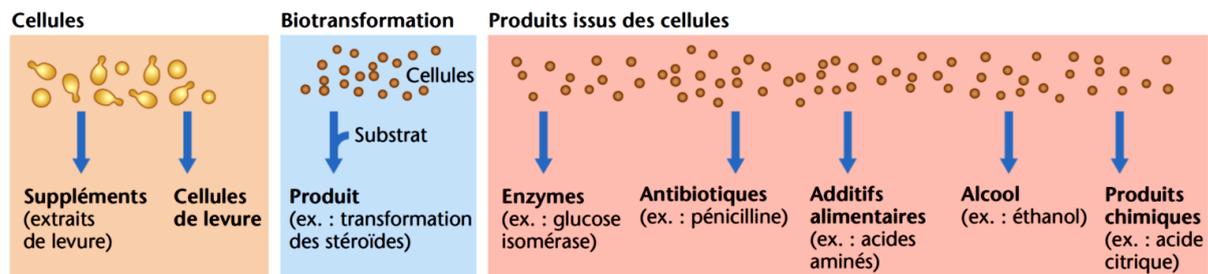


FIGURE Produits de la microbiologie et biocatalyse industrielles. Il peut s'agir des cellules elles-mêmes, ou des produits fabriqués à partir des cellules. Dans le cas des biotransformations, les cellules sont utilisées pour transformer chimiquement une substance en une autre.

Métabolites primaires et secondaires

À quel moment du cycle de croissance du micro-organisme le métabolite intéressant est-il produit ? Ce cycle comprend trois phases dites : *de latence*, *exponentielle* et *stationnaire*. Certains métabolites sont formés pendant la croissance exponentielle alors que d'autres le sont seulement une fois cette phase achevée. On distingue deux types principaux de métabolites microbiens : les *primaires* et les *secondaires*. Un **métabolite primaire** est formé durant la phase exponentielle de croissance alors qu'un **métabolite secondaire** l'est le plus souvent en fin de phase exponentielle ou lors de la phase stationnaire. L'*alcool*, métabolite primaire typique est un produit du métabolisme anaérobie de certaines levures et bactéries et fait partie du métabolisme énergétique. Comme la croissance ne peut avoir lieu qu'avec une production d'énergie en parallèle, la formation d'éthanol s'accomplit pendant la croissance. Dans certaines biocatalyses, au contraire, le produit désiré n'est pas synthétisé pendant la phase active de croissance, mais lors de la *phase stationnaire*. Parmi ces *métabolites secondaires*

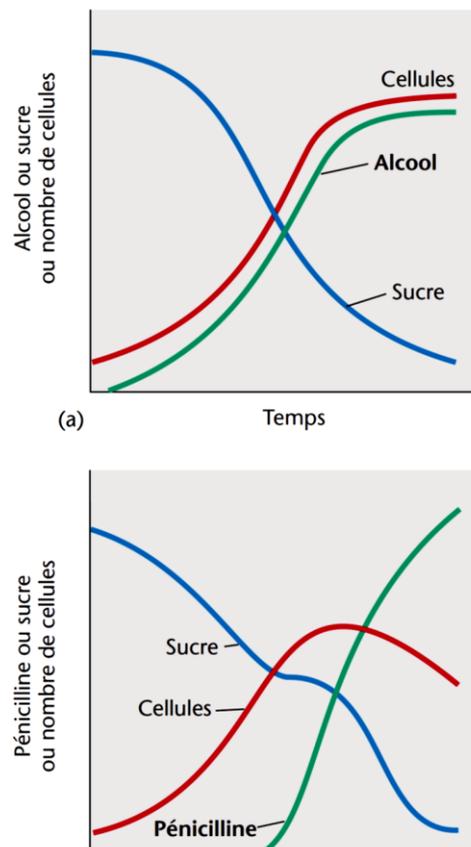


FIGURE Comparaison entre production de métabolites primaires et secondaires. (a) Production d'alcool par une levure : métabolite *primaire*. (b) Production de pénicilline par le champignon *Penicillium chrysogenum* : métabolite *secondaire*. La pénicilline n'est produite qu'en fin de phase exponentielle.

figurent quelques-uns des métabolites d'intérêt industriel les plus importants et les plus communs. Tous partagent les mêmes caractéristiques : Les métabolites secondaires *ne sont essentiels ni à la croissance ni à la reproduction*. Leur formation est très *dépendante des conditions de culture* et de la composition du milieu afin d'éviter la répression de leur production. Ils font souvent partie d'un *groupe de substances très proches*. Par exemple, une souche de *Streptomyces* peut produire trente molécules proches d'antibiotique du type anthracycline. Il est souvent possible d'en obtenir une forte *surproduction*, ce qui n'est pas le cas des métabolites primaires.

Voies de synthèse des métabolites primaires et Secondaires

La plupart des métabolites sont des molécules organiques complexes dont la synthèse nécessite un grand nombre d'étapes enzymatiques. Il y a 72 étapes enzymatiques dans la synthèse de l'antibiotique *tétracycline* et plus de 25 dans celle de l'*érythromycine*. Aucune de ces réactions n'a lieu pendant le métabolisme primaire, bien que leurs voies métaboliques de production aient toutes pour origine des molécules produites pendant celui-ci. La figure 30.3 montre les relations entre la voie primaire principale de synthèse des acides aminés aromatiques et les voies secondaires des antibiotiques.

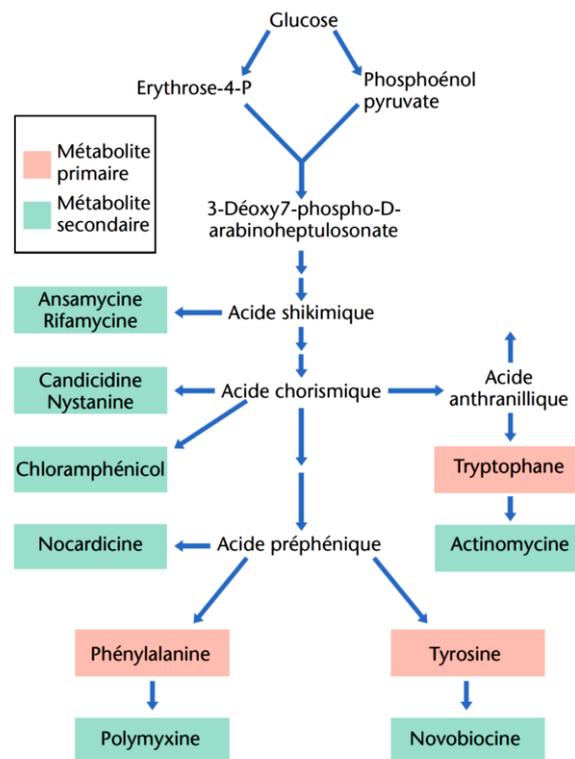


FIGURE Antibiotiques à noyau aromatique. Comparaison entre la voie de synthèse primaire des acides aminés aromatiques et la formation d'antibiotiques contenant des noyaux aromatiques. Ces étapes n'existent pas chez tous les microorganismes.

Caractéristiques des fermentations à grande échelle

En microbiologie industrielle, le terme de **fermentation** fait référence à *tout* procédé de culture à grande échelle d'un micro-organisme, que ce soit ou non une fermentation au sens biochimique. Le récipient dans lequel le procédé industriel a lieu est appelé un **fermenteur** d'une contenance allant de cinq à dix litres pour ceux de laboratoire et jusqu'à 500 000 litres pour les industriels . Il y a deux grands types de fermenteur industriel : l'un dédié aux fermentations *anaérobies* et l'autre aux fermentations *aérobies*. Les *fermenteurs anaérobies* nécessitent peu d'équipements spécifiques, sauf l'élimination de la chaleur générée pendant la croissance. Par contre les fermenteurs *aérobies* nécessitent un équipement beaucoup plus élaboré assurant un mélange et une aération optimaux. La plupart des fermentations étant *aérobies*, nous nous focaliserons sur celles-ci.

Matériel de fermentation aérobie

Les fermenteurs industriels, presque toujours construits en acier inoxydable, sont des cylindres fermés auxquels sont reliées de nombreuses tuyauteries et vannes . Comme la stérilisation du milieu de culture et l'élimination de l'excès de chaleur sont vitales, le fermenteur possède une *double enveloppe de refroidissement* dans laquelle on peut envoyer soit de l'eau froide soit de la vapeur. Ce système est insuffisant pour les grands fermenteurs, dans lesquels il est remplacé par un *serpentin de circulation d'eau* ou de vapeur intérieur . Le *système d'aération* est un autre facteur critique pour les fermenteurs de grande taille, car la solubilité de l'oxygène dans l'eau est faible, tandis que la demande par les

microorganismes est très forte. Deux systèmes séparés sont nécessaires pour assurer une oxygénation efficace : un *bulleur* et une *turbine d'agitation* . Le bulleur est soit un anneau métallique percé de trous, soit un microdiffuseur à travers lequel de l'air stérile est envoyé. Plus la taille des bulles est petite, mieux l'oxygène se dissout dans l'eau. Au bullage qui peut être suffisant dans les petits fermenteurs, il est nécessaire d'ajouter une *agitation* dans les fermenteurs de grande taille . L'agitation favorise également l'obtention d'un *mélange homogène* permettant aux micro-organismes d'accéder aux nutriments de façon uniforme.

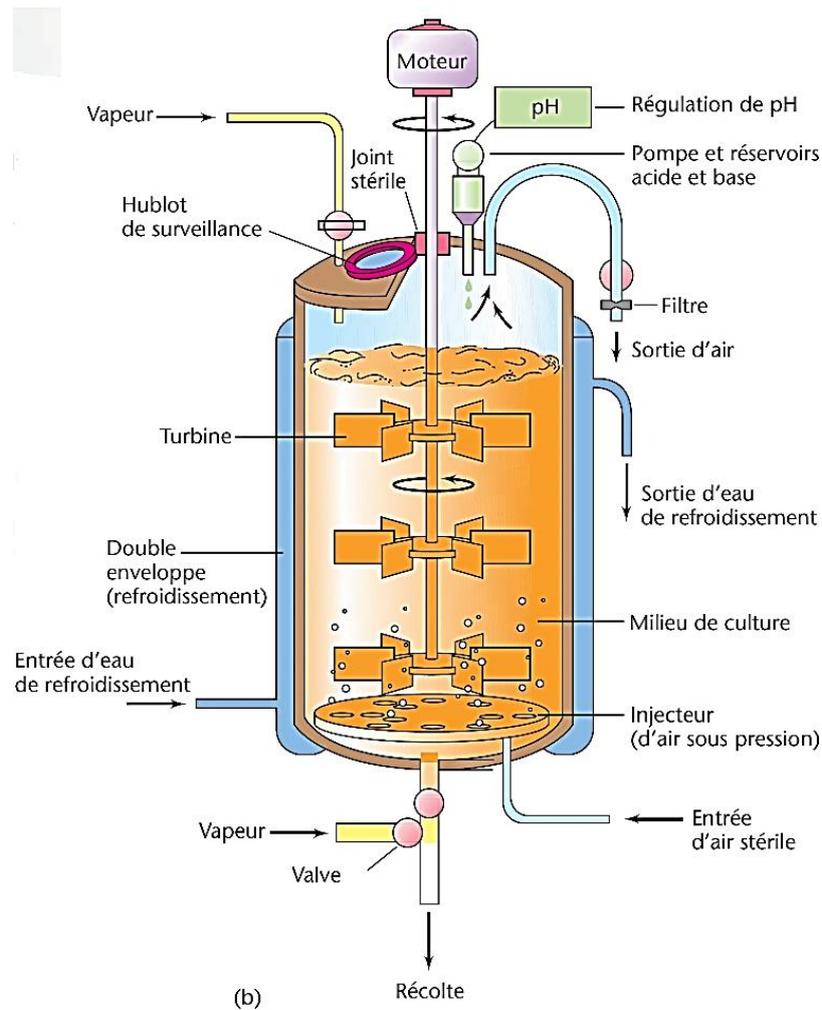


FIGURE Fermenteurs. (b) Schémas de principe d'un fermenteur.

Contrôle et pilotage des fermentations

Les grands fermenteurs doivent être pilotés avec soin pour des raisons de coût. Il est nécessaire de mesurer la croissance et la formation de produit, mais aussi de *contrôler* les paramètres importants du processus tels que la température, la concentration en oxygène, le pH et la concentration des nutriments clés, tout ceci en temps réel . Il peut être par exemple souhaitable de modifier certains paramètres en cours de fermentation comme l'arrivée de nutriments afin de l'ajuster au mieux à la croissance du micro-organisme. Un pilotage informatique permet d'ajouter la quantité de nutriment nécessaire au bon moment pour obtenir un rendement maximal en produit. Des *modèles* mathématiques de la fermentation informatisés permettent d'estimer l'effet de paramètres variés sur la croissance et le rendement en produit, et d'économiser temps et argent avant les expériences nécessaires en *hall pilote* et finalement à taille réelle de fermenteur.

Mise à l'échelle des fermenteurs

Le transfert du procédé d'un fermenteur de petite taille à un fermenteur de grande taille est un aspect important du procédé appelé **mise à l'échelle** ou *scale up*. En effet, les procédés biocatalytiques donnent rarement les mêmes résultats lorsqu'on passe du fermenteur de laboratoire au fermenteur industriel . La mise à l'échelle d'un procédé industriel est du ressort de l'*ingénieur en génie des procédés biologiques*, qui est familier des transferts de gaz, de la mécanique des fluides, des mélanges et de la thermodynamique, de la microbiologie et du pilotage des fermenteurs. Les problèmes majeurs rencontrés sont ceux de l'aération et du mélange. Le transfert adéquat de l'oxygène est particulièrement difficile à obtenir : en effet, les milieux de culture utilisés sont riches, la croissance des microorganismes élevée, et par conséquent la demande en oxygène ne cesse de croître. Si jamais l'oxygénation est restreinte, même pendant peu de temps, la culture peut se trouver en conditions anoxiques temporaires avec des conséquences importantes sur son métabolisme et une réduction conséquente en rendement de produit.

Processus de mise à l'échelle

Le transfert du procédé du laboratoire au fermenteur industriel, se fait en plusieurs étapes. La première étape est réalisée en *fiolle de laboratoire* appelée *Erlenmeyer* opération classique à petite échelle indiquant si le procédé a un quelconque intérêt commercial. De là, on passe à l'étape du *fermenteur de laboratoire*, fermenteur de verre, d'une contenance d'un à dix litres pour les premiers pas de *mise à l'échelle*. À ce stade, il est possible de tester des variations de composition du milieu, de température, de pH, etc. à faible coût. Quand les tests à ce stade sont prometteurs, on passe à l'étape de la fermentation en *hall pilote* avec des fermenteurs de 300 à 3 000 litres, déjà plus proches de la taille commerciale, mais d'un coût encore raisonnable. Finalement, on arrive au *fermenteur industriel*, d'une contenance de 10 000 à 500 000 litres . Lors de toutes ces étapes, on suit de très près l'aération et la façon dont le volume joue sur l'évolution de la concentration en oxygène de la culture.