



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE



Polycopié de cours

Biotechnologies et

Applications

Niveau : L2 Biotechnologie

Dr. NEHAL Fatima

Année Universitaire : 2023/2024

Dr. NEHAL Fatima

Grade : MCA

Ingéniorat Sciences Alimentaire

Doctorat Sciences Agronomiques

Email : f.nehal@univ-chlef.dz

Sommaire

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction générale 2

Chapitre I : La Signification économique des microorganismes 5

I.1. Les grands groupes de microorganismes à intérêt biotechnologique 5

I.1.1. Les bactéries 6

I.1.2. Les levures 7

I.1.3. Les moisissures 7

I.2. Stratégie d'utilisation des microorganismes dans les procédés biotechnologiques 8

I.3. Rôle des microorganismes en industries agroalimentaires 10

Chapitre II : Utilisation des microorganismes dans les fermentations alimentaires 14

II.1. Origine de la flore des aliments 15

II.2. Le pain 16

II.2.1. Définition du pain 17

II.2.2. Les caractéristiques des ingrédients 17

II.2.3. Autres catégories de farines 18

II.2.4. Propriétés des protéines du blé 19

II.2.5. Les améliorants et correcteurs 23

II.2.6. La fermentation panair 24

II.2.6.1. Paramètres influençant la durée de fermentation (pointage) 25

II.2.7. Etapes de fabrication du pain 25

II.3. Le yaourt : lait fermenté 30

II.3.1. Définitions et réglementation 30

II.3.2. La fermentation lactique : aspect microbiologique, biochimique et physicochimique 31

II.3.3. Caractères généraux des bactéries lactiques du yaourt 33

II.3.4. Production symbiotique d'arôme et autres 36

II.3.5. La maîtrise des conditions de fermentation 37

II.3.5.1. La qualité du ferment 37

II.3.5.2. Le Taux d'ensemencement..... 37

II.3.6. Diagramme général de production	38
II.3.7. Laits fermentés contenant des peptides bioactifs	40
II.3.8. Fiche technique du yaourt	41
II.3.8.1. Types et Gout des yaourts : différence est liée à la durée d'incubation	41
II.3.8.2. Dénomination du yaourt	41
II.3.9. Les accidents de fabrication	41
Chapitre III : Métabolites microbiens d'importances économiques	52
III.1. Production des métabolites et molécules d'intérêt	52
III.2. Stratégie globale de production	53
III.3. Production d'alcool	57
III.4. Production des acides organiques	58
III.4.1. Micro-organismes producteurs des acides organiques	59
III.4.2. Voies métaboliques de production des acides organiques	59
III.4.2.1. Production d'acide citrique	62
III.4.2.2. Production d'acide acétique	64
III.4.2.3. Production de polysaccharides	66
III.4.2.4. Classification des polysaccharides microbiens	68
III.4.2.5. Milieu de culture et récupération	71
III.4.3. Antibiotiques	72
III.4.3.1. Définition	72
III.4.3.2. Production industrielle des antibiotiques	72
III.4.4. Production des enzymes	74
III.4.4.1. Choix des souches productrices	77
III.4.4.2. Processus de purification	78
Chapitre IV: Application des biotechnologies dans le domaine médical	88
IV.1. Applications existantes ou en développement	88
IV.2. Production d'hormones	90
IV.3. Production de vaccins	97
Chapitre V : Application des biotechnologies dans le domaine animal	105
V.1. Les biotechnologies de l'embryon	106
V.2. Première génération : l'insémination animale	107
V.3. Deuxième génération : la transplantation embryonnaire	109

V.4. Troisième génération : la fécondation <i>in vitro</i>	110
V.5. Quatrième génération : clonage somatique, transgénèse et réécriture du génome	110
V.6. Culture cellulaire animale pour des productions industrielles	111
Chapitre VI : Application des biotechnologies dans le domaine végétal	114
VI.1. Définition	114
VI.2. Les grandes étapes de l'avènement de la culture <i>in vitro</i>	115
VI.3. La totipotence cellulaire	116
VI.4. La dédifférenciation cellulaire	116
VI.5. Fondements de la <i>culture in vitro</i>	119
VI.6. Les types de multiplication <i>in vitro</i>	120
VI.6.1. Multiplication par bourgeonnement axillaire	120
VI.6.2. Multiplication par bourgeonnement adventif exemple : le saintpaulia	122
VI.6.3. Multiplication par embryogenèse somatique	123
VI.7. Avantages de la culture <i>in vitro</i>	124
VI.8. Organismes producteurs de médicaments en système ouvert: les plantes transgéniques	125
Conclusion générale	129
Références Bibliographiques	131

Liste des Figures

Figure 1: Exemple des diverses formes des bactéries 6

Figure 2. Schéma d’une structure bactérienne 6

Figure 3. Structure pariétale de bactéries Gram négatif et Gram Positif. 7

Figure 4 : Schéma de l’organisation cellulaire d’une levure 7

Figure 5: Schéma d’un hyphe cloisonné..... 8

Figure 6. Sources des microorganismes de matrice alimentaire. 15

Figure 7 : Origine des microorganismes présents dans la matière première. 16

Figure 8 : Les réactions chimiques dans la pâte et dans la levure 24

Figure 9. Actions dans la pâte lors de la cuisson 27

Figure 10. Les étapes de fabrications du pain 29

Figure 11. Diagramme de panification 30

Figure 12. Schéma général des critères de classification des laits fermentés. 31

Figure 13. Schéma simplifié des réactions du métabolisme homofermentaires chez les bactéries lactiques du yaourt. 32

Figure 14. Symbiose lors du métabolisme glucidique (A) et protéique (B). 35

Figure 15. Production symbiotique de l’acide lactique en fonction du temps. 35

Figure 16. Protocoopération par apport de facteur de stimulation..... 36

Figure 17 : L’effet de la T° de conservation sur la viabilité des souches qui conditionne la DLC 37

Figure 18. Diagramme général de fabrication des principaux types de yaourt et laits fermentés (nature) 38

Figure 19. L’espèce *Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus*..... 42

Figure 20. L’espèce *St.salivarius subsp.thermophilus* 43

Figure 21. Production de métabolites primaires et secondaires au cours de la croissance 52

Figure 22. Cinétique de formation de produits : Associé, non associé et intermédiaire. 53

Figure 23: Fermentation hétérolactique du glucose par la voie des pentoses-phosphate 60

Figure 24: La production de l'acide butyrique.1, Enzymes du glycolyse; 2, pyruvate-déshydrogenase :3, hydrogenase; 4, acetyl-CoA-acetyltransferase (thiolase); 5, B-hydroxybutyryl-CoAdeshydrogenase; 6, crotonase; 7, butyryl-CoAdehydrogenase 60

Figure 25: La production d’acide propionique 61

Figure 26 : La fermentation mixte 61

Figure 27: Synthèse de l’acide citrique (cycle de KREBS). 63

Figure 28: Diagramme montrant les différentes étapes de la fabrication du vinaigre.	65
Figure 29: Fabrication industrielles de vinaigre par le générateur à ruissellement de type Frings (a) et par Fermentation en batch (acetateur, b)	65
Figure 30 : Schéma représente les étapes de production d'alginate par <i>Azotobacter vinelandii</i>	67
Figure 31: Etapes de production des antibiotiques.	72
Figure 32: Procédé de purification de la pénicilline	73
Figure 33: Part du marché occupé par les enzymes dans différents secteurs.	74
Figure 34: Principe de révélation de l'activité amylase par le <i>lugol</i> .et de caséinase.	75
Figure 35: Principe de révélation de l'estérase et de pectinase par l'acétate de cuivre.	75
Figure 36. Technologie de criblage des activités enzymatique par la technique de droplet microfluide HTS.	76
Figure 37. Schéma général de production d'enzymes.	79
Figure 38. Chaîne de production d'enzymes à l'échelle industrielle.	79
Figure 39. Modèle proposé pour l'expression des xylanases par les <i>Penicillia</i>	80
Figure 33: Marché des biomédicaments	89
Figure 34 : Application des biotechnologies dans le domaine de santé.	89
Figure 35 : Classification des biomédicaments.	90
Figure 36 : Hormones/Cibles (cellules, tissus ou organes).	91
Figure 37: Hormones peptidiques	91
Figure 38: Hormones stéroïdiennes	92
Figure 39: Hormone monoamines	92
Figure 40. Structure chimique de l'insuline	94
Figure 41: Maturation de l'insuline : de la proinsuline à l'insuline active	94
Figure 42. Production d'insuline par génie génétique.	95
Figure 43. Vecteurs plasmidiques.	96
Figure 44. Vecteur d'expression YAC.	96
Figure 45. Facteurs du procédé de culture susceptibles d'influencer le comportement des cellules animales.....	106
Figure 46. Les principales biotechnologies de l'embryon.	107
Figure 47. Les quatre générations de Biotechnologies de la Reproduction Animale	107
Figure 48 : Schémas de récolte transcervicale d'embryons chez une vache.	109
Figure 49. Culture in vitro de tomate	117
Figure 50. Culture in vitro de carotte.	117

Figure 51. Utilisation des hormones en culture *in vitro*. 118

Figure 52. Schéma explicatif de la totipotence 120

Liste des tableaux

Tableau 1: Comparaison des différents rôles des moisissures 8

Tableau 2 : Les types de Farine classées selon le taux de cendre (minéraux) et taux d’extraction.
..... 18

Tableau 3. Caractères généraux des principales bactéries lactiques utilisées en fabrication de laits fermentés 34

Tableau 4. Température et durée de fermentation de différents types de laits fermentés. 40

Tableau 5. Les acides organiques produits par les micro-organismes et leurs utilisations dans l’industrie alimentaire. 59

Tableau 6 : Autres polysaccharides d’intérêt industriel 68

Tableau 7: Principaux homopolysaccharides naturels 69

Tableau 8: Provenances des antibiotiques 72

Tableau 9 : Les producteurs des enzymes 74

Tableau 10. Exemples de protéases utilisées en industrie. 75

Tableau 11. Lignées cellulaires les plus utilisés dans les procédés industriels 112

Tableau 12. Composition non exhaustive de milieux de culture de base avant supplémentation par le sérum de veau fœtal (concentrations exprimées en mg.L⁻¹) 113

Tableau 13. Composition non exhaustive de milieux de culture de base avant supplémentation par le sérum de veau fœtal (concentrations exprimées en mg.L⁻¹) 114

Introduction générale

La biotechnologie au sens large du terme, est l'utilisation de microorganismes ainsi que des cellules végétales, animales ou humaines pour la production de certaines substances à l'échelle agroalimentaire et industrielle.

« Biotechnologie » est un terme relativement récent, puis qu'il est apparu pour la première fois vers 1960. IL est compose de bios (« vie » en grec) et de technologie (entré dans la langue française en 1656, au sens d'« étude des outils, machines et matières premières »). Bien que son étymologie soit assez précise, sa définition est un peu plus vague, en effet, l'application de la science et de la technologie aux organismes vivants pour la production du savoir, biens et services, en est une définition large.

La biotechnologie est un domaine clairement multidisciplinaire impliquant la biochimie, la biologie moléculaire, la génétique, l'immunologie, la microbiologie, la pharmacologie, la fermentation, et l'agriculture.

Les procédés biologiques mettant en œuvre les techniques classiques de fermentation, de bioconversion, ou du génie génétique sont déjà très utilisés dans les secteurs de la pharmacie, de l'agro-alimentaire et dans l'industrie des semences. Les biotechnologies modernes ne sont pas porteuses d'une industrie nouvelle, mais elles ont vocation à modifier ou parfois à bouleverser, par tout un ensemble d'innovations, des secteurs d'activité existant déjà. Les progrès extraordinairement rapides de la biologie moléculaire ont introduit une ingénierie nouvelle qui augmente considérablement le potentiel d'intervention des procédés biologiques dans les domaines liés à la santé, l'agriculture, l'alimentation, l'environnement et l'énergie.

C'est avec la production d'aliments fermentés que l'utilisation empirique de micro-organismes pour la conservation des aliments annonce la naissance des biotechnologies. Au-delà, les biotechnologies, qu'elles soient classiques (fermentation, génie enzymatique, sélection de souches...) ou de nouvelle génération (génie génétique, nanotechnologies, génomique, protéomique) s'intègrent de plus en plus dans des procédés industriels de transformation de la matière, de synthèse et de contrôle de nouveaux produits.

Aujourd'hui, les biotechnologies sont utilisées dans de larges domaines, notamment celui de la santé où elles ont révolutionné l'approche de la recherche et la production de nouveaux médicaments. Ces biomédicaments (ou médicaments issus des biotechnologies) représentent l'application concrète des biotechnologies, qui ont permis à l'homme la production de molécules d'intérêt en thérapeutique ayant des dimensions trop importantes pour une synthèse chimique.

Pour le chercheur, la possibilité d'introduire une information génétique nouvelle dans une espèce végétale constitue avant tout un outil précieux pour l'étude du développement des plantes. Les premières plantes transgéniques ont été obtenues dans les années 1980 (La Recherche, mai 1987). Les plantes cultivées les plus étudiées sont le tabac, la pomme de terre, le colza, les céréales (maïs, blé et riz).

Le présent cours est dédié au programme des applications biotechnologiques. Il est destiné aux étudiants de deuxième année biotechnologie relevant du domaine Sciences biologiques. Son contenu consiste en six chapitres traitant la Signification économique des microorganismes, l'Utilisation des microorganismes dans les fermentations alimentaires, les Métabolites microbiens d'importances économiques, l'Application des biotechnologies dans le domaine médical, l'Application des biotechnologies dans le domaine animal et l'Application des biotechnologies dans le domaine végétal.

Ce cours est conforme aux programmes ministériels et au canevas de formation ministériel enrichis par un ensemble de séries d'exercices traitant des problématiques technologiques correspondant à chaque partie de ce cours.

Cet enseignement répond au champ de compétences « Mise en œuvre d'un protocole d'analyses, d'essais ou d'un procédé biotechnologique ». L'enseignement vise à faire mobiliser de manière raisonnée par l'apprenant des techniques de bioproduction dans les différents domaines professionnels (domaine de la santé, domaine agro-alimentaire, domaines agricole et de l'environnement). Cet enseignement doit être ouvert aux évolutions les plus récentes des techniques, y compris numériques, et des réglementations. Il favorise l'acquisition d'une démarche de veille scientifique et technologique. Ce module développe la compréhension de l'organisation et du fonctionnement des systèmes vivants et la capacité à la mobiliser dans la mise en œuvre de technologies intégrant des systèmes vivants (organismes vivants et/ou populations) dans le cadre de la conduite de procédés biotechnologiques. Ce module s'appuie sur une diversité de situations professionnelles dans les domaines concernés.

Connaissances préalables recommandées

1. Connaissances en biochimie
2. Notions en biologie moléculaire
3. Maîtrise de Microbiologie générale et industrielle pour la compréhension de la mise en place de process biotechnologique.

Public cible : L2 Biotechnologie, 4ème Semestre

U.E: Unité d'Enseignement Fondamentale 1

Matière : Biotechnologies et applications

VHG : 67h.30 (3h cours, 1h.30 TD)

Mode d'évaluation : Contrôle continu: 40% ; Examen: 60%.

Crédit : 6, Coefficient : 3

Contenu de la matière

1. La Signification économique des microorganismes

2. Utilisation des microorganismes dans les fermentations alimentaires

2.1. Pain

2.2. Fromage

2.3. Lait

2.4. Autres

3. Métabolites microbiens d'importances économiques

3.1. Enzymes

3.2. Ethanol

3.3. Acide citrique

3.4. Antibiotiques

3.5. Autres

4. Application des biotechnologies dans le domaine médical

4.1. Production d'hormones

4.2. Production de vaccins

5. Application des biotechnologies dans le domaine animal

5.1. Les biotechnologies de l'embryon

5.2. Culture cellulaire animale pour des productions industrielles

6. Application des biotechnologies dans le domaine végétal

6.1. Aperçu historique du développement des cultures in vitro

6.2. Totipotence

6.3. Culture in vitro et son utilisation

Chapitre I : La Signification économique des microorganismes

Objectifs : Les objectifs fondamentaux de ce chapitre sont :

- Se familiariser avec les grands groupes de microorganismes d'intérêt biotechnologique ;
- Etudier la stratégie générale d'action de ces microorganismes ;
- Développer les connaissances approfondies sur les microorganismes d'intérêt technologique et de leurs fonctionnalités au service de la biotechnologie dans différents secteurs.

Introduction

Sous le terme générique micro-organismes, sont regroupés des êtres vivants microscopiques et ubiquitaires qui représentent la biomasse la plus importante de la Terre. On considère qu'ils sont apparus il y a environ 3,8 milliards d'années et leur mise en évidence, qui a bénéficié des progrès de l'optique, remonte au XVII^e siècle. Ils sont avant tout indispensables à l'équilibre de la biosphère en participant aux cycles élémentaires de la nature, mais peuvent s'avérer néfastes. Ils sont également largement utilisés pour la production de biens ou de services dans le contexte des biotechnologies.

C'est avec la production d'aliments fermentés que l'utilisation empirique de micro-organismes pour la conservation des aliments annonce la naissance des biotechnologies. Au-delà, les biotechnologies, qu'elles soient classiques (fermentation, génie enzymatique, sélection de souches...) ou de nouvelle génération (génie génétique, nanotechnologies, génomique, protéomique) s'intègrent de plus en plus dans des procédés industriels de transformation de la matière, de synthèse et de contrôle de nouveaux produits.

Les microorganismes sont utilisés depuis des milliers d'années pour la transformation des produits alimentaires (boissons alcoolisées, pain, fromages, etc.). Plus récemment, et avec l'essor de la biotechnologie, des procédés exploitant certaines caractéristiques de microorganismes ont été développés, soit pour dégrader de nombreuses molécules organiques ou minérales afin de dépolluer les sols, les eaux ou l'air, soit pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes.

Cinq secteurs sont actuellement concernés par le développement industriel des procédés biologiques mettant en œuvre des micro-organismes: la santé, l'agro-alimentaire, l'agriculture, la chimie et l'énergie.

I.1. Les grands groupes de microorganismes à intérêt biotechnologique

Les microorganismes recherchés pour des applications biotechnologiques sont, généralement, ceux dont le type trophique est hétéroorganotrophes. Ces derniers fournissent la plupart des métabolites d'intérêt par la production fermentaire. Par conséquent il existe quatre groupes de microorganismes d'importance biotechnologique et industrielle : • Les levures • Les moisissures • Les bactéries • Actinomycètes

I.1.1. Les bactéries

Ce sont des organismes unicellulaires qui seraient apparues il y a plus de 8 milliard d’années. Elles ne contiennent pas de noyaux, le chromosome bactérien n’est donc pas séparé du cytoplasme par une membrane plasmique. Elles ont une taille de l’ordre du micromètre ce qui est très petit comparé aux cellules eucaryotes. En microscopie optique, les bactéries peuvent se présenter sous différentes formes (**figure 1**). La cellule peut être en forme de coque (Cocci) sphérique ou ovoïde, groupés par eux (diplocoques) ou assemblés sous forme de chaînettes, en forme de bâtonnet (bacille) régulier ou irrégulier, rectiligne ou spiralé, parfois ramifié comme dans le cas des actinomycètes, ...

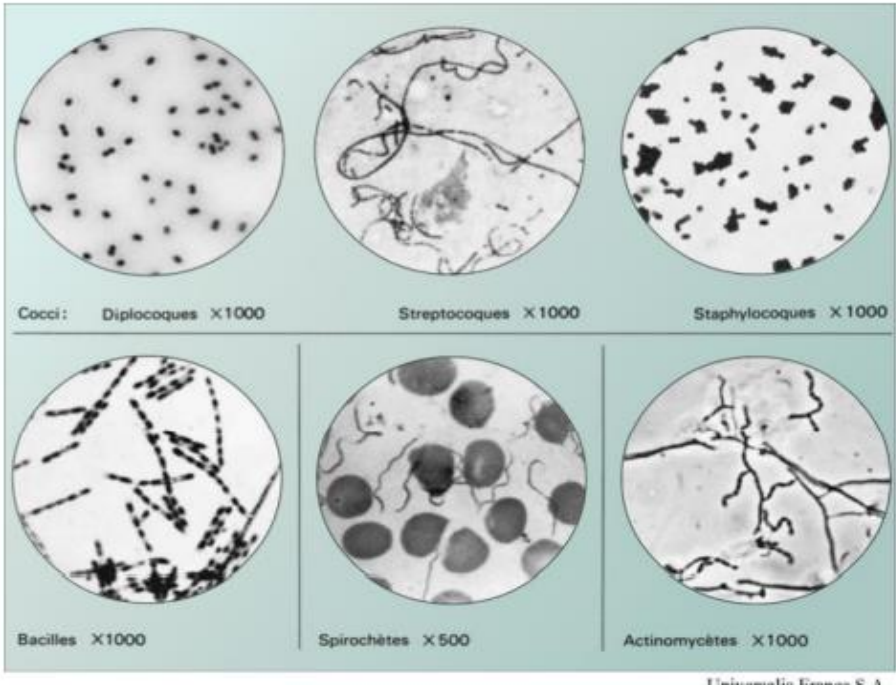


Figure 1: Exemple des diverses formes des bactéries

La composition de l’enveloppe cellulaire des bactéries permet de distinguer deux grandes catégories de bactéries (**figure 2, 3**), les bactéries dites Gram positives et les bactéries dites Gram négatives. Cette différence est mise en évidence grâce à la coloration de GRAM. Certaines bactéries ont la capacité à former des spores quand les conditions du milieu deviennent défavorables.

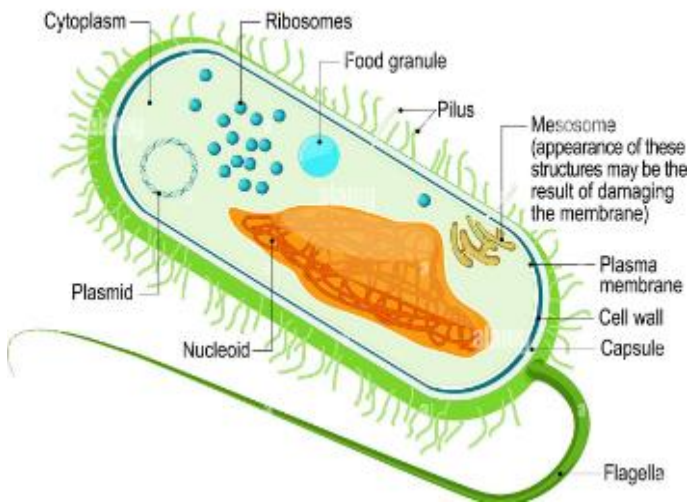


Figure 2. Schéma d’une structure bactérienne

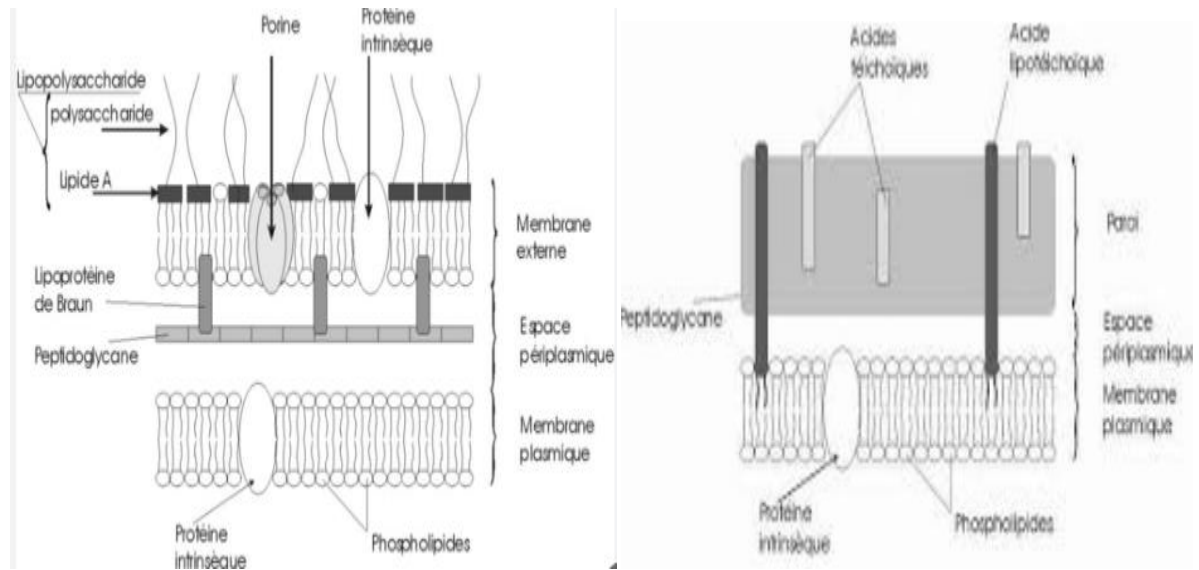


Figure 3. Structure pariétale de bactéries Gram négatif et Gram Positif.

I.1.2. Les levures :

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, non photosynthétiques. Elles possèdent une paroi qui est constituée de polymères glucidiques. Leur appareil végétatif qui est sans différenciation cellulaire (Thalle) est unicellulaire (contrairement aux moisissures qui ont un appareil végétatif pluricellulaire filamenteux). Ce sont donc des champignons microscopiques de forme ovoïde.

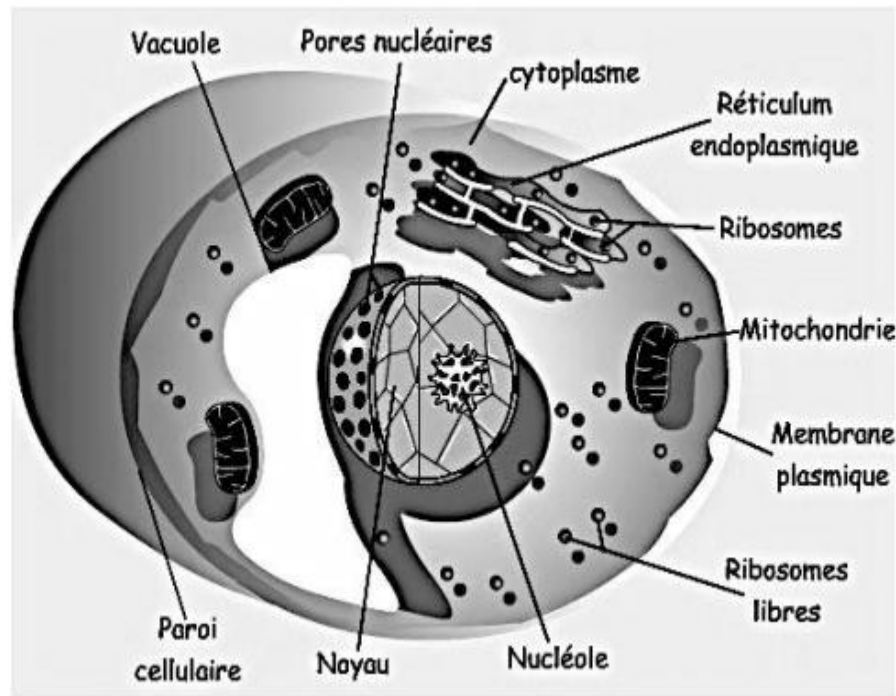


Figure 4 : Schéma de l’organisation cellulaire d’une levure

I.1.3. Les moisissures

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes, ce sont des eucaryotes non photosynthétiques et immobiles. On les qualifie de multicellulaires mais la notion est assez vague puisqu’il s’agit d’une structure souvent mycélienne et coenocytique (cellules fusionnées à plusieurs noyaux). La structure de la paroi diffère selon les espèces, le cytoplasme contient des ribosomes, des mitochondries, un réticulum endoplasmique et un ou plusieurs noyaux. L’hyphe est l’élément

structural des moisissures, il s’agit de filaments dont l’ensemble constitue un réseau appelé mycélium.

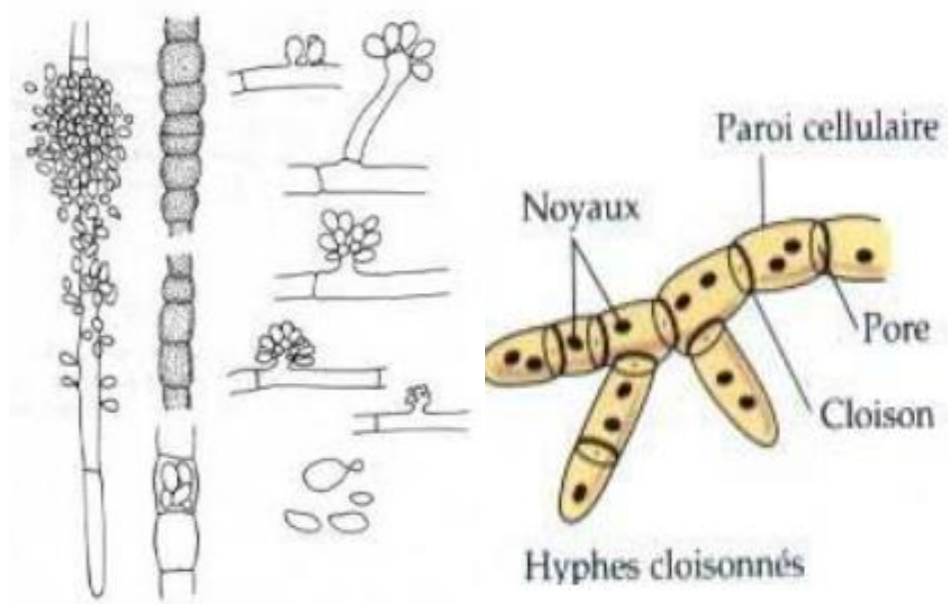


Figure 5: Schéma d’un hyphe cloisonné.

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques...) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (notamment lors de l’affinage de fromages ou la production d’enzymes). Connaître les conditions de croissance et de développement de ces différentes espèces de moisissures est un enjeu majeur pour l’ingénieur en agronomie ou en agro-alimentaire, afin de favoriser ou non leur prolifération.

Tableau 1: Comparaison des différents rôles des moisissures

Moisissures utiles	Moisissures d’altération
<i>Pénicillium roqueforti</i> : fabrication de fromages à pâte persillée	<i>Aspergillus flavus</i> : élabore des composés très toxiques et cancérogènes (aflatoxines)
<i>Pénicillium camemberti</i> : fabrication de fromages à croûte fleurie	<i>Aspergillus terreus</i> : contribue à la décomposition de la matière organique
<i>Pénicillium album</i> : flore de surface du saucisson, couverture de certains fromages	<i>Alternaria dauci</i> : infecte les feuilles de carottes cultivées
<i>Mucor</i> : flore de surface de certains fromages, fabrication de produits divers	<i>Fusarium avenaceum</i> : responsable de l’altération de fruits
<i>Aspergillus Oryzae</i> : fermentation de produits à base de riz et de soja	

I.2. Stratégie d’utilisation des microorganismes dans les procédés biotechnologiques.

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

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

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

- a. Sélection naturelle ;
- b. Sélection par mutation ;
- c. Sélection par génie génétique.

L'objectif fondamental de tous les processus industriels est de fabriquer à moindre coût un produit parfaitement défini en grande quantité avec une qualité constante. Les entreprises utilisent la biotechnologie industrielle pour:

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

La production industrielle nécessite **une souche ayant les caractéristiques suivantes** :

- Innocuité (non pathogène) ;
- Bonne productivité (fort rendement = capacité à synthétiser des quantités appréciables de produit attendu) ;
- Stabilité génétique (ne perdant pas ses caractéristiques après de nombreuses multiplications en bioréacteur et lors de sa conservation) ;
- Croissance rapide (de façon à donner très vite beaucoup de produit ou une biomasse importante).

La biotechnologie industrielle est principalement basée sur **la fermentation** et **la biocatalyse**. Ce sont les microorganismes (levures, algues, bactéries), ou une partie de ceux-ci (principalement les enzymes), qui jouent le rôle de mini-usines ou de chaîne de production. En biotechnologie, deux types de processus sont, en effet, généralement utilisés :

- La fermentation où des organismes vivants sont multipliés dans un milieu nutritif qui secrète le produit recherché extrait ensuite du milieu de fermentation ;
- La conversion enzymatique où les enzymes (protéines douées de propriétés catalytiques) extraites de cellules animales, végétales ou microbiennes sont utilisées pour transformer un produit en un autre.

La connaissance des micro-organismes et des enzymes, la maîtrise de leur production et de leur utilisation à l'échelle industrielle, le transfert de compétence du génie chimique au génie biologique laissent espérer un développement rapide des techniques de bioconversion.

La voie microbienne permet de convertir les substrats glucidiques et des formes azotées peu élaborées en biomasse destinée à l'alimentation animale ou humaine et en biométabolites à haute valeur ajoutée. Parmi les biométabolites dignes d'intérêt, nous pouvons citer des acides organiques, des acides aminés à usage alimentaire, des vitamines et des antibiotiques à usage pharmaceutique. La mise en œuvre simultanée de substrats glucidique, protéique et lipidique peut conduire à l'obtention de biométabolites très variés d'intérêt aromatique (arôme de viande, de poisson, de fromage...).

La conversion enzymatique, à échelle industrielle, se limite principalement à des opérations d'hydrolyse et cela sur les différents substrats. L'hydrolyse des protéines pour la préparation de mélanges peptidiques à usage alimentaire, diététique, pharmaceutique, cosmétique... est très prometteuse. Les peptides obtenus sont utilisés pour la préparation d'aliments de réanimation, d'aliments du premier âge, de pommades... Certaines séquences peptidiques possèdent des propriétés physiologiques particulières qui leur confèrent un rôle bactériostatique et antiviral.

I.3. Rôle des microorganismes en industries agroalimentaires

Cinq propriétés liées à la fermentation permettent d'expliquer leur utilisation massive dans le secteur agroalimentaire :

- La conservation des produits au fil du temps : protection de la matière première grâce à l'acidification ou l'alcoolisation du milieu à la suite d'une diminution du pH entraînée par la production d'acide organique (acide lactique ou acétique)- beaucoup plus bactéricides que les acides forts. De plus, le nombre important de microorganismes en présence empêche l'installation de flores indésirables via la compétition pour les ressources et la production de composés antimicrobiens (eau oxygénée, bactériocine),
- L'enrichissement de la qualité nutritionnelle : à partir d'une matière première peu différenciée, la fermentation va permettre l'obtention d'un produit aux caractéristiques propres, améliorées,
- L'amélioration par exemple des propriétés organoleptiques des produits,
- La réduction du temps de préparation des plats : la fermentation est un premier travail sur le produit. L'aliment est plus digeste et protégé.

Différents groupes de bactéries utiles peuvent être distingués qui ont des fonctions différentes :

Les bactéries lactiques utiles dans la fabrication de yaourts et de fromages mais aussi dans la fabrication d'une boisson le kéfir ou encore la choucroute.

Les bifidobactéries sont-elles apportées dans les laits fermentés et elles peuvent rester présentes jusqu'à la date limite de consommation, elles sont aussi à l'origine d'un arôme particulier.

Les corynébactéries sont présentes sur la croûte des fromages mais aussi peuvent être utilisées dans la synthèse d'acides aminés. Les bactéries acétiques permettent la fermentation acétique, on

peut les retrouver dans le vin ou encore le cidre sous forme d'un léger voile qui se forme à la surface. Les bactéries propioniques sont nécessaires à l'affinage des fromages à pâte pressée cuite. Elles sont responsables de la conservation de ces aliments mais leur donnent aussi un goût particulier

Aujourd'hui les levures sont essentielles dans les biotechnologies et trouvent de nombreuses applications dans plusieurs domaines :

- Panification ;
- Fabrication de boissons alcoolisées ;
- Affinage des fromages ;
- Probiotiques et d'agents d'ensilage en nutrition animale ;
- Dépollution des sols ;
- Industrialisation de la production d'enzyme ;
- Probiotiques : Alternative naturelle aux antibiotiques. Concernent principalement le transit, les défenses immunitaires et la sphère vaginale.

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques...) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (notamment lors de l'affinage de fromages ou la production d'enzymes). L'intervention néfaste se situe à plusieurs niveaux : - champignons à activité phytopathogène, ils sont néfastes pour la production des matières alimentaires brutes comme les fruits et légumes. - moisissures saprophytes, elles contaminent les aliments et les dégradent au point de vue qualitatif. En ce qui concerne l'action « positive » des moisissures, on constate une grande utilité de celles-ci dans l'agriculture (le champignon filamenteux *Botrytis* à l'origine de la « pourriture noble » des raisins du Sauternes), ainsi que dans l'industrie (production de fromages comme nous l'avons précisé précédemment, production de molécules à activité pharmacologiques, d'enzymes industrielles).

La fermentation et donc les micro-organismes sont également utilisés pour faire des additifs alimentaires :

1. Acides aminés essentiels et les exhausteurs de goût

La fermentation améliore les propriétés de l'acide glutamique (un acide aminé utilisé comme le glutamate monosodique) découvert au Japon au début du XXe siècle. En plus de donner une odeur, les acides aminés sont des nutriments essentiels, car ils contiennent beaucoup de protéines. Certains aliments comme les céréales, contiennent des protéines qui sont relativement faibles en acides aminés comme la lysine. La lysine peut être ajoutée pour améliorer la qualité nutritionnelle des céréales. La fermentation utilisant les bactéries *Corynebacterium glutamicum* et *Brevibacterium flavum* permet de produire à la fois de l'acide glutamique et de la lysine.

2. Acide citrique et additifs alimentaires

L'acide citrique est ajouté aux boissons gazeuses, confiseries et médicaments. Dans le passé, il était fabriqué à partir d'agrumes, mais maintenant, près de 99% de la production mondiale (plus de 300 000 tonnes) provient de la fermentation d'une moisissure : *l'Aspergillus niger*.

Les micro-organismes sont également employés pour faire des additifs qui améliorent la consistance des aliments. Plusieurs protéines sont produites par des micro-organismes. Elles sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire comme épaississants, émulsifiants ou charges ? Ces additifs peuvent stabiliser la structure alimentaire et améliorer l'apparence et le goût du produit. Les plus courants sont les gommes de xanthane et le dextran produites respectivement par les espèces de *Xanthomonas* et les bactéries *Leuconostoc*.

3. Dans le secteur pharmaceutique

C'est actuellement le secteur d'application privilégié des biotechnologies qui représente 40,6% de l'ensemble de ce marché. Les produits commercialisés ont une haute valeur ajoutée et les industriels de la pharmacie.

- Les antibiotiques sont des composés de structure variable produits par diverses espèces de micro-organismes ou par synthèse. Ils possèdent la propriété d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes et constituent les plus importants produits anti-infectieux disponibles à ce jour.
- Les vaccins, produits du sang et réactifs de diagnostic devraient voir leurs marchés doubler dans la décennie à venir grâce à un abaissement sensible du coût de production.
- Les hormones (peptidiques, anti-inflammatoires..) se prêtent bien à une production par des procédés biotechnologiques car elles ont une forte valeur ajoutée. Le génie génétique rend possible la production d'insuline, de somatostatine et d'hormone de croissance.
- Les vitamines obtenues par fermentation sont la vitamine B12 et les précurseurs des vitamines A et B2.

4. La chimie

Il est possible de produire par voie biologique deux molécules de base de la chimie organique: le méthane et l'éthylène. La première est obtenue directement par fermentation et la seconde à partir de l'alcool éthylique produit biologiquement. D'autres fermentations peuvent également être utilisées et conduire à la fabrication de produits de grande consommation : l'acétone, le butanol, le glycérol, le butanediol, les acides organiques, les biodétergents, les huiles et les graisses...

5. L'agriculture

Deux types de production présentent un intérêt industriel : les bioinsecticides et les biopesticides.

6. L'énergie et environnement

Dans le domaine d'énergie, la production d'éthanol des micro-organismes à partir de la fermentation des plantes sucrières (canne à sucre, sorgho, betterave, topinambours) est devenue une réalité industrielle. Les polluants sont majoritairement des composés organiques (hydrocarbures, composés phénolés et chlorés,...) mais la contamination par des métaux est également importante. La biodépollution de sols ou d'eaux par les micro-organismes repose sur l'exploitation de leurs capacités à réaliser l'ensemble de ces réactions. Dans un contexte énergétique marqué par la nécessité de développer des énergies renouvelables, l'utilisation des micro-algues pour la production de biocarburants apparaît comme un secteur d'avenir. Le développement viable écologiquement et économiquement de ces biocarburants Permettra de surmonter :

- La réduction des coûts de production.
- La maîtrise du rendement, grâce à l'utilisation de microorganismes génétiquement modifiés.
- Le développement de mesures de précaution pour limiter les risques de multiplication des micro-algues dans le cas de culture extensive.
- La nécessité d'étudier plus en détail l'impact de la culture de micro-algues sur l'effet de serre.
- L'identification des espaces appropriés et disponibles pour la culture extensive de micro-algues, etc.

La culture de micro-algues pour une production de biomasse économiquement rentable se fait à l'aide de divers types de photo-bioréacteurs dont la mission. Pour une valorisation commerciale des algocarburants, le coût de production se chiffrerait idéalement à 1 €/kg de biomasse produite.

Chapitre II : Utilisation des microorganismes dans les fermentations alimentaires

Objectifs : Les objectifs fondamentaux de ce chapitre sont :

- Renforcer les compétences des étudiants en lien avec le secteur des bio-industries alimentaires et ainsi que les connaissances sur la diversité et les fonctionnalités des flores technologiques ;
- Développer des informations du domaine des bioproductions (produits fermentés, bioingrédients, ferments...) ;
- Développer les connaissances approfondies sur les microorganismes d'intérêt technologique et de leurs fonctionnalités dans le secteur alimentaire.

Introduction

Les aliments ou les boissons fermentés sont obtenus **par fermentation** du produit alimentaire jusqu'à un niveau d'exigence souhaité. La fermentation est issue **des microorganismes** telles que des bactéries, des levures ou des moisissures. Grâce à la fermentation, les aliments sont **plus nutritifs, plus savoureux et plus faciles à digérer**. De plus, cette fermentation améliore la **sécurité alimentaire**, en aidant à conserver les aliments et à **augmenter** leur durée de vie, réduisant ainsi le besoin de réfrigération ou d'autres méthodes énergivores.

La qualité des aliments proposés aux consommateurs s'améliore constamment grâce à une plus grande maîtrise des procédés de fabrication et au développement des technologies nouvelles. Actuellement, l'évolution scientifique et technique se caractérise par la mise en place de nouveaux outils, qu'il s'agisse de procédés de traitement et de conservation ou, plus fondamentalement, des biotechnologies. Celles-ci recouvrent les techniques utilisant les potentialités des micro-organismes, des cellules végétales, ou animales, ou des fragments biochimiquement actifs qui en dérivent. Ces techniques font appel à des connaissances fondamentales, issues principalement de la biologie, de la biochimie, de la microbiologie, de l'enzymologie et de la génétique. Leur mise en œuvre au stade industriel et commercial constitue la bio-industrie.

La levure est le micro-organisme le plus familier, elle intervient aussi bien dans la nourriture que dans la boisson. Elle est utilisée dans la fabrication du pain, où elle joue un rôle majeur dans la production de la texture spongieuse mais aussi pour fabriquer des boissons alcoolisées.

La levure transforme les sucres complexes des céréales. Son utilisation dans la panification a surement débuté par hasard. Mais, aujourd'hui des cultures de levures sont produites et contrôlées par des industries spécialisées dans leur production. L'importance de la levure industrielle a entraîné plus de 600 scientifiques de 96 laboratoires du monde entier à collaborer sur le projet du séquençage du génome de la levure. Cela a abouti à la publication complète du code génétique de la *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulanger) en 1997.

La fabrication de produits laitiers représente la deuxième industrie de fermentation la plus importante (après la production de boissons alcoolisées). En effet, le fromage est fabriqué dans presque tous les pays. Cette fermentation facilite la transformation du sucre du lait (le lactose) en acide lactique par les bactéries lactiques. Ce processus contribue au développement du goût

particulier des yaourts ou des fromages. Il participe aussi à la prévention dans la détérioration de l'aliment et dans la limitation de croissance des organismes pathogènes. Encore une fois, le rôle des micro-organismes dans la production de produits laitiers a évolué à partir d'une découverte accidentelle.

Aujourd'hui, un défi majeur pour l'industrie de la fermentation des produits laitiers est de fournir des souches de bactéries stables. Il existe de nombreuses possibilités pour l'utilisation de bactéries lactiques par d'autres moyens. Il s'agit notamment de leur utilisation comme des bactéries bénéfiques dans les cultures probiotiques, celles qui complètent et aident nos bactéries intestinales à fonctionner plus efficacement. Le marché mondial pour ces produits continue à augmenter en fonction des demandes des consommateurs de plus en plus soucieux de leur santé.

II.1. Origine de la flore des aliments

En microbiologie industrielle, le terme de fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de microorganismes.

La fabrication d'un grand nombre de produits alimentaires se base sur le métabolisme de micro-organismes, que l'on peut regrouper sous le terme de microflore positive. Celle-ci intervient dans l'élaboration de certains aliments par fermentation et/ou contribution au processus d'affinage (fromage ou charcuterie).

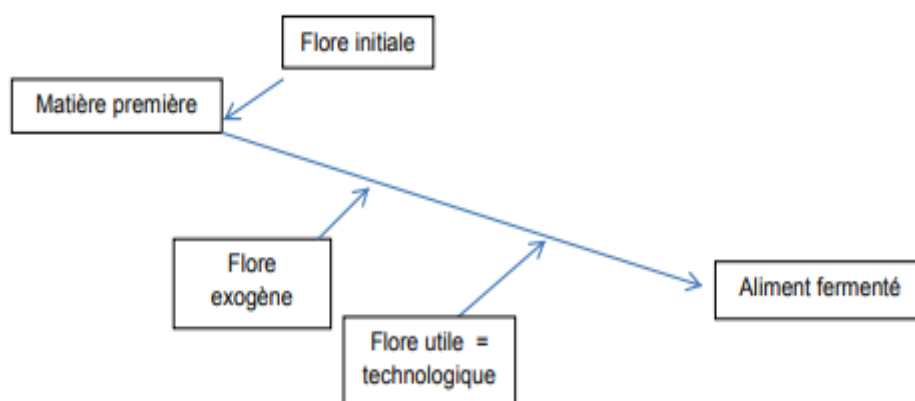


Figure 6. Sources des microorganismes de matrice alimentaire.

La flore microbienne constitutive des levains naturels dépend de 4 sources ou facteurs principaux :

- Les **matières premières** entrant dans la composition du produit. Un écosystème microbien sauvage est naturellement présent sur et dans les matières premières utilisées pour la fabrication du produit fermenté. Celui-ci va évoluer du fait des fabrications successives, et la sélection des microorganismes les plus adaptés au milieu de culture va s'opérer,
- L'**environnement de travail** dans lequel s'organise la production (air, hygiène des opérateurs, matériels),
- Le **processus de fabrication** utilisé (technologie, conditions : température, mais aussi

savoir-faire),

- Les **apports exogènes** (levains commerciaux par exemple).

Les levains naturels exercent également une bioprotection contre les microorganismes indésirables (pathogènes ou flores d'altération) pour l'homme via la compétition pour l'accès aux ressources présentes dans le milieu (effet barrière), et/ou la production de composés antimicrobiens ou inhibiteurs tels que des bactériocines et des acides organiques.

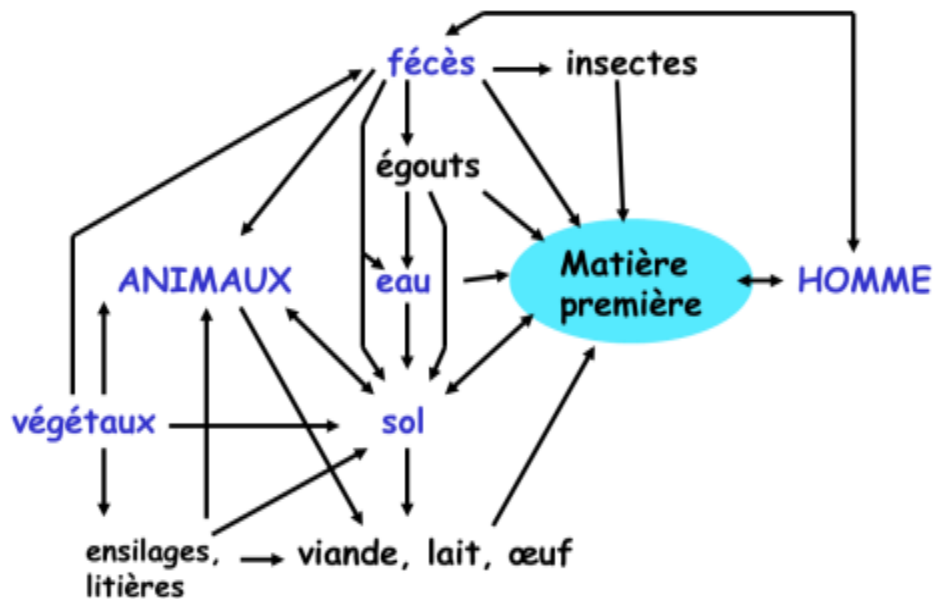


Figure 7 : Origine des microorganismes présents dans la matière première.

Les levains technologiques, responsables de l'acidification ou de l'alcoolisation du milieu, sont utilisés lors de la première phase de transformation/fermentation. Ils agissent donc très tôt. Les levains d'affinage contribuent au vieillissement du produit. On parle davantage de flores d'affinage ou de surface. Si l'on se réfère à l'étymologie du mot, les flores de surface par exemple ne sont pas des levains à proprement dits.

Le processus de sélection des ferments est complexe, sera basé sur des propriétés technologiques fonction des caractéristiques du produit fermenté, et devra répondre à des critères de conservation, et de compatibilité avec les autres microorganismes éventuellement présents dans le produit.

II.2. Le pain

Depuis des siècles, le pain est un aliment de base pour de nombreux peuples. Aujourd'hui encore dans notre pays, le pain reste un aliment présent dans tous les repas. Le pain est un produit qui s'inscrit dans le quotidien et la tradition. Le pain a donc toute sa dimension historique et symbolique dans notre pays. Le pain est l'un des plus anciens aliments fabriqués et consommés par l'homme.

Pour le botaniste, le blé est une plante de la famille des graminacées (ou graminées) réunissant l'ensemble des céréales, la canne à sucre et toutes les herbes qui tapissent les prairies.

Il existe deux sortes de blé. Pour faire du pain, il convient de planter du blé tendre (*triticum vulgare*), seul propre à faire de la farine panifiable. Le blé dur (*triticum durum*) est, quant à lui,

utilisé pour la semoulerie et pour la préparation des pâtes alimentaires (pour l'homme ou pour les animaux).

Le grain de blé a une jolie forme arrondie, fendue en son milieu, un peu comme un grain de café. La coupe du grain fait apparaître 3 parties :

Les enveloppes (le son) représentant 14 à 15 % du grain : On y distingue le péricarpe -enveloppe du fruit- le tégument de la graine et l'assise protéique (60 % des enveloppes).

Le germe représentant environ 1,4 % du grain. Son rôle consiste à former précisément la future plante.

L'albumen ou amande représente 83 à 85 % du poids du grain. L'amande contient un réseau de gluten, protéine dont les mailles enferment des grains d'amidon. C'est le gluten qui confère à la farine la propriété de former une pâte élastique lorsque l'on y ajoute de l'eau.

II.2.1. Définition du pain :

Le pain est le résultat de transformations physiques, de réactions chimiques et d'activités biologiques très complexes qui se produisent au sein d'un mélange de farine, d'eau, de sel et d'un agent de fermentation (levure et/ou levain) et parfois d'autre ingrédients (émulsifiants, corps gras, enzymes exogènes), sous l'action d'un apport contrôlé d'énergies mécanique et thermique.

Les quatre ingrédients utilisés dans la fabrication du pain sont : la **farine, l'eau, le sel et la levure ou levain...** Pour 100 Kg de farine, les proportions des ingrédients sont : de 62 litres d'eau, 2 kg de levure et un peu moins de 2 Kg de sel.

II.2.2. Les caractéristiques des ingrédients :

La farine : est l'élément de base. Les qualités de la farine, ses caractéristiques et ses propriétés ont une influence directe sur le pain. Elle lui donne son goût, sa couleur et sa consistance. Le boulanger peut parfois utiliser des mélanges tout prêts soigneusement élaborés par le meunier, appelés "**mixes**", et destinés à fabriquer un pain spécifique (pain aux céréales...). Le boulanger choisit une farine différente pour chaque type de pain.

Le blé tendre (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*) encore appelé **froment** est l'espèce la plus importante de blé cultivé. Il est destiné à fabriquer la farine dite **boulangère** ou panifiable. Plus le taux d'extraction augmente, plus la farine contient de minéraux non recherchés (provenant de l'écore) et plus sa couleur s'assombrit et plus les protéines sont abimées par le broyage.

Les produits de la mouture

1. **La Farine:** C'est le principal produit de la mouture, constitué de particules très fines. Les farines passent à travers des tamis à diamètres 0,1mm. Par convention ce tamis est appelé 10xx.

2. **La Semoule:** Leur grosseur est variable. Les grosses semoules sont retenues sur les tamis N° 40 (0,5mm) Les Fines Semoules sur les tamis à diamètres de maille plus faible

3. **Les Finots:** C'est des Semoules très fines et très pures. Leur granulométrie varie autour de 0,2mm

4. **Les Gruaux:** C'est des produits analogues aux Finots Ils proviennent de la réduction des semoules en tête du CL et du C Leur granulométrie varie autour de 0,2mm

5. **Les Issus:** Produits finis, autre que la farine:

- Les Sons: Constitués par les enveloppes des grains et une certaine partie de l'amande (gros et fins);
- Les Remoulages: comprennent un mélange d'enveloppes + ou – broyées, et comprend:
 - R.bis: plus gros, de couleur rouge (refus final du CL)
 - R. blancs: + fins, + riches en farine (refus final du C)

NB: - Le Bilan d'une meunerie à un taux d'extraction 75% (Farine 75%)
- Plus le taux d'extraction est élevé , plus la F est médiocre

Tableau 2 : Les types de Farine classées selon le taux de cendre (minéraux) et taux d’extraction.

Types (T)	Taux de Cendres	Taux D’Extraction	Utilisation
T 45	Moins de 0,5%	67%	Farine pâtissière Farine très blanche
T 55	0,5 à 0,60 %	75%	Farine panifiable F. blanche
T 65	0,6 à 0,75%	78 %	Farine pour biscuitier F. crème
T 80	0,75 à 0,90 %	80 à 85 %	Farine bis ou semi-complète
T 110	1 à 1,20 %	85 à 90 %	Farine complète
T 150	Plus de 1,40 %	90 à 98 %	Farine integrale

II.2.3. Autres catégories de farines :

- **Farine complète:** la farine complète contient une partie des éléments de la mouture du grain de blé; elle sert surtout en boulangerie
- **Farine de meule:** c’est une farine obtenue par broyage du grain sur des meules en pierre. Elle est du type 65 et à une coloration plus foncée.
- **Farine biologique:** Elle provient de blé cultivé en respectant les normes et critères de l’agriculture biologique; Les emballages portent la certification AB. Se servir de cette farine implique des règles strictes de fabrication. Surtout utilisés en boulangerie.
- **Farine composée:** ce sont des mixes que l’on utilise sans problème pour la confection de: pâte levées, sablés, biscuit, etc. ils ont tendance à standardiser les goûts.
- **Farine de gruau:** la farine de gruau est une farine de force ayant un taux de gluten supérieur aux autres farines, elle a de très bonne qualité plastique et convient bien pour la fabrication des pâtes feuilletées levées ou non.

- **Farine de force**: provient d'un mélange de très bon blé dont la teneur en gluten est spécialement élevée. Elle convient particulièrement pour la viennoiserie.

- **Farine de gluten**: la farine de gluten sert à la fabrication des pains de régime et à renforcer les farines trop faibles.

La teneur en eau ou humidité est le premier paramètre mesuré a Généralement comprise entre **14,00 et 16,00 %** ; elle résulte du niveau d'humidité auquel le blé est conditionné, du diagramme de mouture et de l'hygrométrie de l'air le jour où le blé a été écrasé. En pratique, on ne s'en inquiétera que si elle **dépasse 16,00 %**, car alors la farine est susceptible **d'évoluer rapidement et de s'acidifier**. Certaines farines qui doivent être conservées longtemps (export - stocks militaires) subissent un étuvage afin d'amener leur teneur en eau en dessous de **12,00 %**.

II.2.4. Propriétés des protéines du blé

Le grain de blé tendre contient entre 9 et 12% de protéines (/MS). Ces protéines sont constituées par les : albumines (9%) et les globulines (5%). Ces deux protéines proviennent essentiellement de la couche à aleurones.

Les protéines de la farine de blé sont multiples et complexes. Certaines d'entre elles, insolubles dans l'eau (gliadines, gluténines), s'associent en milieu hydratées pour former le gluten (86%) essentiellement localisé dans l'albumen.

Un Test simple permet de déterminer la qualité des protéines, il consiste à déterminer le volume de sédimentation d'une suspension de farine en milieu acide. Plus les protéines sont de bonne qualité, plus elles absorbent de l'eau, plus le vol. de sédimentation est élevé (**Voir TP qualité des farines**).

En général **Vol = 18 à 38 ml**. Si supérieur à **38 ml** alors on a un blé de force

L'agglutination des protéines confère aux produits des propriétés visqueuses et élastiques: il peut alors s'étendre pour former une membrane capable de retenir les gaz de fermentation lors de la panification. Cette spécificité des protéines du blé lui donne le qualificatif de panifiable (apte à produire des pains à structure alvéolaire aérée). On remarque aussi que le gluten va facilement pouvoir se lier avec : l'eau grâce à ses **acides aminés polaires** (gr. amides, hydroxyles), les lipides grâce aux **acides aminés non polaires**.

C'est la teneur en gluten qui donne aux blés tendre ses **qualités panifiables**, c'est à dire ses capacités à donner du pain. En effet, les blés (et farine) riches en gluten sont appelés blé (farine) **de force** et donneront des pâtes très élastiques. Ces blés **ou farines de forces** servent **d'améliorant** pour corriger les blés « faibles ».

Les protéines sont classées selon leurs caractéristiques de solubilité en :

- Les albumines (5 à 10% des protéines totales du blé) sont globulaires et solubles dans l'eau. Elles sont essentiellement concentrées dans la périphérie du grain et dans le germe.

- Les globulines (5 à 10% des protéines totales du blé) sont globulaires et solubles dans les solutions salines diluées. Elles se concentrent dans la périphérie du grain.
- Les gliadines (40 à 50% des protéines totales du blé) sont solubles dans les solutions alcooliques. Elles se concentrent dans l'amarante. On les retrouve dans le gluten, auxquelles elles apportent des propriétés visqueuses (fluidité, extensibilité). Leur poids moléculaire varie de $3.5 \cdot 10^4$ à $9 \cdot 10^4$ Da.
- Les gluténines (30 à 40% des protéines totales du blé) sont solubles dans les solutions d'acides et d'alcalis. Elles confèrent au gluten ces caractéristiques élastiques, sa cohésion et sa résistance aux déformations. Leur poids moléculaire varie de 10^5 à $3 \cdot 10^6$ Da. Comme les gliadines on les trouve principalement dans l'albumen du grain. Les **gluténines** (protéines linéaires) responsables de l'élasticité des pâtes notamment par la présence de ponts disulfures interchaines. Pour augmenter l'élasticité des pâtes en panification, on va pouvoir **oxyder les groupement thiols** ($-\text{SH}$) libres du gluten pour former des ponts disulfure (S-S) entre les chaînes de gluténines.

Les lipides : Un moyen de contrôler la bonne conservation de la farine est de doser la teneur de la farine en acide gras libre. Une mauvaise conservation des blés ou farine se traduira par une hydrolyse enzymatique (augmentation des AG libres) puis une oxydation de ces lipides (**rancissement**). Les lipides (ajoutés) ont néanmoins un rôle important en panification puisqu'ils : jouent un **rôle d'agent lubrifiant et tensioactifs** (pâte briochée riche en MG par ex) se lient par des liaisons « hydrogène » au gluten et à l'amidon améliorent l'extensibilité des pâtes et donc la levée.

L'amidon : ce sucre à assimilation lente et non fermentescible (**25% amylose+ 75 % amylopectine**). les levures ne peuvent utiliser que **les sucres fermentescibles** (glucose, maltose) mais pas directement l'amidon qui devra au préalable être hydrolysé par une enzyme naturellement présente dans la farine : **l'amylase**.

Les fibres : ce sont **les lignines, cellulose et hémicellulose** qui sont surtout présentes au niveau de l'enveloppe (**son**) ; ces fibres ont un intérêt diététique puisqu'elles **facilitent le transit intestinale** mais n'ont aucune valeur nutritionnelle (**non digérées**). Pendant la cuisson, les hémicelluloses de type pentosanes favorisent le gonflement et la capacité de rétention en eau.

Les enzymes

Les enzymes (amylases) : ont un rôle technologique important. Ces enzymes naturellement présentes sur le blé hydrolysent l'amidon en sucre fermentescible (glucose, maltose, dextrines) nécessaires à la levure (*S. cerevisiae*)

L'eau :

L'eau dissout le sel à l'intérieur de la pâte puis, elle hydrate la farine qui va passer de l'état de pulvérent à l'état pâteux. Les grains d'amidon vont se charger d'eau et gonfler ; le gluten va s'assouplir et devenir élastique.

La levure biologique se nourrit d'eau, prend vie et se multiplie pour dégager du gaz carbonique : l'eau est nécessaire à la fermentation. Cette fermentation sera retenue prisonnière par un tissu élastique formé par le gluten imbibé d'eau. Elle apportera la souplesse nécessaire à la formation d'un pâton allongé ou d'une boule.

Avant l'enfournement, en se déposant sur la surface du pâton, elle permettra la caramélisation des glucides et participera à la formation de la croûte. Elasticité donnée par le gluten.

L'eau, composant indispensable d'une pâte, **a plusieurs fonctions** dans la boulangerie:

- **Hydratation des composants de la pâte** : Cet effet est primordial pour les propriétés de la pâte (la plasticité), dans ce sens, que les composants de pâte insuffisamment ou non hydratés empêchent tout simplement **le développement de la pâte**.
- Elle **active également les systèmes enzymatiques** en entraînant une augmentation de l'acidité du milieu. Les précurseurs d'arôme apparaissent.
- Gonfle les grains d'amidon, assure l'assouplissement et l'allongement du gluten,
- **Crée le milieu favorable au départ de la fermentation paninaire.**

Le sel :

Sans lui, le pain est terne et fade. Le sel représente environ 2% du poids de la farine en panification.

Le sel est un des quatre éléments de constitution du pain. Sans lui, le pain est terne et fade. Il n'est pas agréable à la vue ni au goût. Le sel représente environ 2% du poids de la farine en panification. La dose moyenne utilisée est donc de 20 g (sel fin) par kilo de farine.

Ses réactions sont importantes :

- Il donne du goût, de la saveur au pain, et contribue au développement des arômes.
 - Il agit sous l'action de la levure en ralentissant la production gazeuse.
 - Réagissant sous le gluten, il améliore les propriétés plastiques.
 - Etant hygroscopique, il retient l'humidité et permet ainsi à la mie de conserver son moelleux.
 - Il participe à la coloration de la croûte.
 - Il diminue l'activité enzymatique des lipoxygénases responsables de l'oxydation des pigments caroténoïdes de la farine,
 - Il augmente la durée de conservation en diminuant la mobilité de l'eau.
 - Il a également un effet au cours de la cuisson en retardant la gélatinisation de l'amidon.
- Ces phénomènes sont moins intenses si le sel est ajouté en début de pétrissage. Cependant, l'incorporation tardive du sel favorise le blanchiment de la pâte.

La levure

Dans la fabrication du pain, la levure utilisée est la levure dite « levure boulanger » qu'il ne faut pas confondre avec la levure chimique. La levure de boulangerie — *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée à une dose moyenne en panification qui varie actuellement entre 1 et 1,5 %. **Elle est à l'origine de levée de la pâte, provoque la fermentation en transforme les sucres (le glucose) en alcool et en gaz carbonique (presque la totalité du CO₂ nécessaire à cette levée).**

Les levains

Les levains sont constitués d'une pâte de fermentation, provenant d'un mélange de farine et d'eau, avec ou sans apport de levures **et renouvelée à partir de ce mélange, une fois qu'ils ont subi une fermentation, par addition de farine et d'eau effectué de manière méthodique.** Les levains comprennent naturellement des micro-organismes acidifiants. **La fermentation se fait à partir des levures sauvages et des bactéries présentes dans les matières premières utilisées ce qui favorise la fermentation acide.**

Dans la flore naturelle présente chez les céréales existent plusieurs genres de levures, le plus important est *Saccharomyces* dont les espèces les plus courantes sont :

- *S. cerevisiae* est l'espèce majoritaire (certains auteurs, trouvent que 80 % des levures présentes sur des levains pour pains français appartiennent à cette espèce).
- *S. exigus*.
- Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactobacillus

Les bactéries lactiques peuvent appartenir à de nombreux genres tels que Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactobacillus: ce dernier est le plus important puisqu'il représente au moins 80 % des souches de bactéries isolées dans un levain.

Parmi les bactéries lactiques on rencontre des espèces homofermentaires qui ne produisent à partir du glucose de la farine que de l'acide lactique et des espèces hétérofermentaires qui produisent en plus de l'acide lactique, l'acide acétique et de l'éthanol. Les principales espèces hétérofermentaires sont *L. brevis* et *L. fermenti*

Les Lactobacillus sont bien adaptés aux conditions physico-chimiques de la pâte (substrat nutritif complexe assez riche en vitamines et acides aminés, anaérobiose).

En général, avec une flore composée de souches homofermentaires et hétérofermentaires le pH du levain descend à 3,5 à 4,0 ce qui correspond à environ 8-10 g d'acide lactique et 1 à 2 g d'acide acétique par kilogramme de levain.

La température optimum de croissance de ces bactéries est de 30-35°C. À 25°C l'acidification est plus lente et peut être un peu plus faible (6 g acide lactique/kg de levain). En effet même s'il a été possible d'isoler les espèces comme *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Flavobacterium sp*, *Pseudomonas sp*, ou *Bacillus sp*, elles ne sont présentes qu'en très faible proportion. Ces espèces peuvent être classées dans la flore indésirable, dégageant des odeurs désagréables n'ayant aucun rapport avec celles du levain.) **Le**

développement d'une de ces souches peut expliquer parfois le fait qu'un levain soit jugé inapte à produire un bon pain.

II.2.5. Les améliorants et correcteurs

Selon le cas, la farine peut être renforcée soit par un apport de **gluten**, soit par de **l'acide ascorbique** (ou vitamine C) ou **la lécithine de soja** (émulsifiant qui accroît le volume du pain, lui donnant un plus bel aspect et permettant une meilleure conservation). Elle joue aussi un rôle d'antioxydant qui se traduit par un très léger freinage du blanchiment de la pâte et de l'altération du goût du pain.

a. L'acide ascorbique (vitamine C)

L'acide ascorbique, lors de son incorporation dans la pâte, se transforme en acide déhydroascorbique aux propriétés oxydantes. En effet, il améliore la tenue des pâtons et le développement à la cuisson en renforçant la ténacité du gluten ; augmente la ténacité et la force des pâtes; permet d'obtenir, éventuellement, des pâtes un peu moins collantes et enfin, il augmente la tolérance des pâtes et d'obtenir ainsi des pains plus volumineux.

En panification ; Il s'agit d'un puissant réducteur capable de créer des ponts disulfures entre les chaînes protéiques du gluten, ce qui permet de renforcer le réseau glutineux, et améliore donc la fermeté de la pâte qui va retenir davantage les gaz de fermentation.

Pour le pain ordinaire, il est précieux avec les farines faibles ou au gluten mou, il est contre- indiqué avec les farines fortes ou au gluten tenace. Par contre, dans la fabrication du pain par pétrissage accentué ou avec les pâtes levées sucrées, son action, bien que plus ou moins notable, est toujours positive.

La législation sur la répression des fraudes autorise son emploi dans la limite de 30 g au quintal de farine. Pratiquement, l'acide ascorbique agit à très faible dose, dose qu'on ne peut dépasser sans courir le risque d'aboutir à de mauvais résultats. Soit à l'état brut ou sous forme de comprimés, l'acide ascorbique est préalablement mis en solution dans l'eau et c'est à l'aide de cette solution qu'il est incorporé à la pâte lors du pétrissage.

b. L'acide citrique :

Son emploi est uniquement autorisé dans la fabrication du pain de seigle, afin d'acidifier légèrement la pâte, d'obtenir un pain plus savoureux, à mie moins collante et de meilleure conservation. Il peut être utilisé jusqu'à concurrence de 350 g au quintal de farine.

c. Le gluten :

C'est un fixateur d'eau, il permet la diminution du phénomène collant sans modification de l'hydratation de la pâte. Il augmente aussi la consistance de la pâte, c'est-à-dire qu'il améliore sa stabilité et augmente sa résistance élastique. En développant le réseau protéique, le gluten favorise la rétention gazeuse et par conséquent l'augmentation de volume.

d. La lécithine :

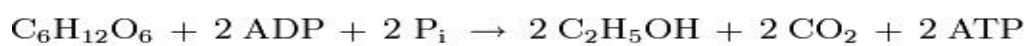
Peut être utilisée à dose de 100 à 300 g/quintal de farine. C'est un agent émulsifiant dont l'action tend à lubrifier la pâte et à améliorer son extensibilité. Elle joue aussi un rôle d'antioxydant qui se traduit par un très léger freinage du blanchiment de la pâte et de l'altération du goût du pain.

e. Les sucres :

Le saccharose entre dans la composition des produits viennois dont il facilite la fermentation et accroît la finesse.

II.2.6. La fermentation paninaire

La fermentation alcoolique est le résultat d'une chaîne métabolique qui transforme des sucres fermentescibles par des levures en alcool et gaz carbonique avec dégagement de chaleur :



La fermentation commence au moment de l'incorporation de la levure pour s'arrêter qu'au cours de la cuisson. Ce sont les levures qui, grâce aux sucres et à l'amidon endommagé présents dans la farine, se multiplient en produisant du CO₂ sous forme gazeuse. C'est ce CO₂ qui fait gonfler mécaniquement la pâte. Si l'on tarde trop à mettre au four, le pain est trop levé et retombe comme un soufflé : le réseau gluténique qui a été organisé lors du pétrissage a été trop étiré et ne peut plus assurer son rôle de « charpente ».

Lors de la cuisson, par contre, il y a un phénomène appelé gélatinisation du gluten se produisant sous l'effet de la température, ce qui permet de consolider définitivement cette charpente et de donner au pain son apparence finale.

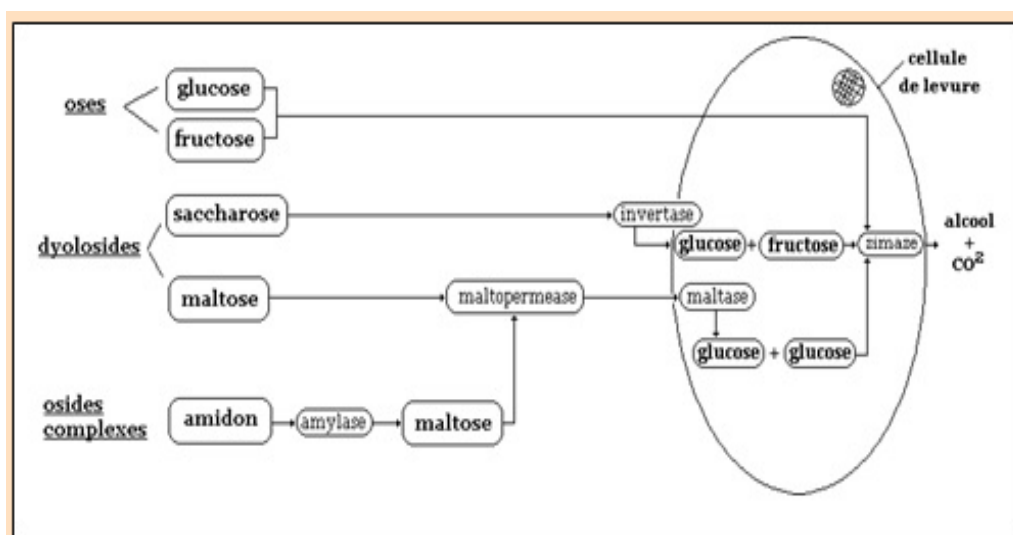


Figure 8 : Les réactions chimiques dans la pâte et dans la levure

L'amidon, en présence d'eau, est dégradé par les **amylases** de la farine en sucre plus simple : le maltose (amylolyse). Les amylases fournissent ainsi à la levure les sucres indispensables à la fermentation.

La **maltoperméase** va permettre au maltose de pénétrer dans la cellule de levure, où il est transformé par les maltases en glucose.

La **fermentation du glucose** par la zymase de la levure produit du dioxyde de carbone et de l'alcool éthylique (c'est donc une fermentation alcoolique en milieu anaérobie). Cette formation d'alcool et de produits secondaires entraîne un accroissement de la ténacité de la pâte mais aussi le développement des arômes. Le dégagement de gaz permet le gonflement de la pâte, ce qui lui confère sa légèreté.

II.2.6.1. Paramètres influençant la durée de fermentation (pointage)

De nombreux facteurs influent sur la durée du pointage :

- La température de la pâte
- La température de l'air ambiant
- La dose de levure
- La masse totale de pâte en fermentation
- La température ambiante
- L'hygrométrie de l'air
- La méthode de pétrissage
- La force boulangère de la farine
- La valeur fermentative de la farine (sa teneur en enzymes)
- La quantité de sucres préexistant dans la farine

II.2.7. Etapes de fabrication du pain :

1. Le pétrissage:

Dans un premier temps, le boulanger mélange les ingrédients dans son pétrin (eau, sel, levure et farine), on appelle cette phase le **frassage**. Le pétrissage permet d'emprisonner et de comprimer de minuscules poches d'air qui viendront parfaire l'action de la première fermentation. Durant le pétrissage, une partie de la quantité d'eau se lie à l'amidon de la farine ainsi qu'à ses protéines, alors que la quantité d'eau restante sert à dissoudre les autres ingrédients tels le sel et le sucre.

L'eau joue ici un rôle prépondérant ; celui de réaliser les réactions enzymatiques permettant la transformation de l'amidon de la farine en sucres composés (**maltose**) et sucres simples (**glucose**). Elle permet également de dissoudre le sel et de diluer la levure en créant ainsi le milieu propice aux transformations de la fermentation paninaire.

L'eau intervient aussi dans l'agglutinement, l'assouplissement et l'allongement de certaines des protéines contenues dans la farine et insolubles dans l'eau. Il s'agit des gliadines et des gluténines qui forment une matière plus ou moins molle et élastique : le gluten. Suffisamment hydraté, le gluten donne à la pâte son imperméabilité et ses propriétés rhéologiques.

Le pétrissage garantit trois fonctions importantes :

1. Le mélange des différents ingrédients en une pâte homogène (Le frassage) :
2. Le développement du réseau glutineux (travail de la pâte =étirage= pétrissage) :

3. L'emprisonnement d'air dans la pâte (soufflage)

L'étirement du réseau de gluten constitué forme une fibre qui va se renforcer par incorporation et emprisonnement de bulles d'air. La pâte devient lisse, élastique et homogène et son blanchiment est proportionnel à la durée et à l'intensité du pétrissage.

Les caractéristiques de base de la farine utilisée, le mode de panification préconisé, la quantité de pâte pétrie ainsi que sa consistance souhaitée influent sur le mode et la durée de son pétrissage. On parle ainsi de pétrissage à vitesse lente, de pétrissage amélioré et de pétrissage intensifié et ce pour des pâtes qui peuvent être fermes (hydratation < 60%), bâtardes (hydratation de 60 à 64%), douces (hydratation > 64%), ou (iv) liquides (hydratation proche de 100%).

2. Le pointage ou première fermentation:

La première fermentation est une étape indispensable dans la fabrication d'une baguette, cette étape est assez longue. Pendant cette période, appelée également pointage, la pâte est laissée au repos tandis que se poursuivent les effets du pétrissage. Les nombreuses réactions qui vont se produire sont à l'origine du gonflement de la pâte. En effet, la pâte qui doit reposer pendant plus d'une heure va se lever sous l'action du levain. Il faut une température ambiante d'environ 22°C. Durant cette étape les levures consomment le sucre contenu dans la farine produisant ainsi du dioxyde de carbone et de l'alcool : c'est la fermentation. La pâte gonfle et des arômes apparaissent

3. Le boulage et la détente :

C'est à l'aide d'un coupe-pâte, ou plus souvent à l'aide d'une machine appelée diviseuse, que la pâte est fractionnée en parts égales. Elle est ensuite généralement reprise en forme de boule que l'on laisse reposer au cours d'une période appelée détente.

4. Le façonnage :

C'est au cours de cette phase que le boulanger donne aux pâtons la forme allongée caractéristique de la baguette.

5. L'apprêt ou deuxième fermentation :

Délicatement disposé sur une toile de lin, le pâton connaît une deuxième fermentation. Au cours de l'apprêt, la baguette voit progressivement augmenter son volume, en effet le dioxyde de carbone dégagé reste prisonnier de la pâte et provoque l'apparition de nombreuses bulles. Au cours de cette étape, le volume des pâtons va tripler.

6. L'enfournement et la cuisson

Il reste encore au boulanger deux gestes à effectuer avant la cuisson de la baguette. La première consiste à inciser les pâtons à l'aide d'un objet tranchant. Ces incisions sont appelées grignes, elles sont au nombre de 5 à 7 et n'ont pas simplement un rôle décoratif. Elles canalisent l'action du gaz carbonique en lui offrant des portes de sortie qui vont s'agrandir au cours de la cuisson.

A présent, la baguette est parée pour la cuisson. Avant l'enfournement, le boulanger introduit dans le four de la vapeur d'eau qui se transforme en une mince pellicule d'eau, retardant ainsi le dessèchement inéluctable de la croûte sous l'effet de la chaleur et permettant au gaz carbonique de poursuivre plus longtemps son action de gonflement.

Les pâtons sont enfournés petit à petit, le dessous de la baguette entre en contact avec la sole du four. La chaleur dégagée sèche rapidement cette portion de pâton. Pendant la cuisson, la chaleur accélère la dilatation du gaz carbonique créant les innombrables alvéoles de la mie. Sous la poussée du gaz, les grignes s'ouvrent pour former les oreilles. L'eau s'évapore progressivement par la croûte qui forme ainsi une enveloppe quasi-étanche qui maintient le taux d'humidité de la pâte. Au cœur de la baguette, l'amidon se transforme en empois (colle d'amidon qui donne de la raideur) et le gluten coagule pour donner à la mie son apparence et sa texture définitives. Les alcools produits par les fermentations successives, se transforment en composés aromatiques.

La cuisson dure environ 20 minutes, le boulanger peut juger de la cuisson soit en appréciant la coloration de la croûte et la formation des oreilles, soit en tapant la sole de la baguette du bout des doigts, celle-ci devant raisonner.

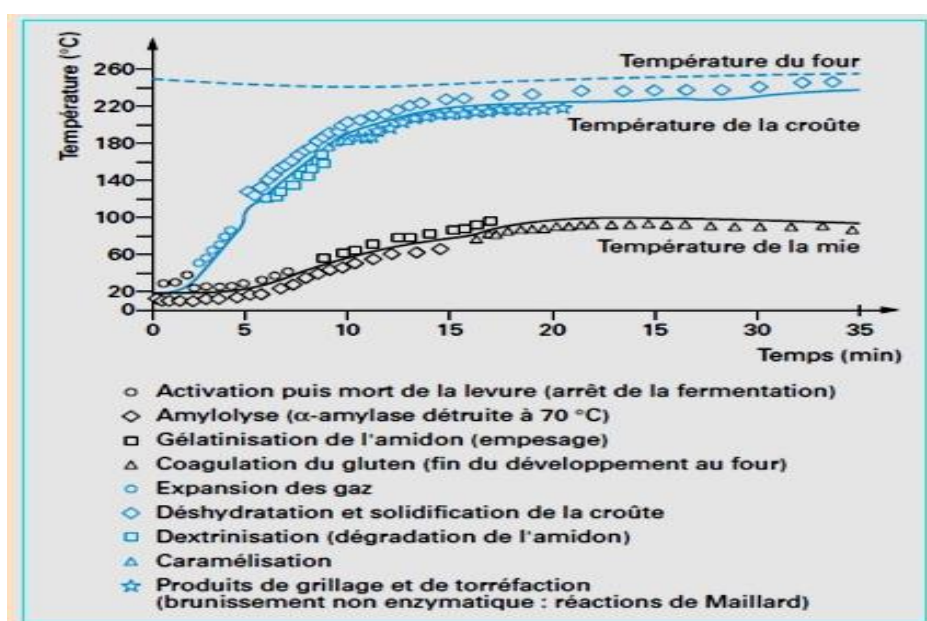


Figure 9. Actions dans la pâte lors de la cuisson

- ❖ **Jusqu'à 50°C**, la levure poursuit son action et est même suractivée, puis elle meurt. Le pain continuera de lever au-delà de cette température grâce à la dilatation du gaz carbonique formé pendant la fermentation.
- ❖ **De 55°C jusqu'à 83°C**, l'amidon non transformé en glucose se gélifie sous forme d'empois.
- ❖ **A partir de 70°C jusqu'à 98°C**, le gluten coagule pour donner définitivement sa structure à la pâte à pizza. La mie restera blanche car à aucun moment sa température ne dépassera 100°C.
- ❖ **A 100°C**, l'eau s'évapore et provoque ainsi la dessiccation de la surface du pâton. (**Formation de la croûte**).
- ❖ Enfin, sous l'effet de la chaleur et de l'humidité, grâce au maltose et aux dextrines localisés à la surface du pain, commence alors la **dextrinisation** de la croûte (+ **réactions de Maillard** : Déshydratation et solidification de la croûte : formation de produits de grillage et torréfaction, qui lui donne sa couleur et son arôme particulier).
- ❖ **Rôle de la buée au cours de la cuisson :**
 - Elle améliore l'équilibre thermique de la chambre de cuisson,
 - Elle favorise le développement des pâtons en retardant la formation de la croûte,
 - Elle favorise la formation d'une croûte fine et croustillante,
 - Elle améliore la coloration de la croûte en retardant la caramélisation des sucres,
 - Elle augmente le glaçage brillant de la croûte en délayant les sucres avec les protéines de surface,

Sous la poussée du gaz, les grignes s'ouvrent pour former les oreilles. L'eau s'évapore progressivement par la croûte qui forme ainsi une enveloppe quasi-étanche qui maintient le taux d'humidité de la pâte

Au cœur de la baguette, l'amidon se transforme en empois (colle d'amidon qui donne de la raideur) et le gluten coagule pour donner à la mie son apparence et sa texture définitives. Les alcools produits par les fermentations successives, se transforment en composés aromatiques.

7. Le défournement et le ressuage

La baguette cuite à point est retirée du four : c'est le défournement. Entreposée dans un coin sec et aéré du fournil pendant 45 minutes, elle refroidit. C'est le ressuage. Le gaz carbonique et la vapeur d'eau contenus dans la mie s'échappent en traversant la croûte, remplacés par l'air environnant.

La vente et la consommation pourront maintenant commencer...

Refroidissement du pain

- Le pain chaud est refroidi lentement, de manière à ce que sa fraîcheur dure de 12-18H, c'est donc un produit fragile.

Le pain rassit, même en atmosphère humide, ce n'est pas une simple dessiccation, ils développent «la rétrogradation » de l'amidon qui débute dès que la T° de refroidissement chute à 60°C, l'état colloïdal est modifié avec mise en liberté d'eau d'hydratation, l'amylopéctine se replie, avec des chaînes associées, prenant un nouvel état semi cristallin d'une rigidité augmentant progressivement. Parallèlement, le ramollissement de la croûte est la conséquence de la migration d'eau provenant de la mie.

La rigidité du pain rassis, peut être en partie supprimée par réchauffage vers 60°C, on provoque ainsi la dissociation de liaisons faibles dans l'atmosphère.



Figure 10. Les étapes de fabrications du pain

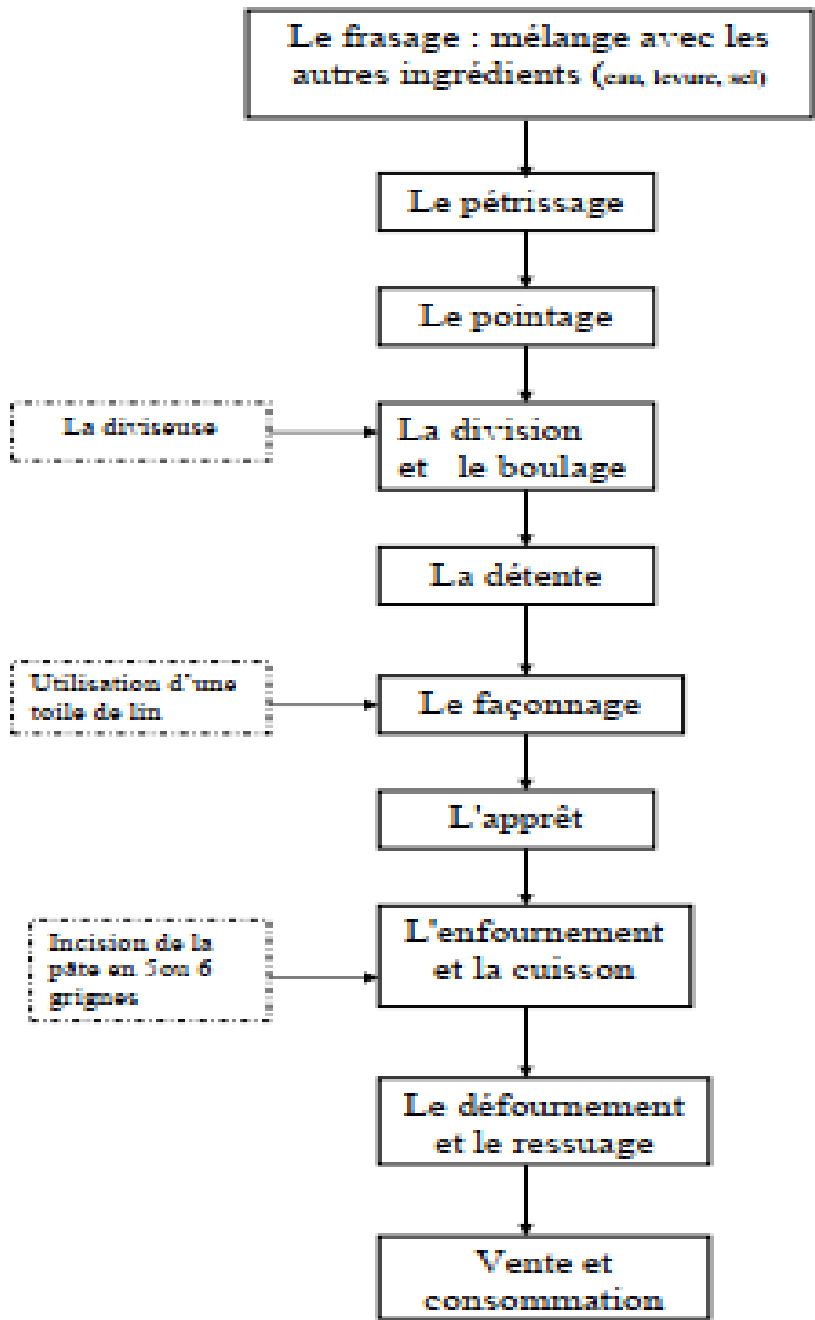


Figure 11. Diagramme de panification

II.3. Le yaourt : lait fermenté

II.3.1. Définitions et réglementation

Selon la réglementation française (décret n°88/1203 du 30 décembre 1988), un lait fermenté est un produit laitier composé exclusivement de matières premières d’origine laitière (lait et constituants du lait), ayant subi une pasteurisation et une fermentation par des micro-organismes spécifiques et caractérisé par une teneur en acide lactique minimale de 0,6 %. Il peut être additionné de certains ingrédients lui conférant une saveur spécifique (sucre, arômes, préparations de fruits, additifs), à condition que cette addition n’excède pas 30 % du poids du produit fini.

La dénomination « yaourt » est réservée au lait fermenté obtenu, selon les usages loyaux et constants, par le développement des seules bactéries lactiques thermophiles spécifiques dites « *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* » qui doivent êtreensemencées simultanément et se trouver vivants dans le produit fini à raison d’au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportés à la partie lactée.

Selon la F.A.O/O.M.S: Le yaourt est le lait coagulé obtenu par la fermentation lactique acide due à *Lb.bulgaricus* et *St.thermophilus* du lait pasteurisé ou concentré avec ou sans addition (de lait en poudre, ...) .Les microorganismes du produit final doivent être viables et abondants.

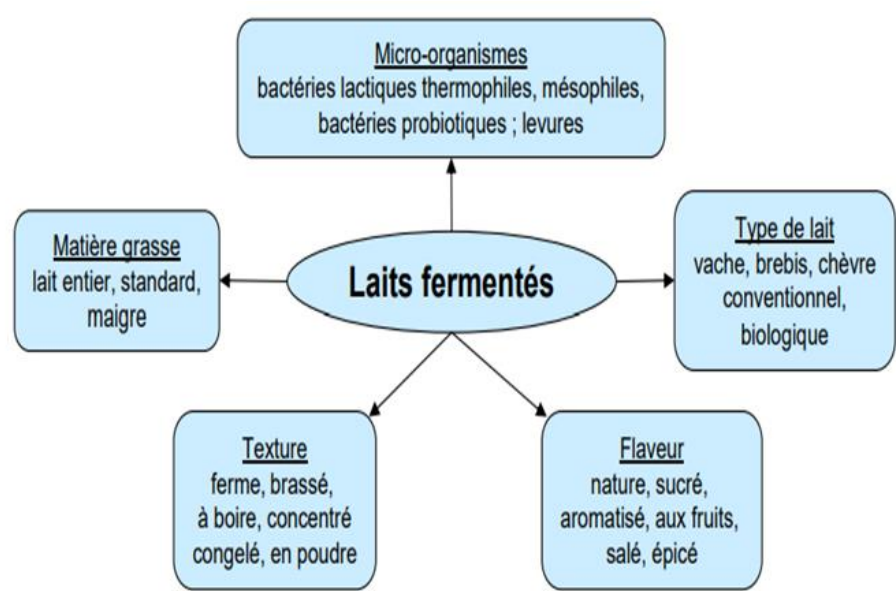


Figure 12. Schéma général des critères de classification des laits fermentés.

II.3.2. La fermentation lactique : aspect microbiologique, biochimique et physicochimique

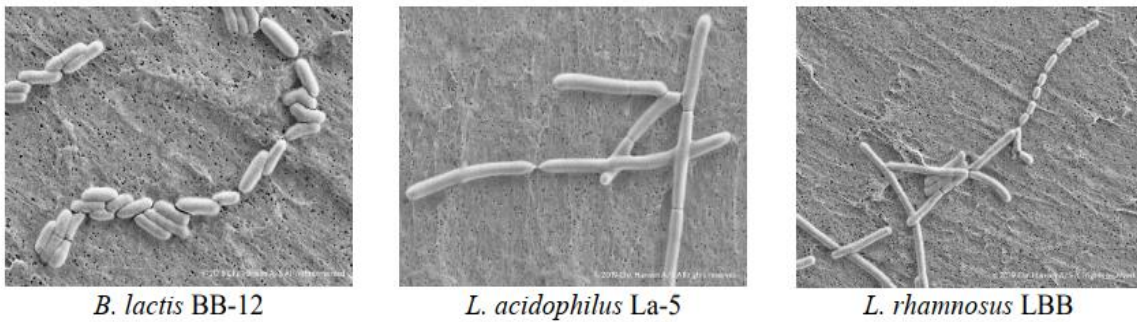
La fermentation lactique est l'étape centrale du procédé de fabrication des laits fermentés. Elle correspond à la transformation du **lactose du lait en acide lactique**, sous l'action de micro-organismes spécifiques appelés bactéries lactiques. Elle s'accompagne de modifications biochimiques, physico-chimiques et sensorielles du produit.

Thermophiles: Streptococcus thermophilus et Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus

Ces bactéries présentent toutes une parfaite innocuité, justifiée par leur absence de pathogénicité. Elles sont à ce titre considérées comme G.R.A.S. (generally recognized as safe) par la F.D.A. (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis et possèdent le statut Q.P.S (qualified presumption of safety) délivré par l'E.F.S.A. (European Food Safety Authority). Plusieurs souches de ces microorganismes sont reconnues, hors de l'Europe, pour leur caractère **probiotique**

Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus), des lactocoques (Lactococcus lactis subsp. lactis) et/ou des bifidobactéries (Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum

Les critères de choix des souches reposent principalement sur des considérations technologiques (vitesse d'acidification, résistance aux bactériophages, température optimale) et organoleptiques (production d'exo-polysaccharides, synthèse de composés d'arômes, post-acidification). Laits fermentés dits « probiotiques », le critère santé doit être considéré.



Le métabolisme du lactose se déroule en quatre étapes, schématisées sur la figure suivante :

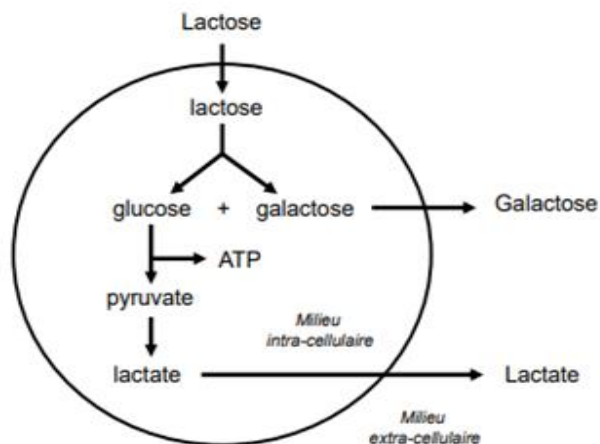


Figure 13. Schéma simplifié des réactions du métabolisme homofermentaires chez les bactéries lactiques du yaourt.

L'entrée du lactose dans la cellule est réalisée grâce à l'activité d'une enzyme membranaire : **lactose perméase dépendante** de la force proton-motrice.

Le lactose est hydrolysé en glucose et galactose sous l'action d'une enzyme (**bêta-galactosidase** ou phosphobêta-galactosidase). Le glucose rejoint alors la voie glycolytique (voie d'Emden Meyerhof-Parnas) pour former du pyruvate et de l'énergie intracellulaire stockée sous forme d'ATP (adénosine triphosphate). Chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, le galactose est excrété hors de la cellule alors que chez les bactéries lactiques mésophiles, il est métabolisé en pyruvate. Le bilan énergétique de ces réactions est égal à deux molécules d'ATP par molécule de lactose, ou à quatre, si le galactose est catabolisé ;

Le pyruvate est réduit en lactate par une réaction catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase, spécifique de ces bactéries. Cette réaction sert à réoxyder le cofacteur NAD⁺ (adénosine nicotinamide dinucléotide) précédemment réduit. Finalement, **le lactate** est expulsé hors de la cellule en même temps que deux protons (symport). Son accumulation extracellulaire provoque une inhibition de la croissance bactérienne et de sa propre production, qui s'arrêtent de façon précoce, bien avant l'épuisement des substrats. Cette inhibition est liée à l'accumulation de l'acide lactique et à la diminution du pH du milieu intracellulaire qui en résulte, qui forcent la cellule à utiliser son énergie pour maintenir son pH intracellulaire.

L'acide lactique excrété provoque une diminution du pH du lait et donc son **acidification**. Cette acidification permet **la gélification** des caséines du lait et donc la modification de la texture du

produit. Elle va aussi influencer sur la saveur des laits fermentés, dont la principale caractéristique est l'acidité

L'acétaldéhyde est ainsi synthétisé à des teneurs variables, entre 5 et 40 mg/kg, par les deux bactéries du yaourt, principalement à partir du pyruvate et à un moindre degré à partir de la **thréonine**. **L'acétoïne et le diacétyl** sont formés à partir du **citrate** du lait via l' α -acétolactate, principalement par les espèces *S. thermophilus* et *L. lactis*.

Des polysaccharides exo-cellulaires (localisés à l'extérieur de la cellule) qui participent à l'accroissement de la viscosité du lait fermenté et présentent donc un intérêt pour l'élaboration des produits brassés. **La viscosité** se caractérise par la résistance d'un gel à l'écoulement. Ces exopolysaccharides (**E.P.S.**) sont composés d'unités répétitives, linéaires ou branchées, de sucres (glucose, galactose, mannose, rhamnose, Nacétylglucosamine, N-acétylgalactosamine, fructofuranose et glucopyranose).

Les caséines, parmi lesquelles il faut distinguer **les caséines α S1, α S2, β et κ (proportions relatives : 33%, 11%, 33%, 11%) représentent 80 % de la matière azotée totale du lait**. Elles se présentent sous la forme de particules sphériques appelées **micelles**, d'un **diamètre** moyen de **150 nm**, en suspension dans le lait frais. Les micelles de caséines, chargées négativement sont constituées:

- D'un noyau **hydrophobe** (**α S et β** reliées entre elles par des ponts salins de phosphate de calcium et par des liaisons hydrophobes et électrostatiques)
- D'une enveloppe périphérique **hydrophile** (caséines **κ et α S** sont reliées entre elles par l'intermédiaire de ponts phosphocalciques).

L'acidification du milieu provoque une annulation progressive de la charge négative des micelles et leur décalcification: **La gélification par acidification lactique par solubilisation du phosphate de calcium et hydratation des micelles, à pH 4.6 il ya formation d'acido micelles. Au-dessous de pH 4,6, l'agrégation des micelles est irréversible.**

II.3.3. Caractères généraux des bactéries lactiques du yaourt

Ce sont des bactéries **Gram positif**, qui se caractérisent par une composition en guanine + cytosine (**G + C**) comprise entre **33 % et 54 %**, et se présentent sous forme de **coques** ou de **bacilles**. Elles peuvent se développer à 25-30 °C (bactéries mésophiles) ou 37-45 °C (bactéries thermophiles) mais pas à 15 °C. Lorsque l'acide lactique est le principal produit de la fermentation, le métabolisme est dit « **homofermentaires** » tandis que, si sa production est associée à une excrétion de dioxyde de carbone, d'acide acétique et/ou d'éthanol, le métabolisme est qualifié « **d'hétéro-fermentaire** ».

L'acide lactique est produit sous l'une des formes isomères L(+) ou D(−) ou bien en mélange racémique. Les bactéries lactiques sont particulièrement exigeantes en vitamines du groupe B (notamment acide pantothénique, niacine et riboflavine) même si certaines sont capables de synthétiser de l'acide folique.

Tableau 3. Caractères généraux des principales bactéries lactiques utilisées en fabrication de laits fermentés.

Espèce bactérienne	Type de métabolisme	Forme isomère de l'acide lactique	Température optimale de croissance
			(°C)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Homofermentaire	D(–)	40 à 46
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Homofermentaire	DL	35 à 40
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Hétéro-fermentaire	DL	35 à 40
<i>Lactobacillus casei</i>	Homofermentaire	L(+)	35 à 40
<i>Lactococcus lactis</i>	Homofermentaire	L(+)	27 à 32
<i>Leuconostoc</i> ssp.	Hétéro-fermentaire	D(–)	18 à 30
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Homofermentaire	L(+)	39 à 44

Une interaction mutuellement favorable aux deux espèces est appelée **proto-coopération**

- ✓ L’association est bénéfique pour les 2 souches (coopération non indispensable à leur vie);
- ✓ Cette situation est appelée protocoopération ou Symbiose;
- ✓ Cette coopération conduit à ce qui suit:
 - Réduction de la phase de latence;
 - Augmentation de la production de métabolite;
 - Meilleure résistances aux additifs (ex. Saccharose);
 - Meilleure production des agents épaississants (Ex. polysaccharides = bonne viscosité du yaourt).

Elle se traduit par une **augmentation de la vitesse d’acidification** par rapport à celles observées en cultures pures, un accroissement des concentrations bactériennes, une **protéolyse plus prononcée** et une **amélioration de la production des composés d’arômes** (acétaldéhyde notamment) et de la stabilité physique du produit (réduction des problèmes **de synérèse**).

S. thermophilus, qui présente naturellement une faible activité protéolytique, est stimulé par les petits peptides et acides aminés formés dans le lait grâce à l’activité protéolytique du lactobacille, permise par l’action de sa **protéase** de paroi **PrtB**. En retour, *S. thermophilus* fournit du **CO2** et de l’**acide formique** qui, tous deux, vont stimuler la croissance de *L. bulgaricus*.

Exemple, les bifidobactéries sont stimulées par l’activité protéolytique des lactobacilles alors que *L. bulgaricus* limite le développement de *L. acidophilus* (phénomènes de compétition et d’inhibition). Il est donc nécessaire de vérifier **la compatibilité biologique** des souches avant de les associer.

Symbiose lors du métabolisme glucidique

- ✓ Lors de leur croissance, ces ferments lactiques hydrolysent le lactose en glucose et galactose. Le glucose est ensuite utilisé lors de la glycolyse, puis dans la fermentation lactique. Cela entraîne la formation d'acide lactique, qui abaisse le pH du milieu.
- ✓ La figure montre que la culture mixte produit plus d'AC. Lactique.

Symbiose lors du métabolisme protéique

- ✓ L'association des cultures montre qu'il y a une production assez importante en acétaldéhyde

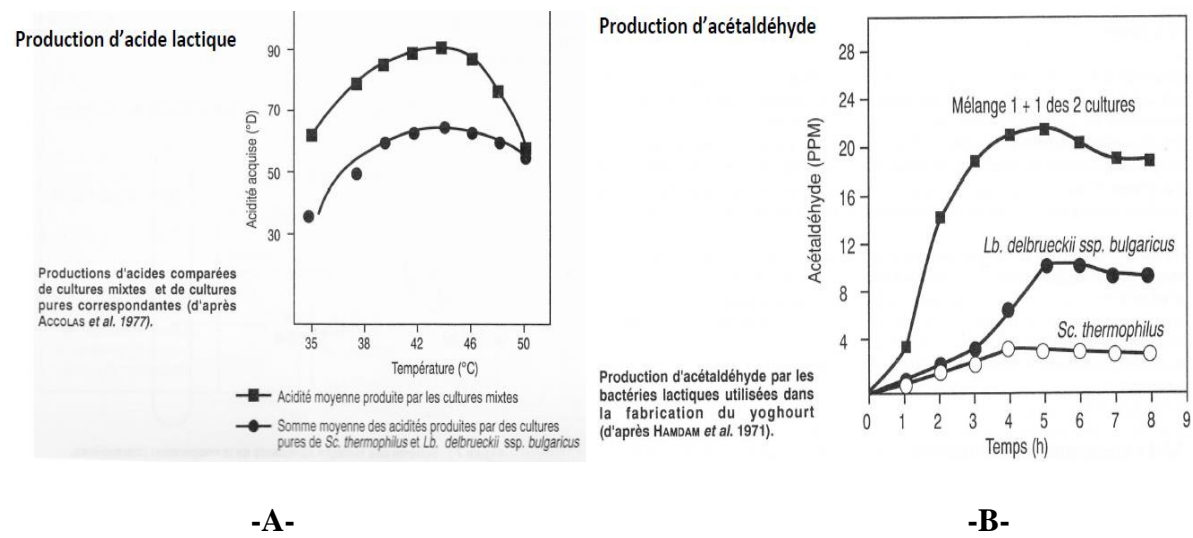


Figure 14. Symbiose lors du métabolisme glucidique (A) et protéique (B).

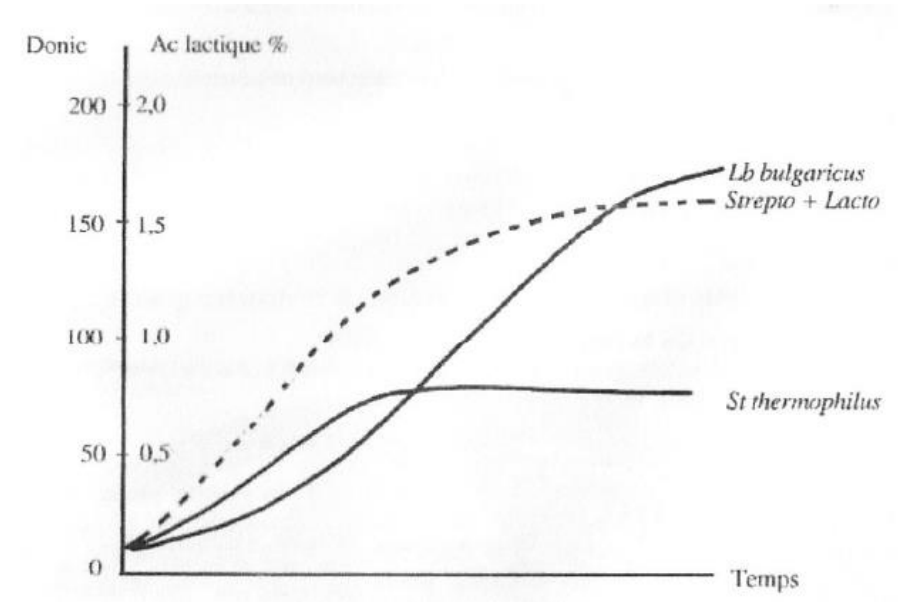


Figure 15. Production symbiotique de l'acide lactique en fonction du temps.

- ✓ La production de l'acide lactique en début de l'incubation est le fait de *St.thermophilus*, puis sous l'effet inhibiteur de l'ac.lactique, il y aura une production plus importante de cet acide par *Lb.bulgaricus*.

- ✓ *Lb.bulgaricus* + protéolytique fournirait les AA et/ ou les peptides qui joueraient le rôle d’activateurs de *St*, en contre, la croissance de *St* en absence ou à faible concentration d’Oxygène produirait l’Ac. formique stimulant le développement de *Lb*.

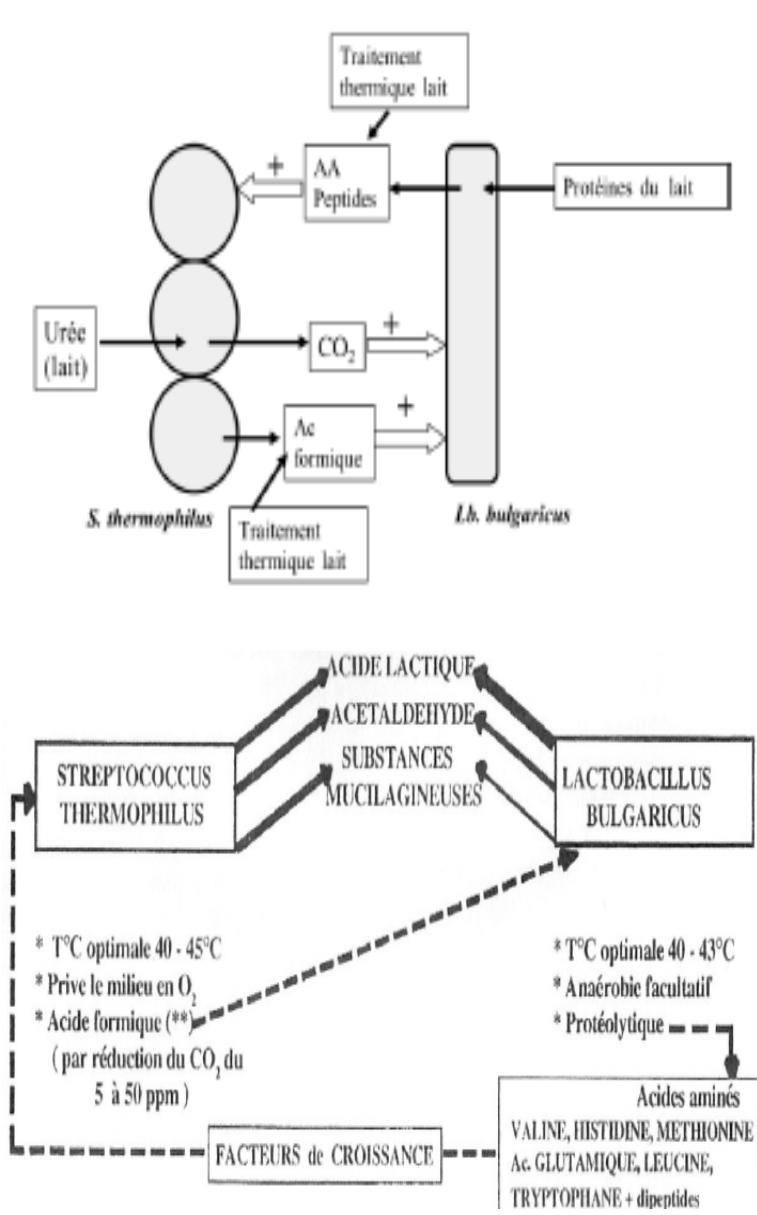


Figure 16. Protocoopération par apport de facteur de stimulation

II.3.4. Production symbiotique d’arôme et autres

- ✓ Lorsque l’acidité atteint un certain seuil: 70 à 80°D dans le cas des yaourts étuvés et 100à 120°D pour les Y. brassés, il est nécessaire de bloquer la fermentation en inhibant le développement des ferments. Pour cette raison, on abaisse considérablement la T° « phase de refroidissement »
- ✓ Les Y. étuvés à la sortie de l’étuve sont mis à refroidir dans des chambres froides fortement ventilées ou passent dans des tunnels de refroidissement avant d’être stockés en chambre froide
- ✓ Les Y. brassés, le refroidissement est effectué par passage dans des échangeurs-refroidisseurs à plaques, tubulaires.
- ✓ La maitrise des conditions de fermentation

II.3.5. La maîtrise des conditions de fermentation

II.3.5.1. La qualité du ferment:

- ✓ La réussite de la fermentation (production du yaourt), impose l'usage de ferment doté de toutes les aptitudes technologiques (bon ferment). Un bon ferment permettra:
 - Une Bonne vitesse de fermentation;
 - Une bonne fermeté du gel;
 - Une synérèse faible;
 - Une bonne aromatisation;
 - Un pouvoir inhibiteur à l'égard de la flore d'altération du yaourt.
 - Le mauvais ferment donnera un produit avec un effet inverse;
 - Un mélange de ferment conduit également aux mêmes conséquences.

II.3.5.2. Le Taux d'ensemencement:

- ✓ Le taux d'ensemencement est déterminant de la qualité (directe ou indirecte);
- ✓ Un taux d'ensemencement faible conduit à une sous acidification et perte de temps de production avec une dominance de St dans le produit;
- ✓ Un taux d'ensemencement important conduit à une sur acidification, une perte de la production d'arôme avec une dominance de Lb dans le produit.

Le produit doit être maintenu sous régime du froid pour deux raisons principales:

- ✓ Inhibition de l'activité fermentaire des souches;
- ✓ Le maintien du produit vivant, c.à.d. une flore viable de $10^7/g$

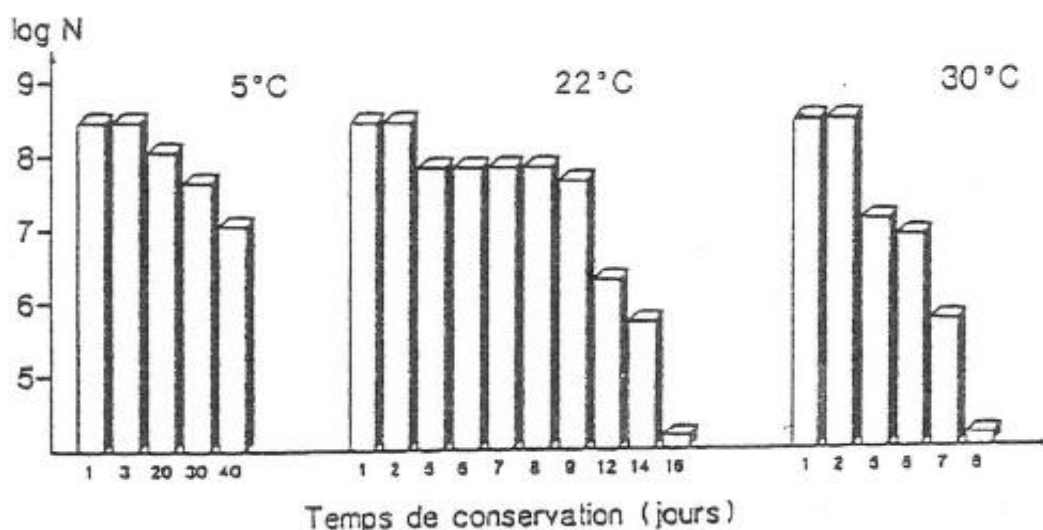


Figure 17 : L'effet de la T° de conservation sur la viabilité des souches qui conditionne la DLC

II.3.6. Diagramme général de production

Les procédés de fabrication des yaourts et des laits fermentés se caractérisent par **trois phases** successives, constituées chacune de plusieurs étapes :

- La préparation du lait qui aboutit au « **mix** » (lait ayant subi différentes étapes de préparation en vue de sa fermentation en yaourt),
- La fermentation (ou maturation ou incubation) qui aboutit à l’obtention d’une « **masse blanche** » (yaourt « brut » avant introduction des ingrédients et mise en œuvre des étapes de transformation ultérieures).
- Les traitements post-fermentaires qui aboutissent au produit fini.

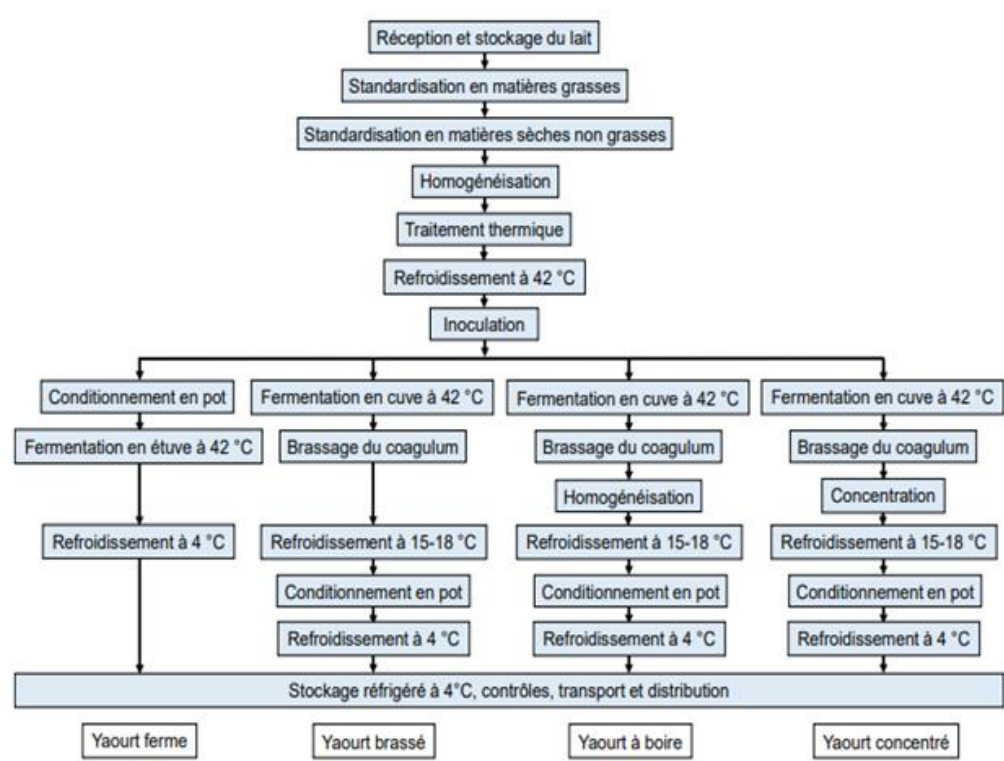


Figure 18. Diagramme général de fabrication des principaux types de yaourt et laits fermentés (nature).

• Réception Prétraitement du lait

Le lait frais, collecté au plus tard 72 h après la traite, arrive en camions citernes réfrigérés à l’unité de production. Il est contrôlé lors de la réception, filtré pour éliminer les résidus solides (paille, feuilles), puis stocké au froid (< 5 °C) dans des tanks, équipées d’un agitateur pour empêcher la remontée de la matière grasse, préalablement lavés et désinfectés.

• Standardisation

La composition moyenne du lait varie selon la race, l’alimentation, la saison et le stade de lactation de l’animal. En fabrication de yaourt, le lait doit être standardisé en matières grasses et enrichi en protéines, pour réduire cette variabilité et répondre aux spécifications nutritionnelles et organoleptiques des produits

La fortification en protéines (teneurs comprises entre 4 et 5 %.) se fait par des ajouts de **lait concentré**, de **poudre de lait écrémé** ou de **lacto-remplaceurs** (retentât de lait, lactosérum,

concentrés de protéines sériques, caséinates), ou par concentration partielle par filtration tangentielle (microfiltration ou ultrafiltration ou osmose inverse).

Il faut éviter la formation de grumeaux. Il doit aussi limiter l'incorporation d'air au moment du mélange pour réduire la formation de mousse. Le lait standardisé en matières grasses et enrichi en protéines, éventuellement sucré, constitue le mix de fabrication. Il est **homogénéisé** afin de réduire la taille des globules gras et d'empêcher leur **remontée** à la surface des produits pendant la fermentation et le stockage.

- **Standardisation en matières grasses**

On parle de laits à 1 % pour les yaourts maigres, 2% pour les produits demi-écrémés, 3,5 % pour les yaourts au lait entier

Si l'on souhaite préparer un mix de 1 000 kg de lait à 1,5 % de matières grasses: il faut calculer les proportions de lait écrémé à 0,1 % de matières grasses (x) et de crème à 50 % de matières grasses (y) qu'il faudra mélanger :

$$x + y = 1\,000$$

$$0,1\,x + 50\,y = 1,5 \times 1\,000$$

$$\text{Soit : } x = 972 ; y = 28$$

Il faut donc mélanger 28 kg de crème à 972 kg de lait écrémé, pour préparer 1 000 kg de lait à 1,5 % de matières grasses.

- **Enrichissement en protéines**

La fortification en protéines (teneurs comprises entre 4 et 5 %.) se fait par des ajouts de **lait concentré**, de **poudre de lait écrémé** ou de **lacto-remplaceurs** (retentât de lait, lactosérum, concentrés de protéines sériques, caséinates), ou par concentration partielle par filtration tangentielle (microfiltration ou ultrafiltration ou osmose inverse).

Exemple

Pour préparer 1 000 kg de mix à 4,5 % de taux protéique, à partir d'un lait à 3,3 % de matières protéiques totales, un enrichissement est réalisé par ajout d'une poudre de lait écrémé caractérisée par un taux protéique de 34 %. Le calcul des proportions du mélange fait intervenir, comme précédemment pour la standardisation en matières grasses, la résolution d'un système de deux équations à deux inconnues, avec x la quantité de lait, et z la quantité de poudre :

$$x + z = 1\,000$$

$$3,3\,x + 34\,z = 4,5 \cdot 1\,000$$

Soit :

$$x = 961 ; z = 39$$

Finalement, il est nécessaire d'incorporer 39 kg de poudre de lait écrémé à 961 kg de lait pour obtenir 1 000 kg de mix à un taux protéique de 4,5 %.

Le lait standardisé en matières grasses et enrichi en protéines, éventuellement sucré, constitue le mix de fabrication. Il est **homogénéisé** afin de réduire la taille des globules gras et d'empêcher leur **remontée** à la surface des produits pendant la fermentation et le stockage.

• **Traitement thermique et refroidissement**

Visé à réduire la charge microbienne, à **inactiver les peroxydases** du lait, à produire des **facteurs de stimulation** des bactéries (acide formique et composés azotés assimilables) et à **améliorer les propriétés physiques** du yaourt (viscosité, capacité de rétention d’eau). Il contribue à **dénaturer 80 % de la fraction protéique sérique**, soit totalement l’ α - lactalbumine et la β -lactoglobuline, ce qui assure une bonne texture du produit fini.

Quand elles sont dénaturées, les deux principales protéines du sérum se fixent à la surface des micelles de caséines par l’intermédiaire de ponts disulfure. Ce faisant, elles empêchent le regroupement des micelles au moment de l’acidification et évitent la formation d’agrégats de grande taille et de larges pores dans le gel lactique. Les risques de synérèse sont alors réduits.

Les barèmes de traitement thermique sont variables selon le type d’installation : **15-30 min à 85-90 °C** lors des traitements batch, ou **3-7 min à 90-95 °C** lors des traitements thermiques continus. Le lait est ensuite **refroidi** à la température de fermentation (entre 37 °C et 45 °C).

Tableau 4. Température et durée de fermentation de différents types de laits fermentés.

Laits fermentés	Température de fermentation	Durée de fermentation
Yaourt	42 - 45 °C	3 – 4 h
Laban, leben, labneh	37 – 42 °C	3 – 6 h
Buttermilk	20 °C	12 h
Viili	20 °C	18 h
Kéfir, koumiss	18 – 20 °C	24 h
Yakult	37 °C	7 jours

II.3.7. Laits fermentés contenant des peptides bioactifs

Des peptides bioactifs, principalement les **tripeptides IPP (isoleucine-proline-proline) et VPP (valineproline-proline)** sont présents dans certains laits fermentés et démontrent un effet régulateur sur certains métaboliques chez l’homme. Leur effet le plus connu et le plus étudié est leur **capacité hypotensive**. En inhibant une enzyme impliquée dans la tension artérielle (**angiotensin converting enzyme**), ils contribuent à diminuer la tension artérielle de l’hôte. Il existe également des **Produits fermentés à base de végétaux** comme le lait d’amande ou le lait de coco, de soja fermenté par des bactéries lactiques des bifidobactéries.

II.3.8. Fiche technique du yaourt

II.3.8.1. Types et Gout des yaourts : différence est liée à la durée d’incubation

pH	Acidité	St/Lb	Gout	Type de Yaourt
4.5 -4.6	80-90°D	95/5	Peu Acide	Yaourt Doux
< 4.3	105-115°D	85/15	Saveur acide plus soutenue	Yaourt Moyen
< 3.9	130-150°D	50/50	Saveur Acide et Aromatique	Yaourt Acide

II.3.8.2. Dénomination du yaourt

Taux de Matière Grasse	Dénomination
< 1%	Yaourt Maigre
≥ 1% et < 3%	Yaourt Standard
≥ 3% et < 3.5%	Yaourt Gras
> 3.5%	Yaourt Entier

II.3.9. Les accidents de fabrication

Défauts de goût

- ✓ **Amertume:** Contamination par des germes protéolytiques; Forte protéolyse; Conservation trop longue
- ✓ **Goût de levure, fruité, alcool:** Contamination par les levures
- ✓ **Goût de moisi:** Contamination par les moisissures, fruit de mauvaise qualité.
- ✓ **Goût plat, Absence d’arôme:** Mauvaise activité des levains; MS trop faible.
- ✓ **Manque d’acidité: Mauvaise activité de Levain:** Taux d’ensemencement faible, Trop de *St*, incubation défaillante, inhibiteur dans le lait, Présence de bactériophage
- ✓ **Trop d’acidité:** Mauvaise conduite de la fermentation; Défaut de réfrigération et Conservation à T° élevée.
- ✓ **Rancidité:** Contamination par les germes lipolytiques/ traitement thermique faible.

- ✓ **Goût farineux, de poudre:** Poudrage trop poussé
- ✓ **Goût oxydé:** Mauvaise protection contre la lumière (choix de l'emballage) / Présence de métaux.
- ✓ **Goût de cuit, de brûlon:** traitement thermique trop sévère
- ✓ **Goût aigre:** Contamination par les BL sauvage/ coliformes
- ✓ **Goût gras:** MG élevée

Défauts d'apparence

- ✓ **Décantation, synérèse:** Sur acidification, Refroidissement trop faible, Agitation trop poussée, Teneur en MS faible
- ✓ **Gonflement:** Contamination par les levures et les coliformes
- ✓ **Colonies en surface:** Contamination par les levures et moisissures
- ✓ **Couche de crème:** Mauvaise ou absence d'homogénéisation
- ✓ **Produit sur le couvercle:** Mauvaise manutention
- ✓ **Produit non homogène:** Mauvaise agitation (Y aux fruits)

Défauts de Texture

- ✓ **Manque de fermeté:** Ensemencement trop faible / Mauvaise incubation / MS trop faible
- ✓ **Trop liquide:** Brassage trop violent / Mauvaise incubation / MS trop faible / Mauvais ferment
- ✓ **Trop filant:** Mauvais ferment / T° d'incubation trop faible
- ✓ **Texture sableuse:** Chauffage du lait trop important, Poudrage trop fort ou Mauvais brassage.
- ✓ **Acidification trop faible**
- ✓ **Texture granuleuse:** Mauvais brassage/ Teneur en MG trop élevée / Mauvais choix du ferment



Figure 19. L'espèce *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*

Bacille à Gram +; longueur 0.8- 1µm jusqu'à 4-8 µm; A 22°C, il forme des filaments de 200 - 550µm, A T° > 50°C, il donne des formes irrégulières; Sous microscope, les cultures âgées s/f de longs bâtonnets (15-20 µm); T°_{min} 22°C; T°_{opt} 40-43°C, T°_{max} 52- 53°C (non thermorésistante); pH_{min} 3.5, pH_{opt} 5.5 -5.8; Anaérobie ou Aérobie facultative; Homofermentaire thermophile ; Peut produire jusqu'à 1.8% d'acide lactique (Isomère D⁽⁻⁾); Responsable de l'acidification du yaourt et peu aromatique (acétaldéhyde à partir de la thréonine) et Fermente le glucose, le galactose, le fructose et le lactose; Le % en GC est faible



Figure 20. L'espèce *St.salivarius subsp.thermophilus*

Cocci à Gram +; longueur 0.7- 0.9µm; A 45°C, il forme des chaines courtes; A T° > 45°C, il donne de longues chaines; Sous microscope, les cultures âgées s/f de chaines allongées; T°_{min} 18-20°C; T°_{opt} 40-45°C, T°_{max} 50- 53°C (thermorésistante 80°C/15mn; 65°C/ 30mn); Ne peut croître à 10°C; pH_{min} 4.5, pH_{opt} 6.3; Anaérobie ou Aérobie facultative; Homofermentaire thermophile ; Peut produire de 0.7 à 0.8% d'acide lactique (Isomère L⁽⁺⁾); Responsable de l'aromatisation du yaourt (acétaldéhyde + peu diacétyl et d'acétoïne) ; Producteur de mucus (polysaccharides) aspect épaississant des yaourts; Fermente le glucose, le galactose, le fructose et le lactose et le % en GC est faible.

Série de TD 01 : La panification

Exercice 1 :

La farine de blé a une aptitude à la panification, on dit qu'elle possède une valeur boulangère. Cette propriété est fonction principalement des capacités de la pâte à lever sous la pression des gaz de fermentation.

- Indiquez tous les facteurs qui influent sur la pression gazeuse dans la pâte au cours de la panification.

L'aptitude au développement est liée aussi à la manière dont la pâte est préparée et travaillée pendant les étapes de la fabrication du pain.

- Donnez et justifiez le rôle, de chacune des étapes suivantes, pétrissage, pointage, mise en forme, apprêt, cuisson, dans le processus de développement du pain.

Exercice 2 :

1- Indiquer et justifier les différents rôles et actions du pétrissage sur les caractéristiques qualitatives des pâtes et des pains.

2- La fermentation des pâtes au levain naturel :

2.1 - Donner une définition d'un levain naturel ;

2.2 - Dans l'élaboration d'un levain naturel, indiquer le processus qui permet le développement des microorganismes, justifier votre réponse.

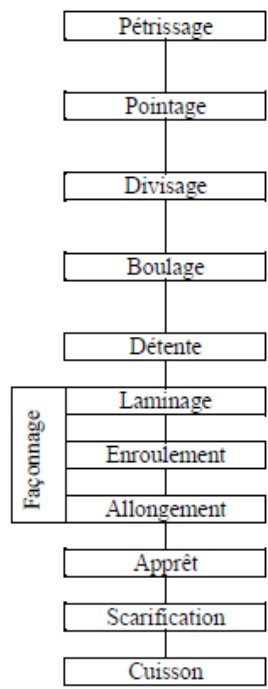
3- La prise de force des pâtes en panification :

3.1 - Définir la prise de force d'une pâte en indiquant les mécanismes biochimiques qui conduisent à ce phénomène ;

3.2 - Indiquer les différents facteurs qui favorisent la prise de force (ingrédients, conditions de fabrication...).

Exercice 3 :

Vous avez à analyser un processus de fabrication de pain français qui comprend les étapes suivantes :



- Indiquez pour chacune des étapes ou opérations unitaires de fabrication le ou les rôles de chacune d’elles.
- Justifiez vos réponses en indiquant les principales transformations ou modifications physicochimiques qui se produisent dans la pâte et le produit cuit.

Exercice 4 :

- Rôle du pétrissage
 - Expliquez les mécanismes de formation et de développement du réseau de gluten
 - Indiquez les conséquences du développement de ce réseau sur la qualité de la pâte et du pain.
- La fermentation
 - Expliquez le principe de l’élaboration d’un levain de panification.
 - Indiquez les facteurs qui favorisent l’activité de fermentation.
- A partir d’exemples précis, vous montrerez l’intérêt des améliorants de panification pour la formulation des farines. Vous expliquerez la méthode utilisée pour mettre en évidence leurs actions.

Exercice 5 :

I - Fabrication et qualité des farines

- Qu’est-ce que la farine entière ?
- Sur quel critère est basé le classement des farines par type ? En quoi permet-il donner des informations sur l’aspect visuel des farines ?

II - Panification

- Compléter le tableau suivant pour une pétrissée réalisée à partir de 5kg de farine.
Détailler le calcul de l’additif (acide ascorbique) qui est exprimé en ppm.

FARINE	100 (g)	5000g ou 5kg
Sel	2	
Levure	2	
Eau	60	
E300 (acide ascorbique)	20 ppm	

2. Quelle est la différence entre un pétrissage conventionnel et un pétrissage intensifié ? Que favorise le pétrissage intensifié ?

3. Fermentation à la levure, ou au levain : quelles sont les organismes microbiologiques

Impliqués ? Les réactions chimiques ? Les conséquences sur le procédé, sur le produit fini ?

TP 1: Technologie des céréales

Qualité des farines

DEFINITION

Les divers congrès internationaux pour la répression de fraudes ont donné la définition suivante :

« La dénomination de farine sans autre terme qualitatif désigne exclusivement le produit de la mouture de l'amande du grain de blé nettoyé et industriellement pur ».

Analyses des farines

Examen organoleptique

Touché: consiste à serrer dans la main une poignée de farine puis ouvrir et observer. Selon, cette technique les résultats peuvent être:

- La farine de blé tendre : forme une espèce de pelote.
- La farine de blé dure : s'échappe en partie et la masse se désagrège presque immédiatement à l'ouverture de la main
- La farine de mouture récente : forme une pelote.
- La farine de mouture ancienne: fuyante et plâtreuse.

Odeur : Le test consiste à préparer un pâton avec de l'eau tiède et sentir. L'odeur de la farine est franche, agréable, analogue à celle de la noisette.

Les résultats peuvent être comme suit:

- Les farines bisées ont une odeur qui rappelle celle du son.
- Une odeur acide, rance, acre indique que la farine est ancienne.
- Une odeur de moisi indique que la farine est en voie d'altération.
- Une farine contaminée par des produits odorants est inutilisable.

Saveur : Pour les bonnes farines, la saveur est agréable et caractéristique, douceâtre avec arrière goût amer pour les queues de la mouture.

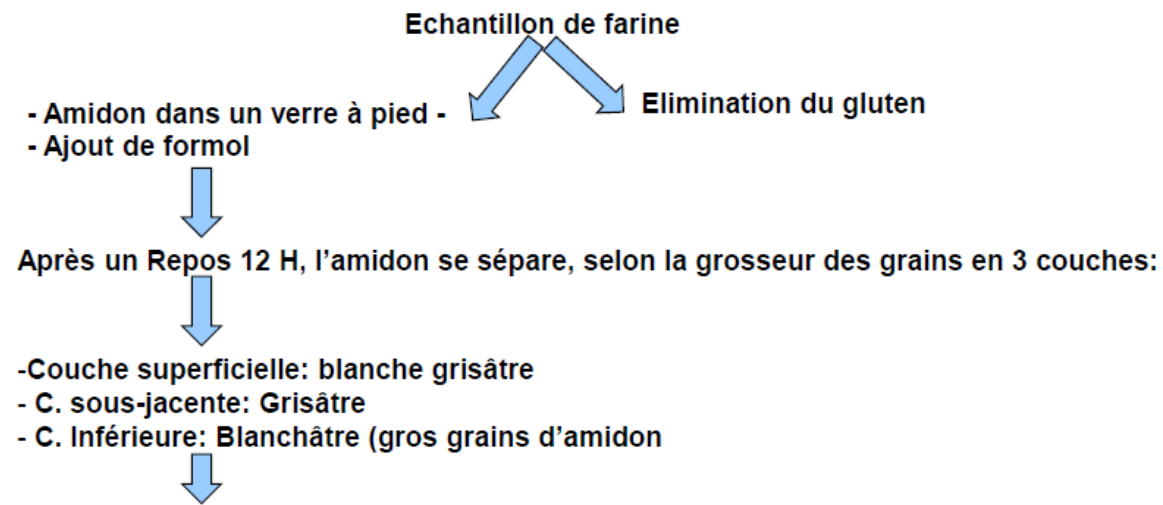
- Des altérations déjà prononcées la modifient.
- L'addition de farine étrangères peut être aussi décelée ainsi que celle de graines parasites.
- La farine ne doit pas crisser sous la dent (sable)

- Aspect (couleur) :** Selon le **taux d'extraction**, la lecture peut être:

 - Aspect de la farine est blanche: Taux d'extraction 70%
 - La couleur varie du crème au marron claire. Cette couleur indique la présence de piqûres: T.E \geq 80%
- Selon la nature de blé:**
 - Plus au moins crème pour la farine du blé tendre.
 - Jaune pour celles de blé dur.

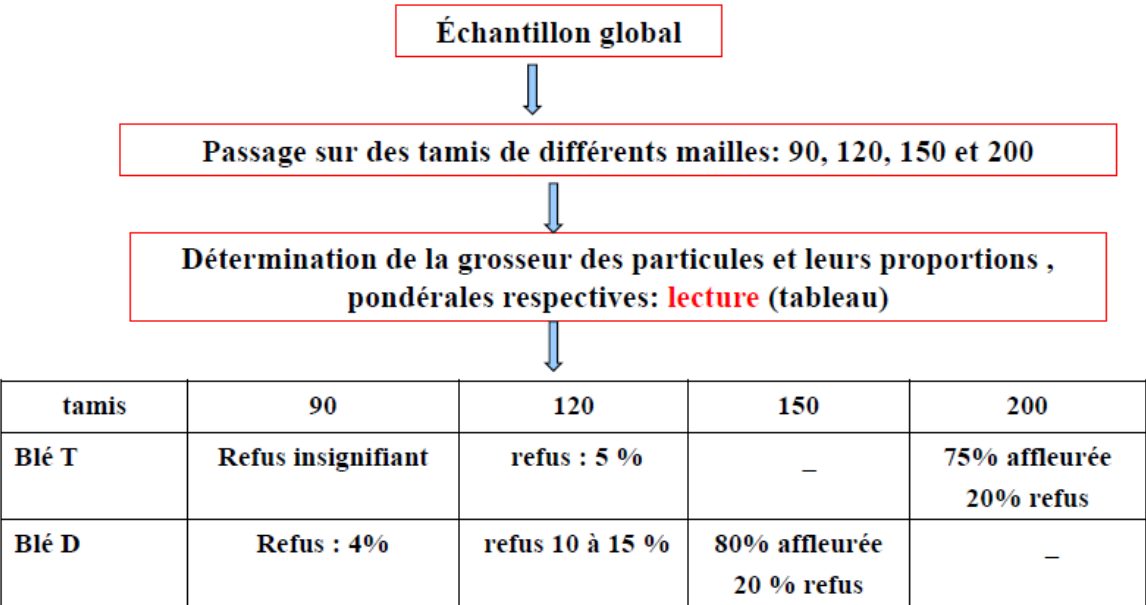
Examen macroscopique des farines

Permet de déceler les **farines étrangères** d'après **l'aspect des grains d'amidon**.



- Interprétation**
 - blé, seigle, orge et arachide: Amidon sphérique
 - mais, riz, sarrasin, avoine, millet: Amidon polyédrique + ou – régulier
 - pomme de terre, légumineuses, châtaigne: Amidon ovale, piriforme, ellipsoïde

Granulométrie des farines



NB: Le taux d'affleurement représente les quantités de farine qui passent à travers les tamis

Test de Blancheur

Il permet de visualiser la blancheur de la farine.

Il permet de déterminer si la farine est fraîche, et également si le taux d'extraction est élevé.

Le moyen utilisé se nomme le procédé de **PEKAR**, il consiste à mettre un monticule de farine sur une planchette de bois et à l'immerger dans de l'eau une vingtaine de secondes sans remuer



Plonger la planchette de farine dans l'eau /20 s

Retirer et Observer:
On peut apercevoir quelques piqûres dans la farine

Dosage de l'azote

La méthode la plus utilisée en Cont. qualité est celle de **Kjeldahl**

Dosage de Lipides

La méthode consiste à (**méthode de Soxlet**):

- Libération des lipides combinés par hydrolyse acide en présence d'alcool.
- Extraction des lipides totaux par un mélange éther- éther de pétrole.
- Évaporation du solvant, puis purification par dissolution dans le tétrachlorure de carbone en présence d'un déshydratant (sulfate de sodium anhydre).
- Après filtration, la solution organique est évaporée et les lipides totaux sont pesés après dessiccation à 95 °C.

$$T. \text{ Lipides (g/100g)} = P \times 100 / PE$$

P : poids du résidu lipidique ;

PE : prise d'essai de la farine= 4g

Détermination de l'humidité

Elle consiste à dessécher la farine à + 100 °C jusqu'à stabilité du poids

Calcul :

$$H (g) = [P - P1 / P] \times 100 + 0.3$$

P : la prise d'essai ;

P1 : poids du résidu sec

0.3 : terme correctif pour tenir compte de l'humidité de l'atmosphère.

Données pour l'interprétation des résultats

- H de la farine de **blé tendre** ne dépasse pas le **15 %** et celle du **blé dur** ne dépasse pas les **14.5 %**

- Si **H >16 %** et si la **T° est suffisante**, entraîne des **fermentations** et le développement de **moisissures** qui communique à la farine une odeur désagréable.

Taux de cendres

Le taux de cendres va être mesuré en calcinant 100 g de farine (**dans un four à moufle**) soit:

- 4 heures à 600°C

- 1heure 30 à 900°C

C'est en fonction du poids de cendres que l'on désigne le type d'une farine. Ce chiffre indique le poids en gramme du résidu minéral contenu dans l'échantillon incinéré.

Les cendres sont aussi exprimées en g% de farine sèche :

$$2000 \times P / (100 - H)$$

P : (g) poids du résidu ;

H : humidité

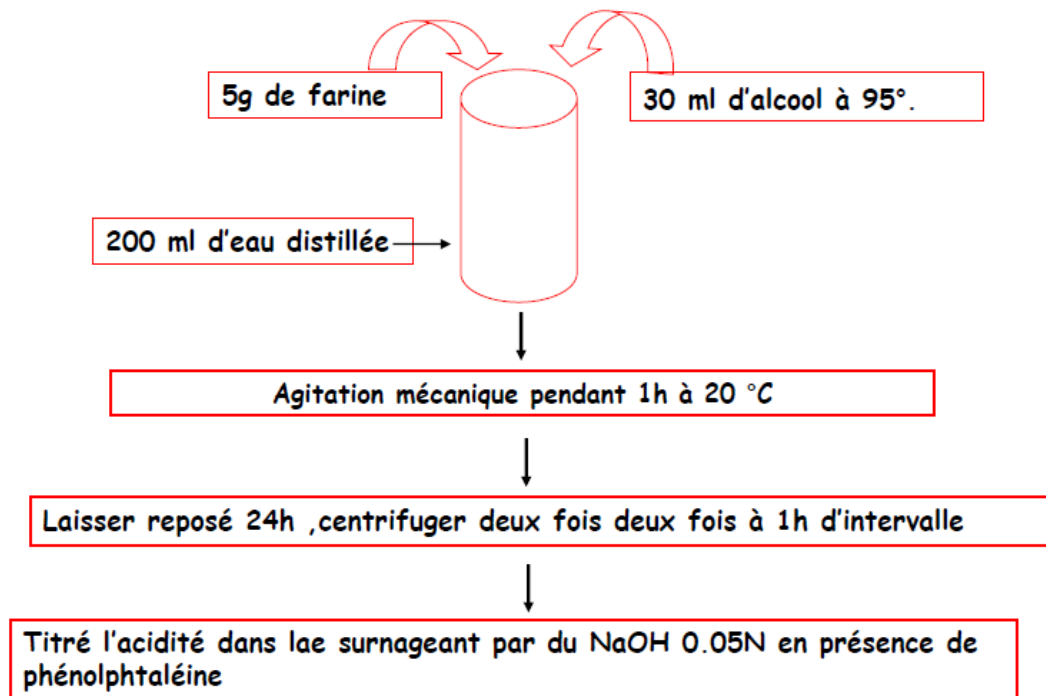
Les cendres des **F T.45 à T 80**: 0,30- 0,90 g %

Les **C.F.T110 et T120** > 1,00 g %



Acidité des farines

Elle varie avec l'âge, l'état de conservation et le taux d'extraction de la farine



$$A^{\circ} = \frac{(n-n_1) 5 \times 10^{-3} \times 49 \times 3}{10} \quad (\text{g H}_2\text{SO}_4/100\text{g de farine})$$

n : le nombre de ml de NaOH 0.05 N utilisé pour neutraliser l'acidité du dosage
 n1 : le nombre de ml de NaOH 0.05 N utilisé pour neutraliser l'acidité du témoin

Données et Interprétation :

- **Farine blanche ordinaire** : A° maximal est **0.050 g %**
- **F.** dont le taux d'extraction est voisin de 70% : A° est **0.025 g %**
- **F.** dont le taux d'extraction est > 70% : A° est **0.040 g %**

Remarque:

A° de la farine peut être augmenté par les agents de blanchiment qui provoquent l'oxydation des lipides

Chapitre III : Métabolites microbiens d'importances économiques

Objectifs : Les objectifs fondamentaux de ce chapitre sont :

- Développer les notions de métabolites primaires et secondaires et leurs intérêts économiques.
- Développer les connaissances approfondies sur l'intérêt technologique des métabolites et de leurs fonctionnalités dans le secteur alimentaire.

III.1. Production des métabolites et molécules d'intérêt

Au cours du cycle de croissance, le microorganisme va consommer les substrats disponibles (source de carbone, source d'azote, sels minéraux...) pour une prolifération et augmentation du nombre de cellules ce qui conduit à l'obtention de la biomasse et à la libération des produits de la fermentation appelés métabolites, qui peuvent être endocellulaires ou exocellulaires. Ces métabolites doivent être séparés des cellules et du milieu de fermentation par traitement de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités. Ces traitements sont des opérations simples : centrifugation, filtration, évaporation, précipitation, séchage... Dans le cas de métabolites endocellulaires, la récupération du produit est plus difficile et suppose une étape supplémentaire de broyage ou de lyse des cellules microbiennes. Les produits de la fermentation ou métabolites sont divisés en : métabolites primaires et métabolites secondaires, selon la phase de leurs productions durant le cycle de croissance microbien.

- **Métabolites primaires** : associés à la synthèse des cellules microbiennes. Ils sont impliqués dans la phase de croissance (AA, nucléotides, produits de fermentation, enzymes...). Les voies de biosynthèse sont en général simples. Ils sont synthétisés pendant la phase exponentielle (trophophase).

- **Métabolites secondaires** : ne sont pas indispensables au développement de l'organisme. Synthétisés dans des conditions particulières, s'accumulent pendant la période suivant la phase de croissance active en idiophase (phase de ralentissement ou en phase stationnaire) et n'ont pas de relation directe avec la synthèse des matières cellulaires et la croissance normale (antibiotiques et toxines). Voies de biosynthèse complexes et longues. Spécifique à une espèce voire à une souche microbienne.

Les phases de la croissance doivent donc être parfaitement maîtrisées pour optimiser la production des métabolites d'intérêt.

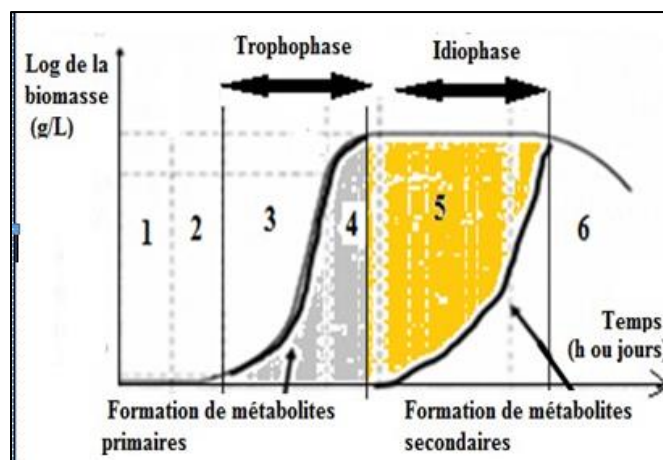


Figure 21. Production de métabolites primaires et secondaires au cours de la croissance.

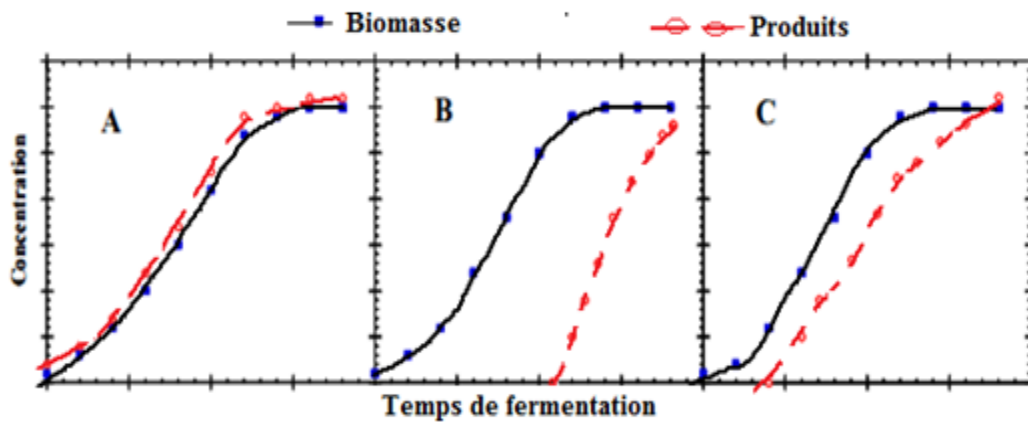


Figure 22. Cinétique de formation de produits : Associé, non associé et intermédiaire.

III.2. Stratégie globale de production

- **Produits associés à la production d'énergie :**

Conditions optimales : celles qui vont conduire à la production maximale du produit recherché associé à une production faible de biomasse = conversion optimale de la source de carbone en produit. **Ex: produits de fermentation.**

- **Produits associés à la biomasse :** rechercher les conditions de production maximale de cellules.
- **Produits inductibles (protéines recombinantes) :** leur production est dépendante de l'induction du gène correspondant (fusionné avec un promoteur inductible : tac, Trp,...).

- **Aspects Technologiques**

1. Rendements et productivités

Afin d'évaluer un procédé de fermentation, divers critères peuvent être calculés:

- Le rendement de croissance par rapport au substrat
- Le rendement de conversion substrat - produit:
- La productivité volumique horaire maximale;
- La productivité volumique horaire globale.

- Les rendements

Le rendement de croissance par rapport au substrat (ou coefficient de conversion du substrat) est le rapport de la quantité de biomasse produite sur la quantité de substrat métabolisé. Ce rendement, exprimé en g de biomasse par g de substrat métabolisé, est un rendement pondéral. Il peut aussi s'exprimer en g de biomasse par mole de substrat métabolisé; il s'agit alors du rendement molaire. Le rendement de conversion substrat - produit est le rapport de la quantité de produit formé sur la quantité de substrat métabolisé.

$$R_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$
 Avec $\Delta X = (X_f - X_0)$ et $\Delta S = (S_0 - S_f)$

R _{x/s}	Rendement de croissance par rapport au substrat	
X _f et X ₀	Biomasses finale et initiale	g/L
S ₀ et S _f	Concentrations massiques initiale et finale en substrat	g/L

$$R_{P/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$
 Avec $\Delta P = (P_f - P_0)$ et $\Delta S = (S_0 - S_f)$

R _{P/s}	Rendement de conversion substrat produit	
P _f et P ₀	Concentrations massiques finale et initiale en produit	g/L
S ₀ et S _f	Concentrations massiques initiale et finale en substrat	g/L

- Les productivités

La productivité est la quantité de biomasse ou de produit formé par volume de milieu et par unité de temps.

C'est un critère économique majeur en industrie: afin que le procédé soit considéré comme rentable, la production doit être maximale sur une durée la plus courte possible. Le calcul des productivités volumiques horaires maximale et globale permet de choisir le dimensionnement d'une installation de fermentation.

Pour calculer les productivités, dans le cas des réacteurs discontinus, il convient aussi de prendre en compte les temps de vidange, de nettoyage, de remplissage de milieu et de stérilisation en plus du temps nécessaire à la fermentation.

Lorsque la fermentation est arrêtée en fin de phase exponentielle, la productivité est maximale mais le rendement de croissance par rapport au substrat (R_{x/s}) n'est pas à sa valeur la plus haute. En effet, la croissance cellulaire n'a pas atteint sa valeur finale et il reste encore une certaine quantité de substrat non métabolisé.

Lorsque la fermentation est arrêtée quand la croissance cellulaire a atteint sa valeur finale, la productivité (appelée productivité globale) n'est pas maximale. Cependant, comme tout le substrat a été métabolisé, le rendement de croissance par rapport au substrat (R_{x/s}) est donc à sa valeur la plus haute.

Les productivités volumiques horaires peuvent aussi être calculées de la même façon à partir de la courbe de formation de produit. La productivité est généralement assez faible en batch du fait, entre autres, d'une longue phase de latence. Néanmoins, le procédé batch permet:

- les productions de biomasse, si le taux de croissance spécifique est élevé;

- la production de métabolite primaire, si le taux de croissance faible permet de prolonger au maximum la phase exponentielle;
- la production de métabolite secondaire, si la phase exponentielle courte est suivie d'une longue phase de production de métabolite secondaire.

$$P_{vhm}=\frac{X_m-X_0}{t_m} \text{ et } P_{vhg}=\frac{X_f-X_0}{t_f}$$

P _{vhm}	Productivité volumique horaire maximale	
P _{vhg}	Productivité volumique horaire globale	
X ₀	Biomasse initiale	g/L
X _m	Biomasse en fin de phase exponentielle	g/L
X _f	Biomasse finale	g/L
t _m	Temps de fin de phase exponentielle	h
t _f	Temps de fermentation	h

• **Caractéristiques des milieux de culture pour une fermentation industrielle.**

Bien que chaque procédé de fermentation nécessite un milieu de culture particulier adapté à la production souhaitée, les milieux de culture contiennent tous des sources nutritives de base nécessaires au développement des micro-organismes. Les milieux contiennent de l'eau, des sources de carbone, d'énergie et d'azote, des éléments minéraux et éventuellement des facteurs de croissance. Le milieu de culture le plus adapté en industrie doit répondre aux critères suivants :

- rendement maximum de produit ou de biomasse par masse de substrat et concentration maximum de produit ou de biomasse;
- production la plus faible de métabolites indésirables;
- facilité de fabrication du milieu de culture;
- prix d'achat et de stockage, disponibilité des ingrédients, constance de la qualité, stabilité au stockage;
- absence de problèmes technologiques tels que stérilisation, agitation, aération, extraction et purification des produits.

Dans les procédés industriels, on utilise le plus souvent des composants peu coûteux et disponibles en grande quantité. Il s'agit souvent de déchets carbonés provenant d'autres industries comme les mélasses ou les tourteaux.

- **Critères de sélection des souches microbiennes**

La souche de micro-organismes à sélectionner et à isoler doit répondre à certains critères :

- Le micro-organisme doit pouvoir cultiver dans un milieu de culture bon marché et de disponibilité constante;
- Le micro-organisme doit être capable de se développer rapidement et de produire le métabolite en grande quantité dans une durée limitée, sa vitesse spécifique de production par unité de temps doit donc être élevée;
- Le rendement de la production du produit doit être élevé ;
- Le micro-organisme ne doit pas produire de substances indésirables;
- Le produit doit être facilement récupérable du milieu de culture;
- Le micro-organisme peut être génétiquement modifié;
- Le micro-organisme doit être stable génétiquement
- Le micro-organisme ne doit pas, si possible, présenter de caractère de pathogénicité.

- **Sélection et amélioration des souches**

Les micro-organismes sélectionnés en microbiologie industrielle doivent être capables de synthétiser un métabolite particulier avec un rendement élevé. Deux voies sont offertes aux scientifiques pour isoler de nouveaux micro-organismes dotés de caractéristiques souhaitables pour la microbiologie industrielle et la biotechnologie.

➤ **Bioprospection**

Il s'agit de rechercher les souches possédant des caractéristiques nouvelles dans les matières naturelles comme les sols, les eaux, les végétaux, etc. Depuis plusieurs dizaines d'années, de nouvelles souches, dont les actinomycètes et les champignons, ont été sélectionnées de cette façon pour assurer la production de nouvelles substances.

➤ **Manipulation génétique**

Il s'agit soit de produire des micro-organismes possédant des caractéristiques nouvelles, soit de modifier des souches prometteuses afin d'augmenter leur productivité. On dispose d'un grand nombre de techniques comme:

- La mutation (mutagénèse chimique ou par UV);
- La formation d'hybrides par fusion des protoplastes et sélection des recombinants (Cas des levures et des moisissures);
- L'insertion d'oligonucléotides par mutagenèse dirigée afin de modifier la structure et la fonction des protéines;
- La biologie combinatoire : le transfert d'information génétique entre organismes
- Différents par les technologies de l'ADN recombinant;
- La modification des régulations transcriptionnelles et traductionnelles.

➤ Conservation des souches

Une fois que la souche a été sélectionnée, isolée et éventuellement modifiée génétiquement, il est nécessaire de la conserver. La technique classique des repiquages successifs n'est pas utilisée car cette technique augmente la probabilité de dégénérescence de la souche.

Les techniques de conservation utilisées sont :

- La congélation dans l'azote liquide à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en présence d'un agent cryoprotecteur (par exemple, le glycérol);
- La lyophilisation qui consiste à déshydrater, par sublimation sous faible pression,
- Une suspension congelée de micro-organismes.

Ces techniques permettent de garder les cultures viables, stables et pures pendant des durées souvent longues.

Les souches d'intérêt sont conservées soit dans les laboratoires industriels, soit dans les organismes de collections nationales comme par exemple le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRBIP) en France ou l'American Type Culture Collection (ATCC) aux États-Unis qui fournissent les souches à la demande aux industriels. C'est dans ces organismes de collections nationales que sont déposées les nouvelles souches découvertes aptes à produire de nouvelles substances biologiquement actives à des fins de brevet et de conservation. Par exemple, la souche mutante de *Penicillium chrysogenum* produisant la pénicilline à haut rendement, a été désignée par les chercheurs *Penicillium chrysogenum* Wis 51-20, puis a été déposée à l'ATCC sous le numéro suivant: ATCC Number 12689 TM

III.3. Production d'alcool :

L'alcool industriel est un solvant important ($\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH}$, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$: éthanol), et représente la matière première de nombreuses synthèses chimiques et aussi un carburant (carburant vert ou biologique). En 1997, la production était environ 23 milliards de litres d'éthanol (18.5 millions de tonnes), dont 10% par addition catalytique de H_2O à l'éthylène. La fabrication par voie biotechnologique est la plus importante, environ 2/3 de la production mondiale sont issues de la fermentation de glucose par des levures et des bactéries qui prolifèrent en anaérobiose. Depuis 1975, l'éthanol est utilisé comme carburant dans des pays comme le Brésil et les États-Unis).

Organisme et biosynthèse : L'organisme classique pour la fermentation destinée à la fabrication de boissons alcooliques est la levure boulangère *Saccharomyces cerevisiae*. Elle fournit à partir de 1 mole de D-glucose, par une glycolyse, 2 moles d'éthanol. La bactérie *Zymomonas mobilis* donne le même rendement, mais elle utilise la voie du céto-désoxyphosphogluconate (CDPG).

Fermentation, extraction et purification : La fabrication de l'éthanol est réalisée à l'aide d'un procédé discontinu dans des bioréacteurs à grands volumes (500m^3). Le microorganisme de choix est *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentation démarre par une préculture sur un milieu de sucre enrichie par différents éléments nutritifs. Après une période de 14 à 20 heures, le pic de la formation d'alcool est atteint (90%). L'inhibition de la levure par une concentration croissante en alcool est maîtrisée par le prélèvement périodique de l'alcool. Le produit obtenu montre une pureté d'environ 95%, ce qui est suffisant pour une utilisation comme carburant. Pour obtenir de l'éthanol absolu, il faut passer par une distillation en utilisant un tamis moléculaire.

3.7.-Production d'éthanol

➤ L'éthanol est un alcool (C₂H₅-OH) sous forme un liquide incolore, volatil, inflammable et miscible à l'eau.

➤ Il peut être produit industriellement à partir de la pétrochimie par hydratation de l'éthylène ou par fermentation alcoolique de levures

❖ **Microorganismes producteurs d'éthanol :**

*levures comme *Torula cremoris*, *Condidaa tropicalis* et *Kluyveromyces fragilus*,

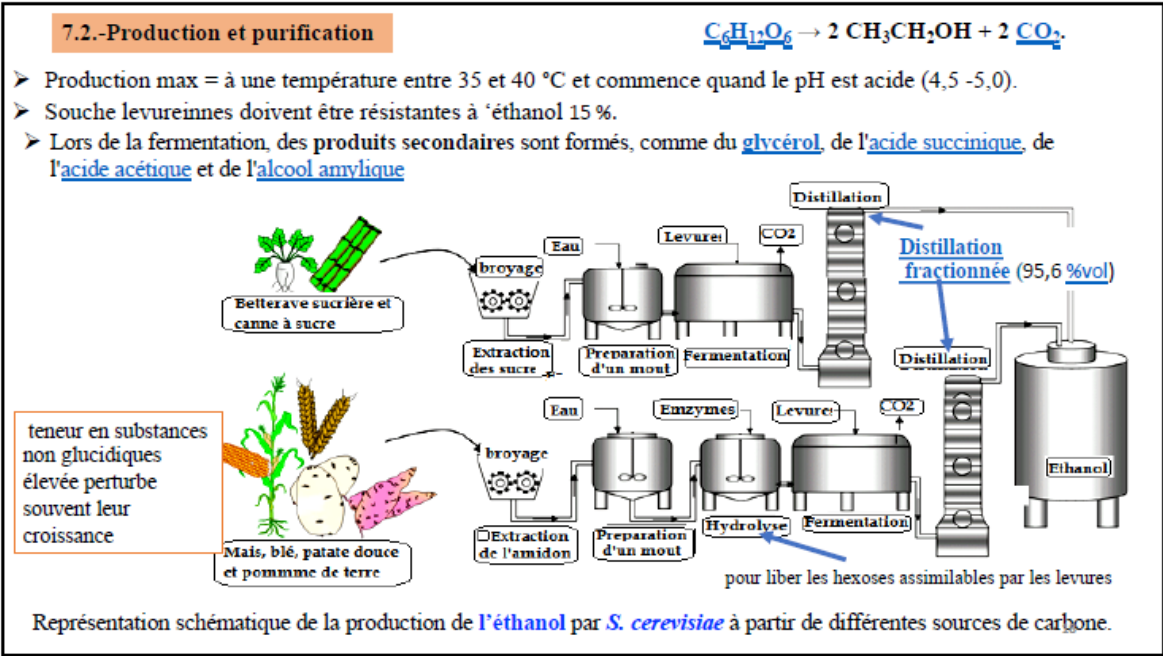
*des bactéries : *Zymomonas mobilis* et *Thermoanaerobacter ethanolicus*,

ou certaines espèces fongiques comme *Fusarium oxysporum*, qui produit de l'éthanol à partir du xyllose et l'hémicellulose

➤ co-cultures de micro orgasmes sont également utilisées pour la production de l'éthanol, ex, la co-culture d'une levure amylique (*Endomycopsis fibuliger*) et de *Saccharomyces cerevisiae* fermente l'amidon non hydrolyse

➤ autre co-culture d'*Aspergillus niger* et de *S. cerevisiae* est également utilisée pour avoir une production de **96% en** deux jours à pH 5-6.

17



III.4. Production des acides organiques

Un acide organique est un composé capable de libérer un cation (ion chargé positivement) H⁺ en milieux aqueux. Les acides organiques les plus courants sont les acides carboxyliques: Acide lactique, acide acétique, Acides propionique, acide butyrique, acide citrique...etc.

Les acides organiques sont des additifs très utilisés dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent servir d'agents de conservation, d'acidifiants, d'antioxydants et d'émulsifiants. On peut extraire des grandes quantités d'acides organiques au cours du métabolisme normal de certains microorganismes. Vue à la demande du marché industriel, la production d'acides organiques a été améliorée par mutation classique et l'ingénierie métabolique, comme les acides pyruvique, fumarique, succinique, glycérique, propionique.

III.4.1. Micro-organismes producteurs des acides organiques

Les espèces microbiennes impliquées dans la production des acides organiques se différent selon le type de l’acide d’intérêt industriel.

Tableau 5. Les acides organiques produits par les micro-organismes et leurs utilisations dans l’industrie alimentaire.

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

III.4.2. Voies métaboliques de production des acides organiques

La production des acides organiques se commence par la dégradation du glucose (glycolyse) et la formation du pyruvate. La transformation du pyruvate en acide organique s’appelle un processus de fermentation.

a) Fermentation homolactique

L’acide lactique est le produit essentiel de ce type de fermentation (>90% des produits formés), contrairement à la fermentation hétérolactique (entre 25 et 90% d’acide lactique). La fermentation homolactique est effectuée par tous les espèces des genres bactériens *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Microbacterium*, par beaucoup de *Lactobacillus*, par certains *Bacillus* et certaines moisissures (Phycomycètes: Oomycètes).

b) Fermentation hétérolactique

La fermentation hétérolactique qui donne du lactate, de l’éthanol et du CO₂.
 $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3-CHOH-COOH + CO_2 + CH_3-CH_2OH.$

Cette voie fait suite à celle de Warburg-Christian. On l’appelle aussi voie des pentoses phosphates ou voie de Dickens et Horecker (qui l’ont decouverte en 1955). Ce type de fermentation est rencontré chez les *Leuconostoc*, les bactéries *Lactobacillus*hétérofermentaires, diverses entérobactéries et la moisissure *Rhizopusoryzae*(Fig. 6).

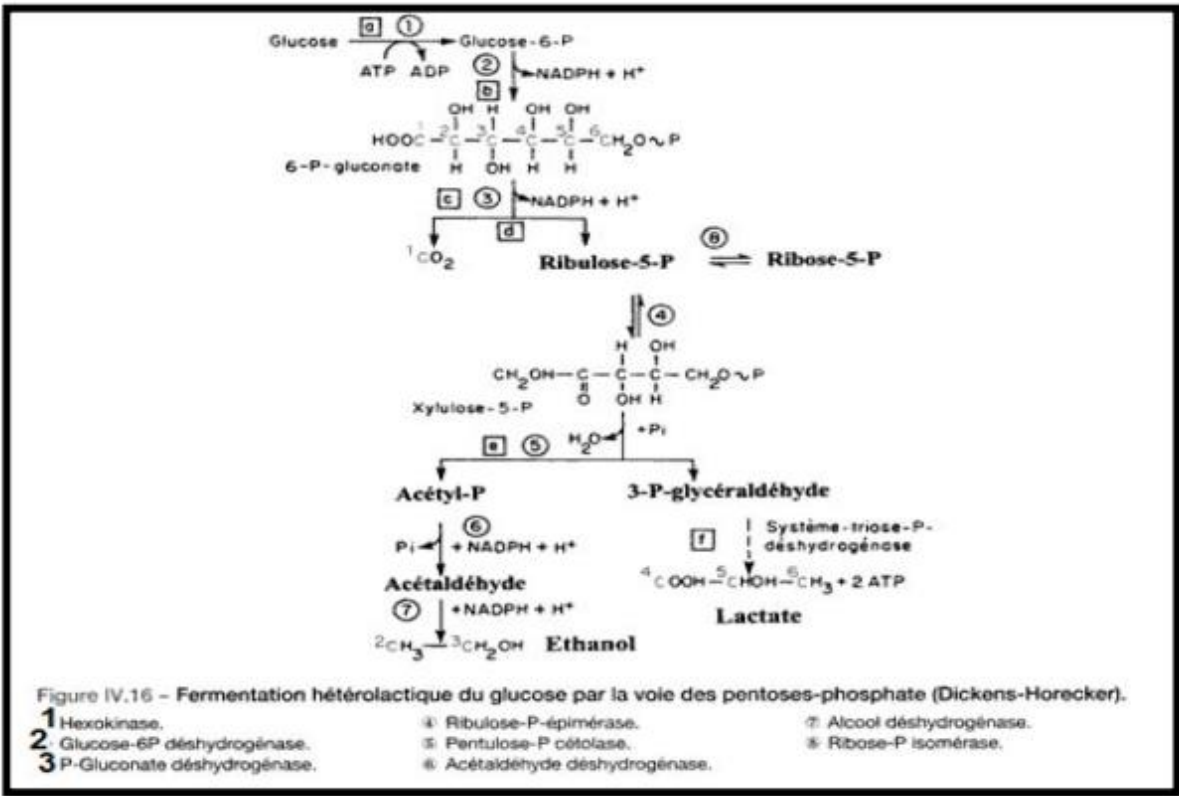


Figure 23: Fermentation hétérolactique du glucose par la voie des pentoses-phosphate

C) La fermentation butyrique

Essentiellement réalisée par des *Clostridium saccharolytiques* (*C. tyrobutyricum*, *C. Butyricum*, *C. pasteurianum*). Elle entraine des gonflements très importants des fromages à pâte dure, à cause du dégagement d'hydrogène (Fig24)

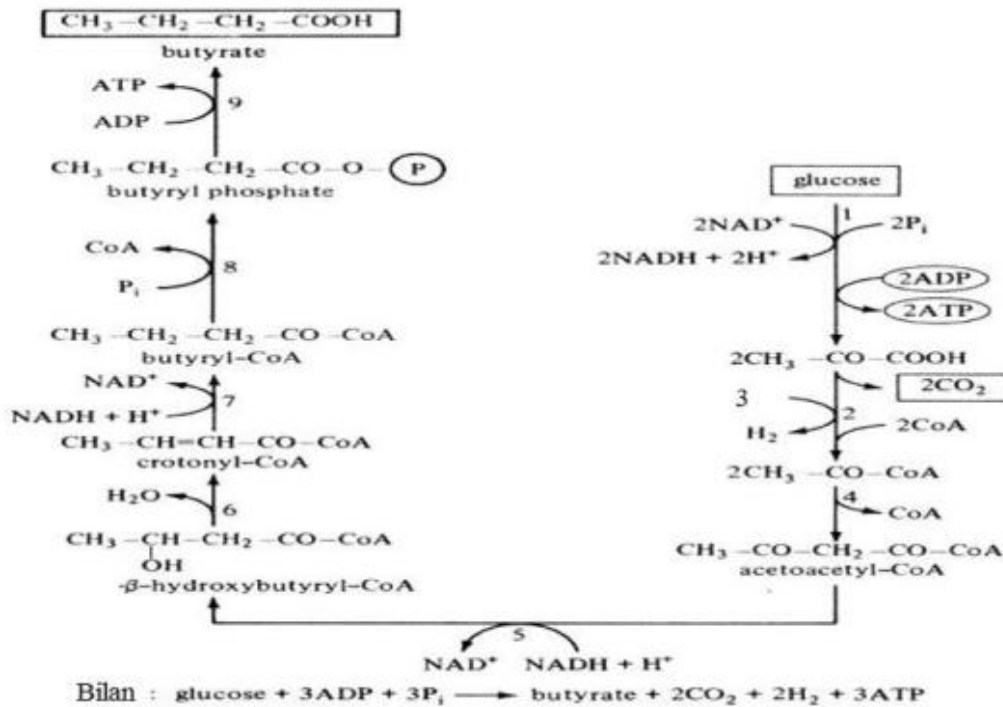


Figure 24: La production de l'acide butyrique.1, Enzymes du glycolyse; 2, pyruvate-déshydrogenase ;3, hydrogenase; 4, acetyl-CoA-acetyltransferase (thiolase); 5, B-hydroxybutyryl- CoA déshydrogenase; 6, crotonase; 7, butyryl-CoA déshydrogenase

d) Fermentation propionique

Diverses bactéries anaérobies strictes ou facultatives (*Propionibacterium*, certains *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Veillonella*...) produisent par fermentation l'acide propionique. L'acide propionique est formé par réduction du pyruvate, ou par décarboxylation de l'acide succinique.

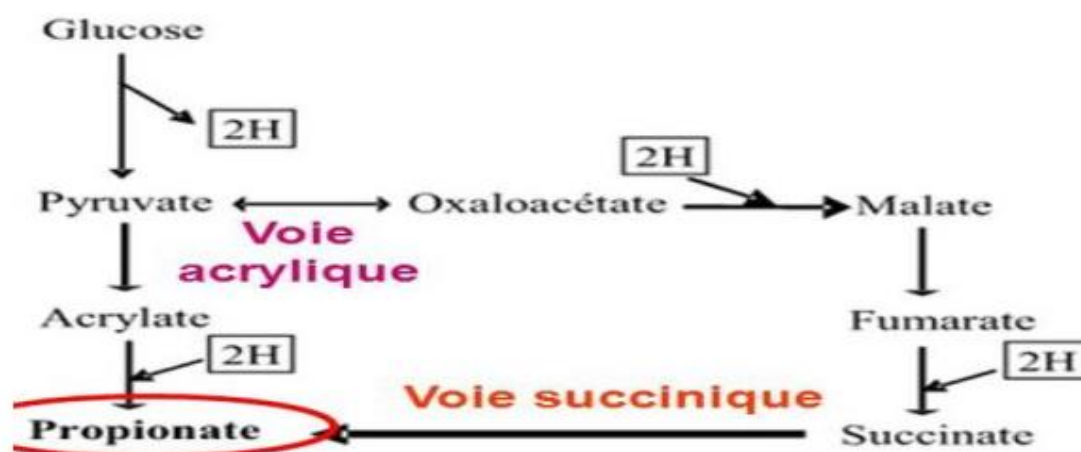


Figure 25: La production d'acide propionique

e) Fermentation acide mixte

La fermentation acide mixte se caractérise par une diversité des produits de fermentation. Elle est réalisée par des Entérobactéries appartenant aux genres *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* et *Yersinia*. Elle est aussi rencontrée chez les *Vibrio*, certains *Aeromonas*... Elle est caractérisée par la production d'éthanol et de plusieurs acides organiques: acides lactique, acétique, succinique et formique.

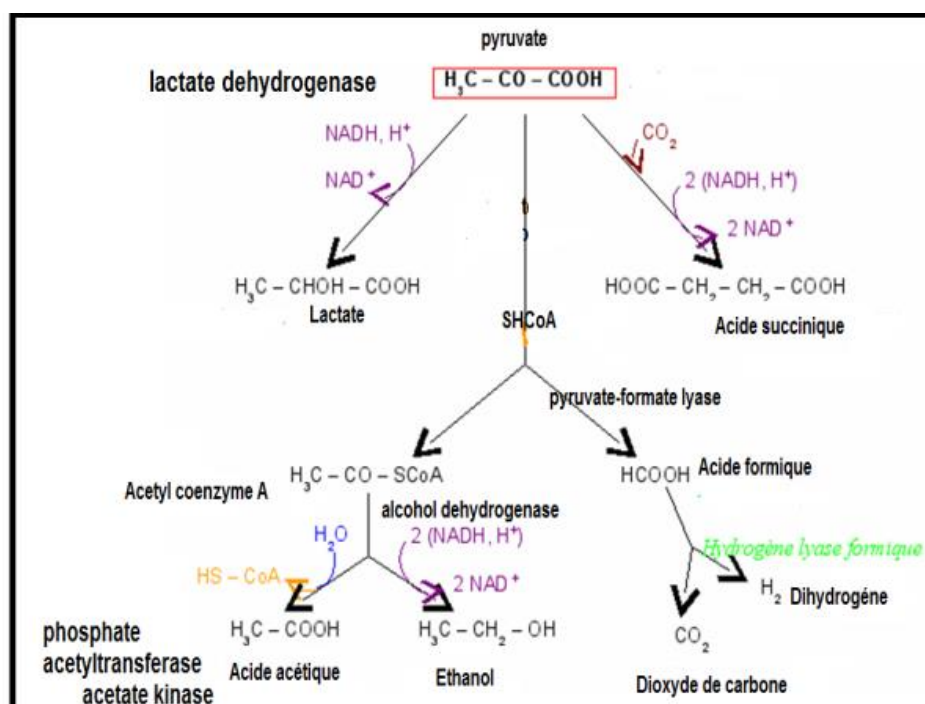


Figure 26 : La fermentation mixte

III.4.2.1. Production d'acide citrique

L'acide citrique ($C_6H_7O_5-COOH$) est très utilisé dans divers domaines : plus de 50 % était utilisé comme régulateur de pH pour les boissons, 20 % pour d'autres applications alimentaires, 20 % dans les détergents et 10 % pour des applications diverses telles que dans les cosmétiques, la pharmacie et l'industrie chimique.

La production d'acide citrique par fermentation liquide à l'échelle industrielle date de la fin du XIX^{ème} siècle. Depuis quelques années, les recherches s'orientent vers une production d'acide citrique par FMS. Un grand nombre de champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*), de levures (*Candida*, *Saccharomycopsis*) et quelques bactéries (*Arthrobacter*, *Corynebacterium*) sont capables d'excréter l'acide citrique, mais *Aspergillus niger* reste le meilleur champignon producteur d'acide citrique à échelle industriel. L'espèce *Aspergillus niger*, est largement utilisée en industrie avec une production plus de 200 g/L. Physiologiquement, l'acide citrique est un métabolite du cycle de Krebs, appelé « cycle de l'acide citrique ». Il est produit à la première étape du cycle par condensation du résidu acétyle de l'acetyl-CoA sur l'oxaloacétate pour former du citrate

En industrie, deux principaux procédés de production existent à l'heure actuelle :

- Fermentation en culture submergée (la plus utilisée),
 - Fermentation sur surface d'un milieu solide: la propagation des spores et la production de citrate proprement dite.
- Le milieu utilisé lors de la production industrielle de l'acide citrique est composé de (mg): saccharose 140 ; NH_4NO_3 2,5; $Mg SO_4 HO_2$ 0,25 ; KH_2PO_4 2,5 ; Fe 1,3; Mn 1; Cu 60 µg ; pH 4-5; durée de 6 à 8 jours à 30°C ; aération de 0,6 V/V/mm et une pression d'oxygène de 1,7 atmosphère.

Le milieu utilisé lors de la production industrielle de l'acide citrique est composé de (mg): saccharose 140 ; NH_4NO_3 2,5; $Mg SO_4 HO_2$ 0,25 ; KH_2PO_4 2,5 ; Fe 1,3; Mn 1; Cu 60 µg ; pH 4-5; durée de 6 à 8 jours à 30°C ; aération de 0,6 V/V/mm et une pression d'oxygène de 1,7 atmosphère.

Les souches productrices ont une activité citrate synthétase élevée et les activités de l'aconitase et de l'isocitrate déshydrogénase sont réduites. Il est largement utilisé dans l'alimentation, comme additif alimentaire, mais aussi dans la composition des détergents et des cosmétiques. 60% de la production est utilisée par l'industrie alimentaire (jus de fruits, confiserie...), comme acidifiant, neutralisant ou émulsifiant. Cet acide est un antioxydant. Pour la pharmacie, sous forme de citrate de fer ou de calcium, qui est utilisé comme agent conservateur. 30% de la production est utilisée par la métallurgie (obtention de métaux purs grâce au pouvoir chélatant de l'acide citrique), par l'industrie chimique (détergent, traitement des tissus, fabrication de plastique...).

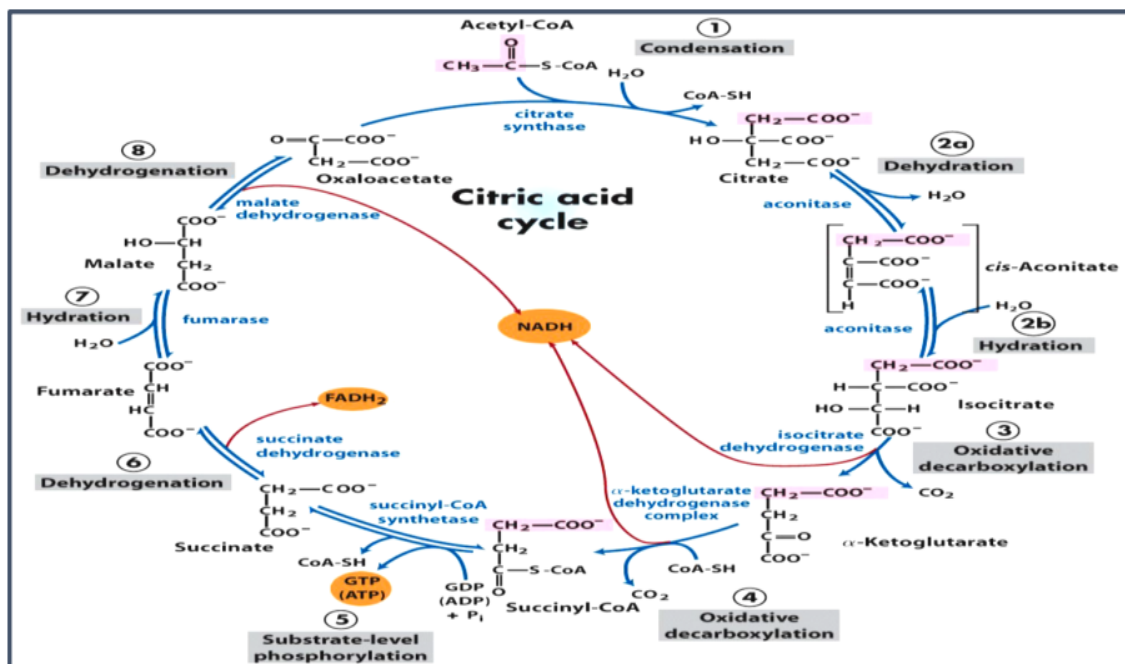
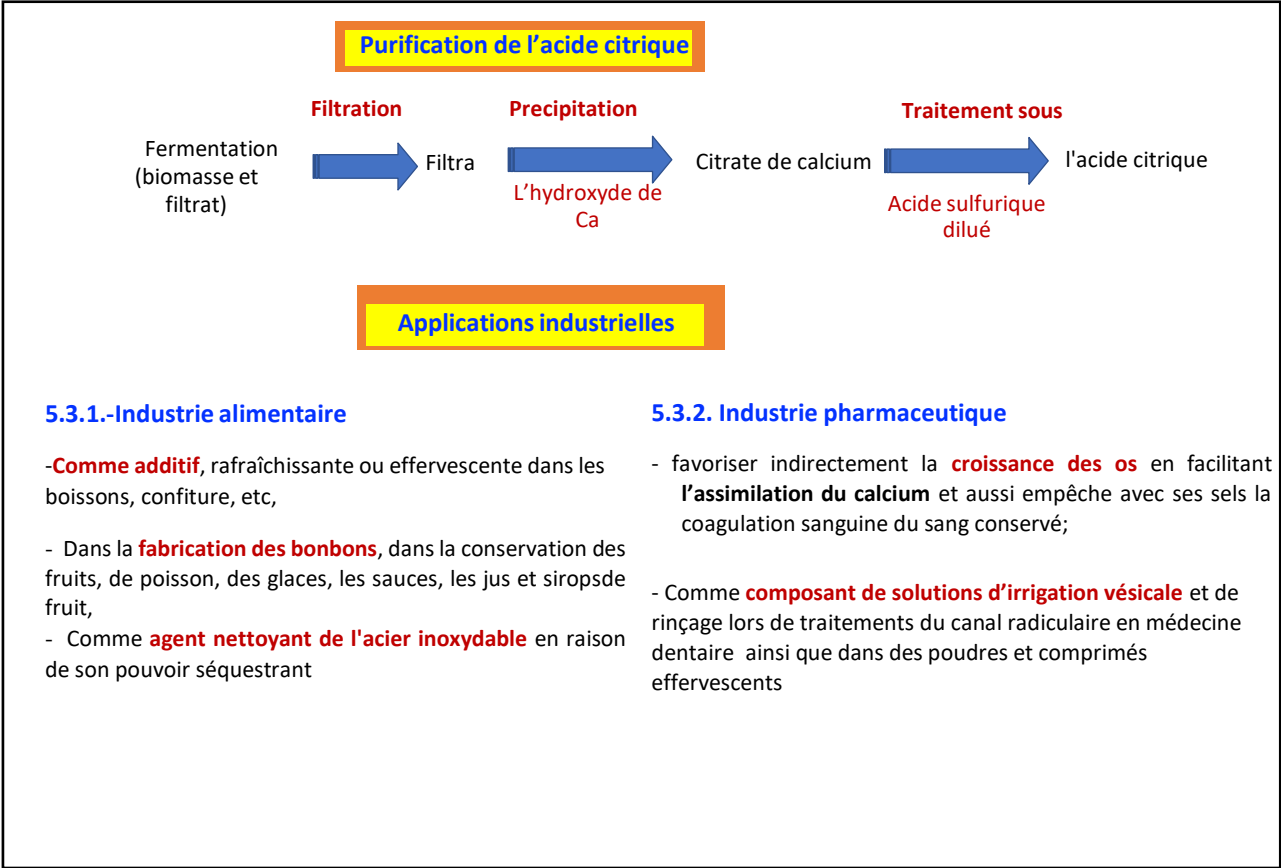


Figure 27: Synthèse de l'acide citrique (cycle de KREBS).

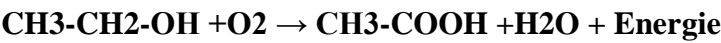
L'acide citrique peut être produit à partir de canne à sucre, son de blé ou de riz ou encore de grains de café, etc. En effet, sa production est fortement influencée par le type et la concentration de la source de carbone. Cette source de carbone, principalement le saccharose, doit être compris entre 140 et 220 g/L. La source d'azote ne doit pas excéder 0,4 g/L. L'utilisation de sels d'ammonium, comme le sulfate d'ammonium, est préférée pour la production d'acide citrique.

En effet, l'utilisation de ces sels comme source d'azote permet une diminution du pH du milieu de fermentation qui est essentielle pour la production d'acide citrique. Celle-ci est améliorée lorsque le pH est aux environs de 2. La température de fermentation est généralement de 28 à 30°C et le meilleur taux d'humidité initiale est de 70%. Les métaux tels que le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer doivent être présents en faible quantité. Il est important de noter qu'une forte aération augmente la sporulation du champignon entraînant une diminution de production d'acide citrique. Ainsi, il est nécessaire de maintenir le champignon à l'état de mycélium. Avec la souche sauvage d'*Aspergillus niger*, la production d'acide citrique peut varier de 88 à 264 mg/g de matière sèche. L'utilisation d'une souche d'*Aspergillus niger* mutée permet d'obtenir 616,5 mg/g de matière totale.



III.4.2.2. Production d'acide acétique

L'acide acétique provient de l'oxydation de l'alcool par l'oxygène de l'air. Le vin, la bière, le cidre et en général tous les liquides alcooliques fermentés s'aigrissent au contact de l'air. Louis Pasteur s’est appuyé sur les expériences des vinaigriers de son temps ainsi que sur les effets de la fermentation pour déterminer la nature du ferment utilisé. Il montre que le ferment est un être vivant qu'il appelle *Mycoderma aceti* (fleur de vinaigre). Il observa la multiplication dans toutes les directions de ces mycodermes et effectua par la suite de nombreuses expériences pour montrer que *Mycoderma aceti* était le seul ferment dans la production du vinaigre. La réaction de fermentation acétique simplifiée est :



Il existe plusieurs méthodes de production du vinaigre, parmi ces méthodes, La méthode d'Orléans : elle consiste à faire une culture d'*Acetobacter aceti* en mélangeant dans un tonneau ventilé le vin et du vinaigre. Les bactéries sont alors présentes principalement à l'interface air-liquide c'est à dire en surface. Il s’agit d’une méthode de culture statique. Aujourd'hui cette méthode est utilisée pour produire du vinaigre traditionnel et de qualité.

Depuis les travaux de Pasteur, la bactérie *Acetobacter aceti* est mise en culture rationalisée pour une production de vinaigre industrielle. Le processus de fermentation est ainsi accéléré, autrefois de 3 semaines, il est aujourd’hui possible de produire d'importantes quantités de vinaigre en 24 heures.

La méthode industrielle implique l'utilisation d'un bioréacteur fonctionnant avec un niveau élevé d'aération et des bactéries immergées dans la solution de culture. La fabrication du vinaigre industriel utilise différents processus résumés dans le diagramme suivant:

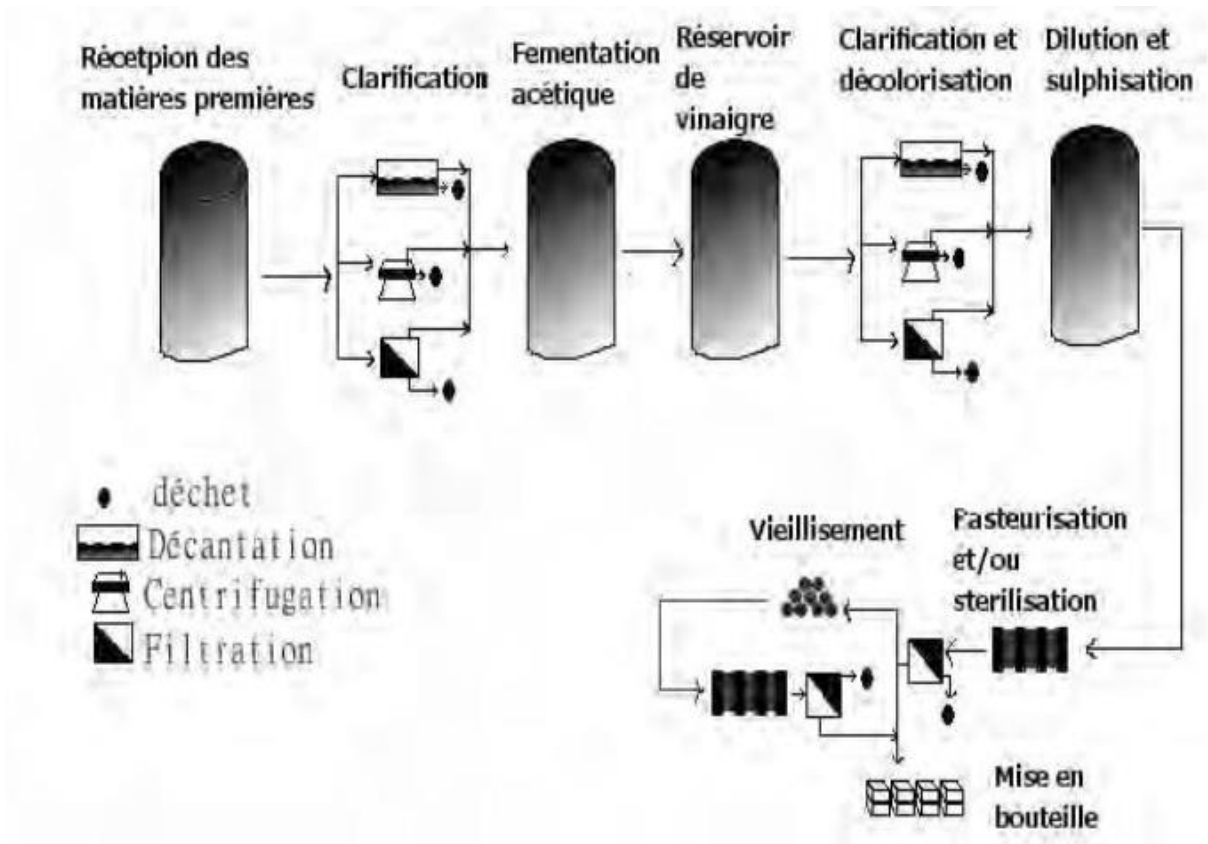


Figure 28: Diagramme montrant les différentes étapes de la fabrication du vinaigre.

Le vinaigre peut être fabriqué à partir de différentes matières premières notamment du raisin, du riz, des pommes, des baies, des céréales, du petit-lait ou du miel. La législation concernant l'appellation vinaigre varie selon les pays : en Europe la concentration en acide acétique doit être au moins de 60g.L⁻¹ et aux Etats-Unis elle doit être d'au moins 40g.L⁻¹

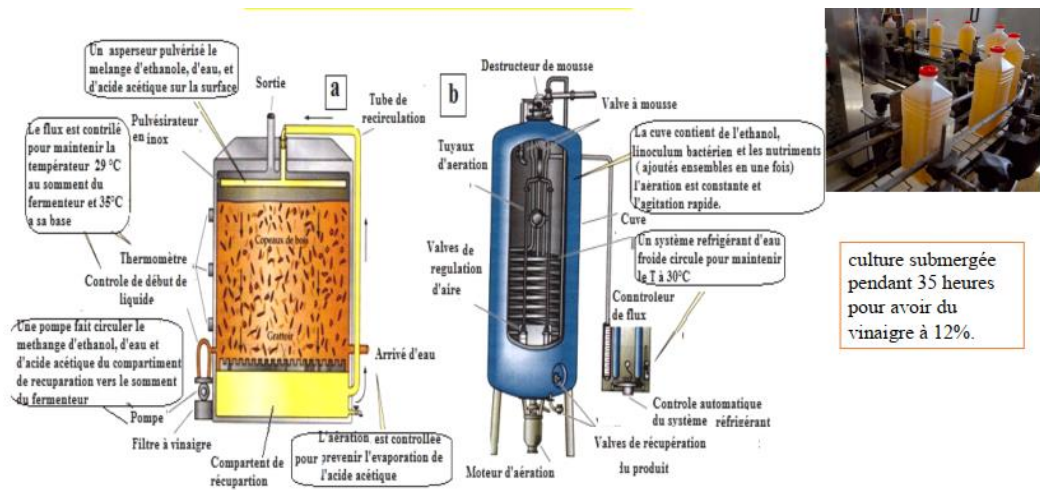


Figure 29: Fabrication industrielles de vinaigre par le générateur à ruissellement de type Frings (a) et par Fermentation en batch (acetateur, b)

➤ **séparation et purification et emballage de vinaigre**

Elle est plus utilisée

la microfiltration

taille des pores et par la structure de la membrane.

l'ultrafiltration e

un processus physique (mécanique) utilisant une **membrane (pores > 0,1 micron)** retiennent toutes les particules de vinaigre qui sont plus grandes qu'eux. Il en résulte **un vinaigre transparent**, dans lequel aucun dépôt ne pourra plus se former. Seul le **vinaigre de pomme** échappe à cette microfiltration, d'où son **aspect trouble**.

➤ Avant dernière étape, des **ingrédients complémentaires** (le sel, le sucre, le miel, etc) sont ajoutés, puis le vinaigre est soumis à la **pasteurisation** et conduit par des tuyaux fixés au plafond au conditionnement à une **température constante de 65°C**.

➤ **Vinaigre d'alcool** (vinaigre «blanc»)- fabriqué à partir de **mélasse** ayant subi une **fermentation alcoolique**. La plupart des vinaigres issus d'une **solution aqueuse d'éthanol** ont une teneur en **acide acétique** d'environ **5 à 8 % en masse** ainsi que de **faibles teneurs en acide tartrique** et **acide citrique**.

➤ **Vinaigre de cidre** - fabriqué à partir de jus de pomme fermentée.

➤ **Vinaigre de vin** - fabriqué à partir de vin de mauvaise qualité, subi à une oxydation par l'air.

➤ **Vinaigre de malt** - fabriqué à partir de l'alcool obtenu de la fermentation d'amidons

16

III.4.2.3. Production de polysaccharides

- Les polysaccharides sont des **biopolymères macromolécules** sous forme de **polysaccharides** qui peuvent être ramifiées ou linéaires, des homo ou hétéropolymères de monosaccharides acides (**xanthane, gellane**) et/ou neutres, par exemple, **dextrane, scléroglycane**
- Certains **polysaccharides** servent comme **composés de stockage** (ex., le **glycogène**) et d'autres sont excrétés à l'extérieur de la cellule, appelés **exopolysaccharides** ayant une importance commerciale.
- Les polysaccharides sont produits par tous les organismes, mais seuls ceux extraits de **plantes terrestres, d'algues** et de certains **micro-organismes** sont exploités pour leurs propriétés **épaississantes, gélifiantes** et **stabilisantes** dans diverses industries surtout **alimentaires, cosmétique ou pharmaceutique**.

• Applications de polysaccharides

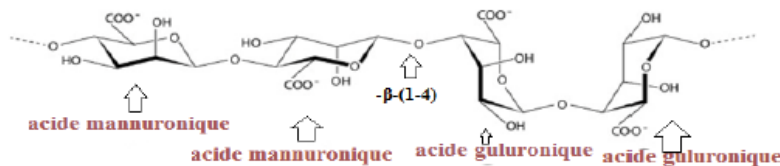
- Ils sont employés dans la **stabilisation des aliments** et la production de **plusieurs composés industriels et pharmaceutiques**
- Ils peuvent **augmenter la viscosité** et sont donc utiles comme **agents épaississants et gélifiants**.
- Ils peuvent être utilisés dans l'industrie **pétrolière** comme des **tensioactifs et des agents biologiques réduisant la viscosité de l'huile trop visqueux** pour être pompé (ex: le **xanthane**), *seulement 50% de l'huile peut être extraite et le reste est piégé dans la roche, soit trop visqueux.*

• Exemples de production de polysaccharides

Il ya de nombreux polysaccharides produits par voie microbiens dont les plus utilisés sont:

➤ Production d'alginate

L'alginate est un polymère linéaire composé de sous-unités d'acide (1-4) - β -D-mannuronique (M) et de son acide C-5 épimère α -L-guluronique (G).



Ils se trouvent principalement dans leur paroi cellulaire avec d'autres polysaccharides comme l'Agar. Actuellement, polysaccharides sont extraits d'algues mais peuvent également être produits par *Azotobacter vinelandii* et *Pseudomonas aeruginosa* en tant que polymère extracellulaire.

Les alginates d'algues (algues) sont également des polymères d'acide mannuronique et d'acide glucuronique et ont une struc comparable à celle des alginates bactériens. Cependant, les alginates d'algues manquent d'acétylation. et sont plus couram utilisés que les alginates bactériens qui sont relativement instables et se dégradent facilement.

- Production et extraction d'alginate

La production industrielle d'alginate est estimée à au moins 30 000 tonnes par an, la totalité provenant d'algues brunes cultivées, principalement des genres *Laminaria* et *Macrocystis* et le reste de quantité est obtenue par certaines bactéries.

- La production est généralement réalisée en culture continue avec un teneur faible en azote et à une température de 12°C pour avoir un rendement de 25%.

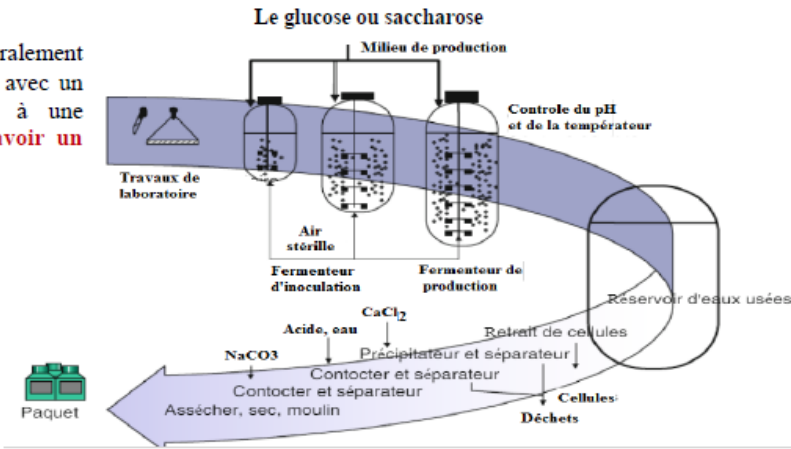
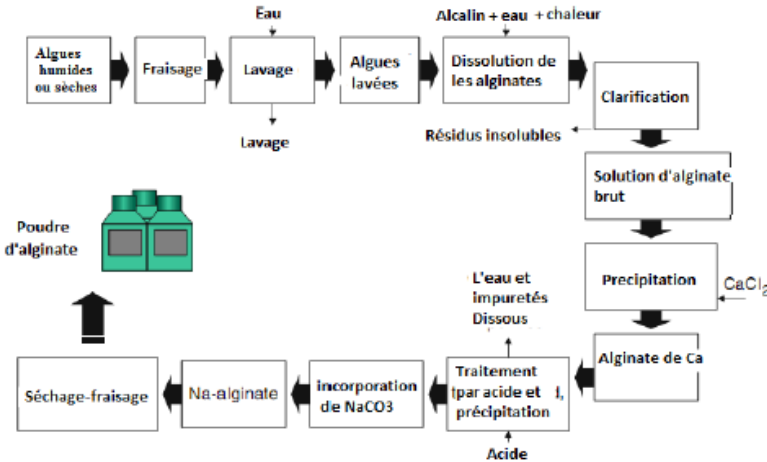


Figure 30 : Schéma représente les étapes de production d'alginate par *Azotobacter vinelandii*

- La production des quantités importantes de biomasse d'algues est généralement réalisée dans des photo-bioréacteurs aérés. Il s'agit des systèmes de tuyaux en plastique transparent où circulent l'eau, les algues et les nutriments utiles à leur croissance (principalement du CO2, du fer, de l'azote et du potassium).

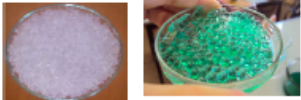
Procédure de production et extraction de l'alginate à partir d'algues.



- Applications d'alginate

- ils possèdent des propriétés matérielles souhaitables surtout leur biocompatibilité
 - apparente ce qui a conduit à une utilisation croissante dans les industries médicale, pharmaceutique et biotechnologique.
 ➤ Les alginate sont utilisés comme épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants de produits industriels les plus variés depuis les gelées alimentaires (comme les crèmes glacées), les produits de beauté, jusqu'aux peintures et aux encres d'imprimerie.
 ➤ Ils sont utiles pour l'immobilisation de cellules et d'enzymes. Ils peuvent former des gels durs et thermostables utilisés comme additifs alimentaires (E400 à E405) permettant la reconstruction des aliments (jambon, cordons bleus, poisson pané, etc.).

-Des billes d'alginate peuvent également être utilisées en médecine pour encapsuler des médicaments ou des substances biologiques fragiles (enzymes, microorganismes, cellules animales ou humaines).



Ils sont utilisés comme des pansements pour plaies et souvent comme produits utilisés par les dentistes pour les prises d'empreintes dentaires.

Tableau 6 : Autres polysaccharides d'intérêt industriel

Polysaccharides	Structure	Microorganismes producteurs	applications
Pollulane	Polymère α-glucose, α 1→4, et liaisons 1 → 6 glycosidiques.	<i>Aureobasidium</i> <i>α. pollulans</i> (champignons)	Emballage des aliments.
Curdlane	Polymère de β-glucoses avec liaisons β1→3 glycosidiques.	<i>Agrobacterium</i> <i>rhizogenes</i>	-Agent gélifiant pour les aliments cuits' -immobilisation d'enzymes
Acide hyaluronique	polymère linéaire consistant de N-acetyl-D-glucosamine et β-(1-3) D- acide glucuronique	<i>Streptococcus</i> <i>zooepidemicus</i>	- protège les tissus après chirurgie ophtalmologique ou esthétique ; -le remplacement du liquide synovial dans l'arthrite
Xylane	Polymère de xylose (C5H8O5) _n	<i>Rhodophycées</i> <i>chlorophycées</i>	-Fabrication du papier, l'alimentation animale, le bioblanchiment des pâtes et papiers ; bioéthanol
Dextrane	α(1-6)D-glucopyranosyl polymers	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>	-Dans des colonnes de filtration sur gel ; systèmes de séparation de phase incompatibles.
Scleroglucane	Polysaccharide neutre de glucose β 1 → 3 glucanes et liaison β 1 → 6.	<i>Sclerotium glucanicum</i> <i>S. rolfsii</i> et (ascomycètes)	agent viscosifiant; industrie pétrolière (prévenir les venues d'eau) ; stabiliser les peintures au latex, les encres d'impression
Schizophyllane	Exopolysaccharides composé d'un β-1,3 <u>beta-glucane</u> avec une ramification de β-1,6	<i>Schizophyllum</i> <u>commune</u> <i>Athelia rolfsii</i>	stimuler le système immunitaire, à transporter les métaux dans l'eau, à faciliter la délivrance de médicaments et à utiliser certaines nanofibres. ...

III.4.2.4. Classification des polysaccharides microbiens

a. Classification en fonction de la localisation cellulaire

- Les polysaccharides de la paroi cellulaire sont des polysaccharides de structure constituant la paroi cellulaire tels que les peptidoglycanes et les acides téichoïques. Ex: Chez les bactéries Gram-négatives: Les lipopolysaccharides (LPS). Les LPS sont d'une partie osidique débordant de la membrane externe, cette dernière comprend un cœur oligosidique sur lequel est fixée une chaîne polysaccharidique parfois appelée (antigène-O).
- Les polysaccharides du cytoplasme ou intracellulaires C'est un type de polysaccharides qui se trouvent à l'intérieur de la cellule (dans le cytoplasme), généralement difficiles à extraire, où ils sont utilisés généralement comme source d'énergie par les microorganismes (rôle de réserve).
- Les polysaccharides extracellulaires ou exopolysaccharides (EPS) Groupe de polysaccharides qui ne sont pas liés à la surface cellulaire, ils se présentent soit sous forme d'une capsule enrobant la cellule soit secrétés à l'extérieur de la cellule (dans le milieu environnant); EX: dextranes, levanes, Xanthane...

b. Classification des polysaccharides en fonction de leur composition en monomères

Les polysaccharides, peuvent être subdivisés en deux groupes: les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides en fonction de leur composition chimique.

1. **Les homopolysaccharides** Contenant un seul type de monosaccharide (monomère saccharidique = homogène).

Ex: α-glucanes: généralement composés par des monomères de D-glucose (Fig. 23) comme:

- **Dextranes** produits par *Leuconostoc mesenteroides* ;
- **Mutane** produits par *Streptococcus mutans* ;
- **B-fructanes**: constitués de résidus de fructose comme:
- **levanes** produits par *Streptococcus salivarius* (**Tableau 7**)

2. Hétéropolysaccharides

Polysaccharides hétérogènes, contiennent de deux à huit unités monosaccharidiques différentes, parmi lesquels (le galactose, le glucose, le rhamnose, la N-acétyl-glucosamine...).

Tableau 7: Principaux homopolysaccharides naturels

Unité de répétition		
Type	Polysaccharide	Liaison Glycosidique /Monosaccharide
Linaire	Amylose	α -(1→4)-Glc
	Cellulose	β -(1→4)-Glc
	Xylane	β -(1→4)-Xyl
	Inuline	β -(2→1)-Fru
	Levane	β -(2→6)-Fru
	Laminarine	β -(1→3)-Glc
	Chitine	β -(1→4)-Glc-N-Ac
	β -Glucane	β -(1→4, 1→3)-Glc
	Curdlane	β -(1→3)-Glc
Ramifié	Amylopectine	α -(1→4, 1→6)-Glc
	Dextrane	α -(1→2, 1→3, 1→4, 1→6)-Glc
	Levane	α -(2→1, 2→6)-Fru
	Pullulane	α -(1→6)-maltotriose
	Scleroglucane	α -(1→3, 1→6)-Glc
	Glycogene	α -(1→4, 1→6)-Glc
	Lentinane	β -(1→3, 1→6)-Glc
	Grifolane	β -(1→3, 1→6)-Glc
	Schizophyllane	β -(1→3, 1→6)-Glc

- Production et extraction de polysaccharides microbiens

➤ La production naturelle de polysaccharides par des bactéries est relativement faible par rapport au développement industriel de polymères.

➤ Il est donc nécessaire d'optimiser les conditions de fermentation comme le pH, la température, l'agitation, et la composition du milieu de culture (source d'azote, de carbone...). Le rapport carbone/azote d'environ 10: 1 est considéré comme favorable pour une synthèse optimale des polysaccharides.

➤ Les exo polysaccharides posent des problèmes lors de leur production en bioréacteur à cause de leur très grande viscosité, ce qui empêche le transfert de chaleur, de masse et d'oxygène. Il est donc important d'utiliser des bioréacteurs agités mécaniquement et aérés.

❖ Le processus de production est principalement réalisé par fermentation en culture discontinue.

➤ Pour l'extraction d'exopolysaccharides

Le milieu de fermentation

centrifugation ou filtration.

filtrat

précipitation par Isopropanol Ou à l'alcool

Polysaccharides et protéines et une partie de la biomasse insoluble.

+ biomasse

traitement enzymatique (pour hydrolyser les protéines et les débris cellulaires est généralement utilisé).

Exp : Xanthane

- La xanthane est le polysaccharide exocellulaire (EPS) industriel le plus utilisé, produit par fermentation du glucose/saccharose.
- La xanthane est produite par la bactérie *Xanthomonas campestris*.
- Elle est soluble dans l'eau froide et présente un écoulement pseudo-plastique élevé.
- Le genre *Xanthomonas* appartient aux protéobactéries et comprend des pathogènes des plantes.

- Ce sont des bâtonnets mobiles, aérobies, Gram négatif, et produisent généralement des pigments jaunes pendant leur croissance.

➤ *Xanthomonas campestris*

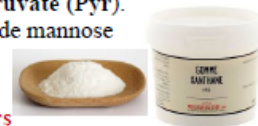
- C'est une espèce bactérienne qui cause diverses maladies des plantes.
- Ces bactéries se trouvent couramment sur les feuilles de légumes brassicacées comme le chou.
- *Xanthomonas campestris* provoque la pourriture noire chez les plantes appartenant au genre Brassica (chou, chou-fleur, choux de Bruxelles, brocoli, rutabaga, navets, etc.).
- Cette bactérie produit des polysaccharides à la surface de sa paroi cellulaire au cours de son cycle cellulaire normal par des processus enzymatiques complexes.
- Elle est utilisée pour la production commerciale de gomme xanthane, qui est un viscosifiant efficace de l'eau et a des usages importants dans l'industrie alimentaire.

➤ Production

- Le **xanthane** est un hétéropolysaccharide composé d'un pentasaccharide contenant du glucose (Glc), du mannose (Man) et de l'acide glucuronique (GlcA) avec de l'acétate (Ac) et du pyruvate (Pyr).
- Les chaînes latérales contiennent un résidu d'acide glucuronique entre deux résidus de mannose

. Production et extraction de xanthane

- réalisée par *Xanthomonas campestris* dans une culture en batch pendant 2-3 jours
 - Le milieu de production est composé de : 4 à 5% de glucides (glucose, saccharose, hydrolysats d'amidon de maïs), 0,05 à 0,1% d'azote (nitrate d'ammonium, urée, extrait de levure) et des sels, avec un pH de 7,0.
- aussi réalisée par *Leuconostoc mesenteroides* NRRL 8512 dans une culture discontinue pendant 24 heures
 - un milieu de culture: 10- 15% de saccharose, 0,1% de peptone, 0,1% de KCl et 0,2% de Na_2HPO_4 , à pH =8.
- Extraction du xanthane se fait par précipitation par de l'isopropanol ou du méthanol, puis il peut être séché et utilisé à des fins commerciales.



..... Applications de xanthane

- Le xanthane est très utilisé dans divers domaines: comme additif alimentaire (E415) (crème glacée, fromage) pour ses propriétés épaississantes et gélifiantes afin de modifier la consistance des aliments.
- Il est également utilisé dans l'industrie pétrolière pour améliorer la récupération du pétrole.
- xanthane est utile pour la préparation de pâtes dentifrices et de peintures à base d'eau.

28

Dextrane

Production de dextrane

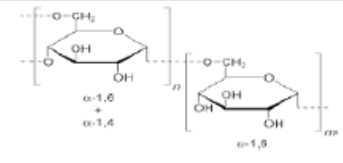
Le **dextrane** ($H(C_6H_{10}O_5)_n OH$) est un polymère ramifié de dextrose (glucose) avec une masse moléculaire très élevée, appartenant au groupe **des colloïdes**. Il s'agit d'un **exopolysaccharide** composé des **glucoses** reliés par des liaisons hydrolysables **alpha 1-6**, et des ramifications constituées de liaisons **alpha 1-2**, **1-3** ou **1-4**. Ces liaisons sont

- Les principales bactéries synthétisant le dextrane appartiennent à la famille des **Lactobacteriaceae**, au genre **Leuconostoc**, surtout les deux espèces **L. mesenteroides** et **L. dextranicum** ainsi que **Streptococcus mutans** de la famille **Streptococcaceae**

Applications industrielles de dextrane

- le dextrane est un premier polysaccharide microbien commercialisé :
- le **domaine agroalimentaire**: les vinaigrettes, les sirops, les produits à base d'amidon, les boissons, les abrasifs, les revêtements texturés et la récupération assistée de l'huile ;
- le **domaine médical** comme dilateurs du **plasma sanguin**, pour la prévention de la **thrombose** et dans le traitement des plaies ;
- **Domaine cosmétique** en tant que un agent de contrôle de la viscosité, adjuvant, émulsifiant ou stabilisant,
- **Domaine de la recherche** pour la purification de biomolécules ou il utilise dans les techniques analytiques de laboratoire.

29



III.4.2.5. Milieu de culture et récupération

Le choix du milieu convenable est un paramètre crucial pour un meilleur rendement. Cependant, le milieu de fermentation industriel retenu pour la production du polysaccharide contient les éléments indispensables à la bonne croissance des microorganismes, mais aussi à une bonne production de polymère (l'azote, le carbone, le fer, le magnésium, le cuivre, le zinc, le manganèse, etc).

Les méthodes utilisées pour récupérer les polysaccharides à partir du moût de culture vont dépendre de la pureté requise, pour cela, les étapes ci-dessous sont généralement utilisées à la fin des processus de fermentation:

- Un traitement enzymatique sur le moût de culture pour hydrolyser les protéines et les débris cellulaires
- Une centrifugation et/ou une filtration pour retirer les insolubles qui peuvent être suivies d'une ultrafiltration pour éliminer les composés de bas poids moléculaire (protéines, sels) et/ou pour concentrer le polysaccharide
- Précipitation à l'aide d'alcool, d'acétone ou de méthanol
- Les culots récupérés par centrifugation passent à une dialyse appropriée dans de l'eau distillée
- Enfin, lyophiliser les polysaccharides afin d'obtenir des EPS bruts

Exemples de microorganismes producteurs: *Pseudomonas elodea*, *Xantomonas campestris*, *Streptococcus*, *Rhizobium*, *Azotobacter vinelandii*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Vibrio diabolicus*...

III.4.3. Antibiotiques

III.4.3.1. Définition

Du grec « anti » (contre) et « bios » (vie), le terme antibiotique désigne toute substances (molécules) d'origine naturelle (biologique) et/ou synthétique et/ou semi synthétique, et qui, en très faible concentration entraine la destruction des bactéries (effet bactéricide), ou empêche leur croissance (effet bactériostatique), par une action au niveau d'une étape métabolique indispensable à la survie de la bactérie.

Tableau 8: Provenances des antibiotiques

Microorganismes	Antibiotiques
Bâtonnets à Gram positif <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>	Bacitracine Polymyxine
Actinomycètes <i>Streptomyces nodosus</i> <i>Streptomyces venezuelae</i> <i>Streptomyces erythraeus</i> <i>Streptomyces griseus</i>	Amphotéricine B Chloramphénicol Erythromycine Streptomycine
Mycètes <i>Cephalosporium spp.</i> <i>Penicillium notatum</i>	Céfaloine Pénicilline

III.4.3.2. Production industrielle des antibiotiques

Tous les antibiotiques étaient initialement des produits du métabolisme microbien. Nombre d'entre eux sont encore fabriqués par fermentation microbienne et on continue à sélectionner des mutants à rendement élevé par manipulation nutritionnelle ou génétique. Six mille antibiotiques au moins ont déjà été décrits. Un seul microorganisme, Streptomyces hygroscopicus, présente différentes souches que fournissent près de 200 antibiotiques différents. La production industrielle d'antibiotiques se fait généralement par inoculation d'une solution d'un milieu de culture avec des spores d'une moisissure (**Fig. 31**).

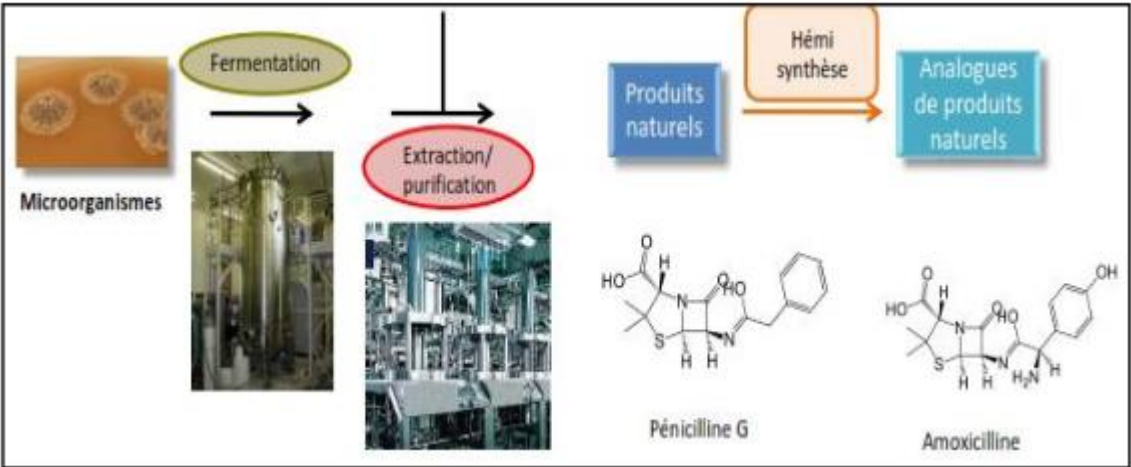


Figure 31: Etapes de production des antibiotiques.

Le milieu de production doit initialement assurer une croissance significative pour conduire à une concentration élevée en cellule au moment de la production. Il doit assurer ensuite la maintenance de la vitalité des cellules et la production optimisée des antibiotiques. Il doit de ce fait fournir des sources d'énergie et maintenir les conditions physico-chimiques désirées (pH, T°, oxygénation). Lorsque la croissance des microorganismes a donné une concentration d'antibiotiques satisfaisante, on extrait ce dernier de la solution par précipitation et au moyen d'un autre procédé industriel (**Fig. 32**).

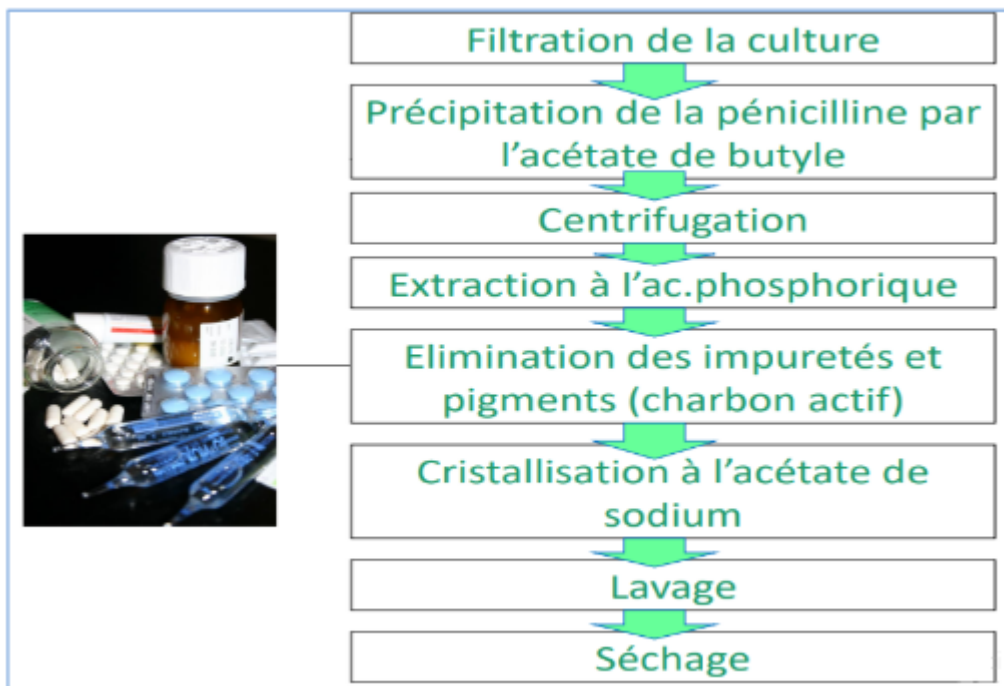


Figure 32: Procédé de purification de la pénicilline

a. Exemple d'antibiotiques

* La pénicilline

Le terme pénicilline regroupe plus de 50 antibiotiques chimiquement apparentés, avec une structure commune dans laquelle le cycle B-lactame tient lieu du noyau. Elles se distinguent par les chaînes latérales chimiques qui sont rattachées au noyau.

Les pénicillines sont produites par voie naturelle ou par voie semi-synthétique. Les pénicillines extraites de cultures de *Penicillium* existent sous plusieurs formes apparentées ; on les appelle pénicillines naturelles. Le composé type de toutes les pénicillines est la pénicilline G, cette molécule possède un spectre d'action étroit mais néanmoins utile, et constitue souvent le traitement de choix contre les Staphylocoques et Streptocoques.

Les pénicillines naturelles comportent toutefois des désavantages, notamment leur spectre d'action étroit et leur sensibilité aux pénicillinases (pénicillinases ou B-lactamases, sont des enzymes qui clivent le cycle B-lactame de la molécule de pénicilline).

Pour tenter de pallier les désavantages des molécules naturelles, les scientifiques font appel aux deux méthodes pour fabriquer des pénicillines semi-synthétiques. Premièrement, ils bloquent la synthèse de la molécule par la moisissure *Penicillium* pour n'obtenir que le noyau commun de pénicilline. Deuxièmement, ils éliminent les chaînes latérales des molécules naturelles complètes,

puis ajoutent chimiquement d'autres chaines latérales qui, entre autre choses, confèrent une augmentation de la résistance à la pénicillinase (Ex: la méthicilline).

III.4.4. Production des enzymes

Les enzymes sont des outils catalytiques remarquables qui interviennent dans tous les processus biologiques. A ce titre, elles se positionnent comme des acteurs centraux des biotransformations et de la bioéconomie. L'évolution des techniques de séquençage et d'ingénierie, les **technologies OMICS** et la **biologie computationnelle** etc. ont permis des avancées considérables pour isoler et améliorer les enzymes, ouvrant ainsi de nouveaux champs d'application particulièrement attractifs pour de nombreux secteurs industriels.

Les enzymes sont utilisées dans toutes les industries de la fermentation, que ce soit pour les produits agroalimentaires (distillerie, jus de fruit, sucre, condiments, additifs, viandes, céréales, laits, fromages, plats cuisinés, pain, biscuiterie), dans l'industrie pharmaceutique (antibiotiques, acides divers, vitamines), l'industrie biomédicale (protéines recombinantes, réactifs), les industries biochimiques du nettoyage et de la décontamination (lessives, détergents, traitement de l'eau et des surfaces)

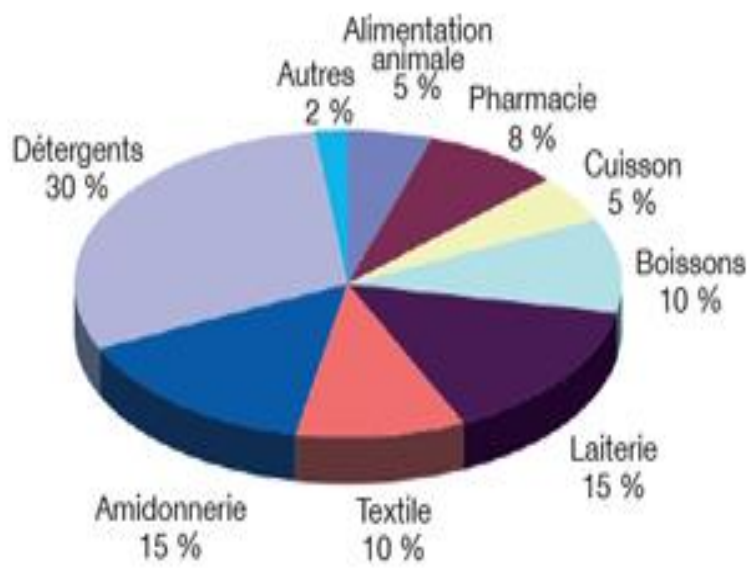


Figure 33. Part du marché occupé par les enzymes dans différents secteurs.

Tableau 9. Les producteurs des enzymes :

Novozyme (Danemark)	50%
DSM (Hollande)	20%
Genencor international (USA)	15%
Amano, Nagase (Japon)	10%
Solvay-Miles (USA)	5%

Des activités enzymatiques diverses sont découvertes dans des organismes vivants. Les enzymes industrielles proviennent de plantes, d'animaux et essentiellement de microorganismes.

Tableau 10. Exemples de protéases utilisées en industrie.

Nom de protéase	Industrie	Application
Savinase	Détergents	Enlever la tâche à base de protéines
Alcalase	Textile	Dégommage de soie
SEB Tender 70	Viande	Attendrissage de la viande
Peptidase	Alimentaire	Hydrolysat de protéines amères

Des milliers d'échantillons du sol, de matériel végétal et d'autres peuvent faire l'objet d'une recherche automatisée d'une activité ou d'une voie enzymatique d'intérêt. Le screening utilise un milieu spécifique qui ne laisse pousser que les microorganismes exprimant un système enzymatique donné. Exemple : un milieu contenant le xylan comme unique source de carbone et d'énergie, ne laisse pousser que les microorganismes produisant des xylanases. Pour distinguer l'organisme ayant l'activité recherchée, on utilise un critère avec lequel il se distingue. Exemple : l'utilisation d'une couche opaque de caséine comme seule source de carbone sur agar, peut révéler les microorganismes sécrétant des protéases en formant un halo clair dû à l'hydrolyse de la caséine autour des colonies développées. D'autres méthodes utilisent des indicateurs colorés ou des substrats chromogènes.

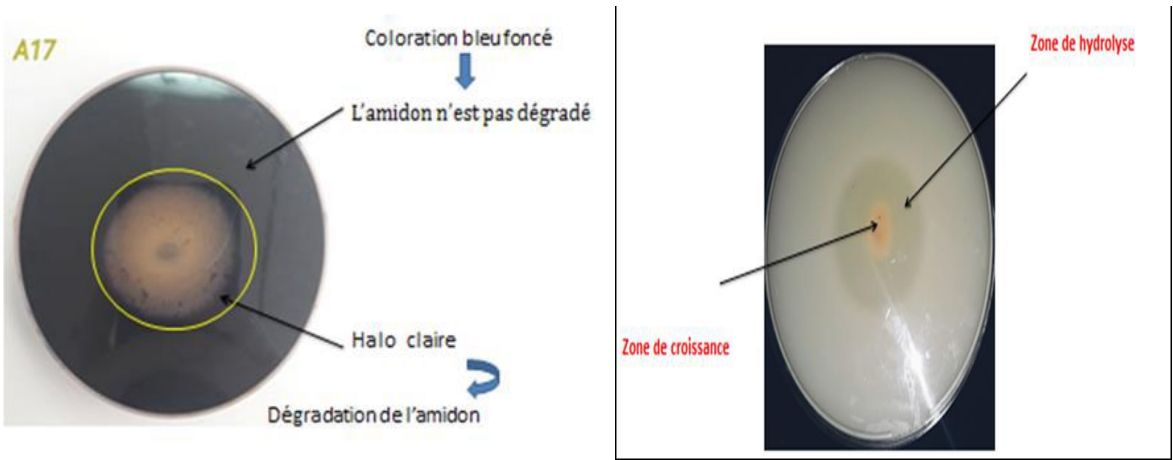


Figure 34: Principe de révélation de l'activité amylase par le *lugol* et de caséinase.

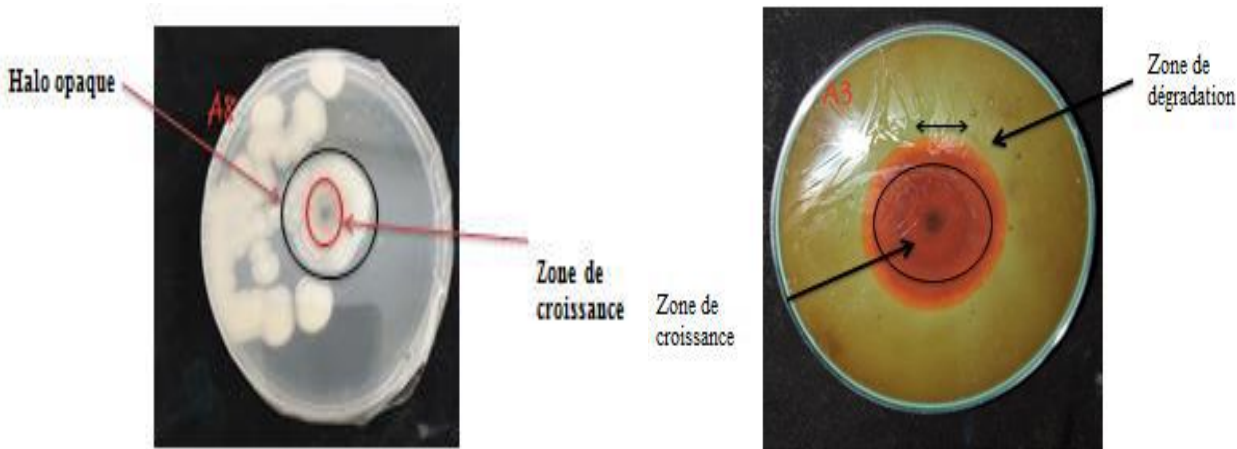
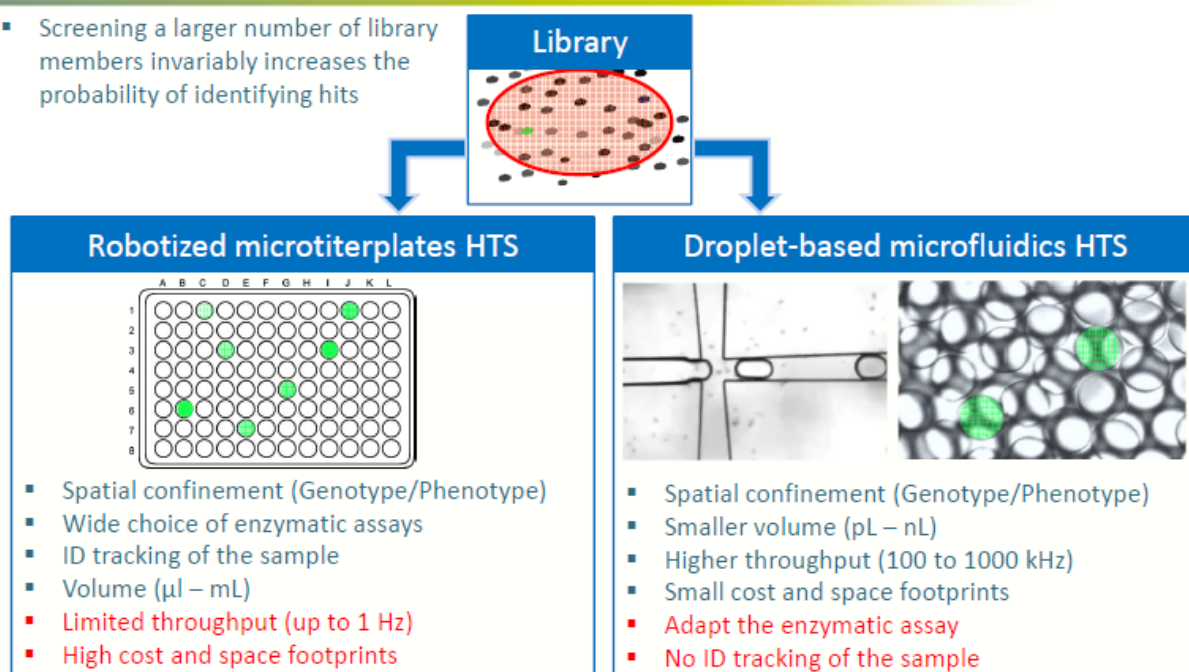


Figure 35: Principe de révélation de l'ésterase et de pectinase par l'acétate de cuivre.

Des nouvelles techniques, comme la **droplet-based microfluidic** a été mise en place. Ce procédé mis au point permet l'analyse des activités enzymatiques produites par des micro-organismes ou la sélection de l'organisme le plus efficace parmi une population de variants. A travers cette technique et son optimisation, le coût, la rapidité et les consommables ont été considérablement réduits. Ceci a été probant pour le screening d'une banque de mutants d'*Aspergillus niger* sécrétant d'acide d'alpha amylase et la mise en évidence de bactéries cellulolytiques extraites d'échantillon de chaume de paille (screening en de 100 000 bactéries en 20 minutes).

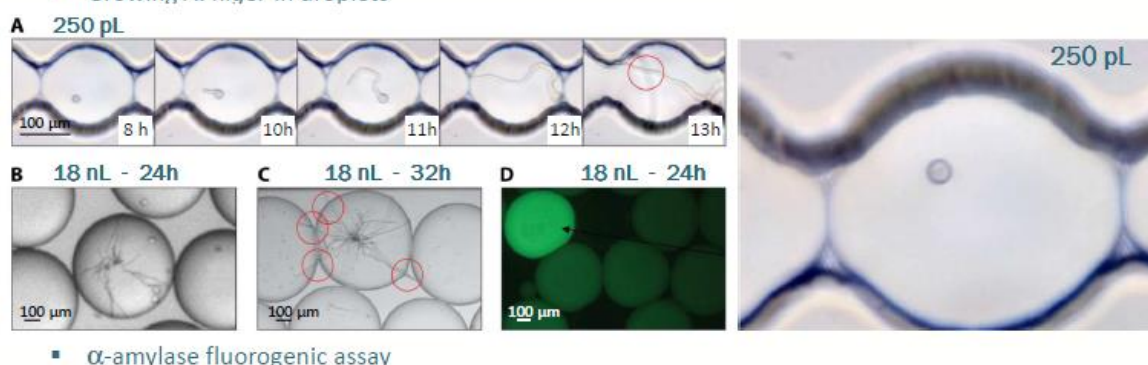
SCREENING TECHNOLOGIES

- Screening a larger number of library members invariably increases the probability of identifying hits



SCREENING OF FUNGI LIBRARY

- Screening of *Aspergillus niger* library for acidic α -amylase secretion
 - Growing *A. niger* in droplets



- α -amylase fluorogenic assay

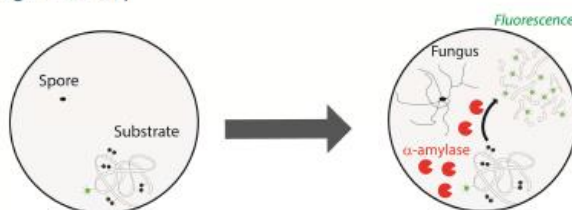


Figure 36. Technologie de criblage des activités enzymatique par la technique de droplet microfluide HTS.

Le problème souvent rencontré avec le screening classique est la faible concentration de l'enzyme d'intérêt dans les isolats microbiens naturels ou bien parfois des propriétés insuffisantes pour l'utilisation en industrie. Des manipulations génétiques permettent parfois d'améliorer les propriétés du microorganisme ou de l'enzyme. Dans le cas où une enzyme aux propriétés intéressantes a été identifiée chez une espèce particulière, une recherche peut être effectuée pour des enzymes homologues chez des espèces proches (reverse genetics).

Les caractéristiques recherchées dans une souche produisant une enzyme industrielle sont : taux de croissance important, productivité en enzyme importante, activité spécifique de l'enzyme élevée, régulation réduite, résistance à la répression catabolique, peu de produits secondaires, sporulation limitée, nutrition réduite, enzyme extracellulaire, morphologie adaptée à la culture en réacteur.

Comme il est difficile de trouver toutes ces caractéristiques chez le même organisme, la majorité des souches servant à la production d'enzymes industrielles ont été améliorées par : omutagenèse (agents chimiques ou irradiation UV) permettant d'atteindre rapidement des caractéristiques utiles ou, génie génétique permettant à des microorganismes de produire des enzymes d'organismes supérieurs par insertion du gène correspondant dans le microorganisme. La chymosine (E.C. 3.4.23.4) a été clonée par différents groupes dans plusieurs microorganismes faciles à cultiver comme la levure pour produire de manière industrielle des préparations enzymatiques coagulant le lait.

III.4.4.1. Choix des souches productrices :

En choisissant la souche productrice plusieurs aspects doivent être considérés :

- L'enzyme est sécrétée à l'extérieur de la cellule. Ceci rend l'extraction et la purification beaucoup plus faciles comparées à la production des enzymes intracellulaires, qui doivent être purifiées des milliers de protéines cellulaires et d'autres composants.
- L'organisme producteur doit répondre aux exigences de confinement (c'est-à-dire faire partie des souches **GRAS** « **generally recognized as safe** ». Ce qui est particulièrement important lorsque l'enzyme produite est employée en industrie alimentaire.

Le procédé industriel typique pour la production d'enzymes est la culture en profondeur en milieu aérobie utilisant un microorganisme produisant en grande quantité une enzyme extracellulaire. Les principaux avantages des enzymes de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction :

- Production en grande quantité en fermenteur,
- Production indépendante des contraintes géographiques et saisonnières,
- Matière première bon marché,
- Manipulation génétique facile – mutants hyperproducteurs,
- Purification plus facile en cas d'enzymes extracellulaires.

L'utilisation des déchets comme matière première a permis de résoudre le problème du coût élevé de la matière première (40-60% du coût de production).

III.4.4.2. Processus de purification :

La mise en œuvre d'un processus de purification de l'enzyme nécessite la détermination de certain nombre éléments :

- La connaissance des caractéristiques de la matière première : sa nature (liquide, solide), son type général (animal, végétal, microbien), sa structure biologique cellulaire, tissulaire...);
- La localisation de l'enzyme (mitochondries, cytoplasme, membranes...) ainsi que ses propriétés structurales et physicochimiques (poids moléculaire, organisation structurale, constantes cinétiques, stabilité moléculaire, pH optimum, point isoélectrique, activateurs, inhibiteurs...);
- Le procédé doit libérer la protéine sous forme soluble et sans pertes d'activité ;
- Pour éviter la dénaturation de l'enzyme, le processus doit s'opérer à basse température (opérations à + 4 °C, appareils réfrigérés, réactifs refroidis...), dans des milieux tamponnés, contenant ou non des agents protecteurs (EDTA, 2-mercaptoéthanol, substrats...), aussi rapidement et soigneusement que possible.

Dans la majorité des cas, la matière première de départ est extrêmement hétérogène et il est pratiquement impossible d'isoler une molécule suffisamment purifiée, en une seule étape. Pour cela l'isolement de l'enzyme recherchée est réalisé en trois grandes étapes :

- L'extraction donne un mélange de molécules, sous forme soluble, possédant un même comportement physicochimique. Cette étape dépend de la localisation de l'enzyme. Il existe :
 - Des enzymes extracellulaires ;
 - Des enzymes exocellulaires qui sont synthétisées à l'intérieur de la cellule, puis sécrétées dans l'espace extracellulaire ;
 - Des enzymes intracellulaires sont synthétisées et utilisées entièrement à l'intérieur de la cellule.
- Fractionnement du mélange en jouant sur les différences de solubilité pour obtenir une famille moléculaire.
- Purification par des méthodes physicochimiques ou biospécifiques plus fines conduisant à une molécule pure.

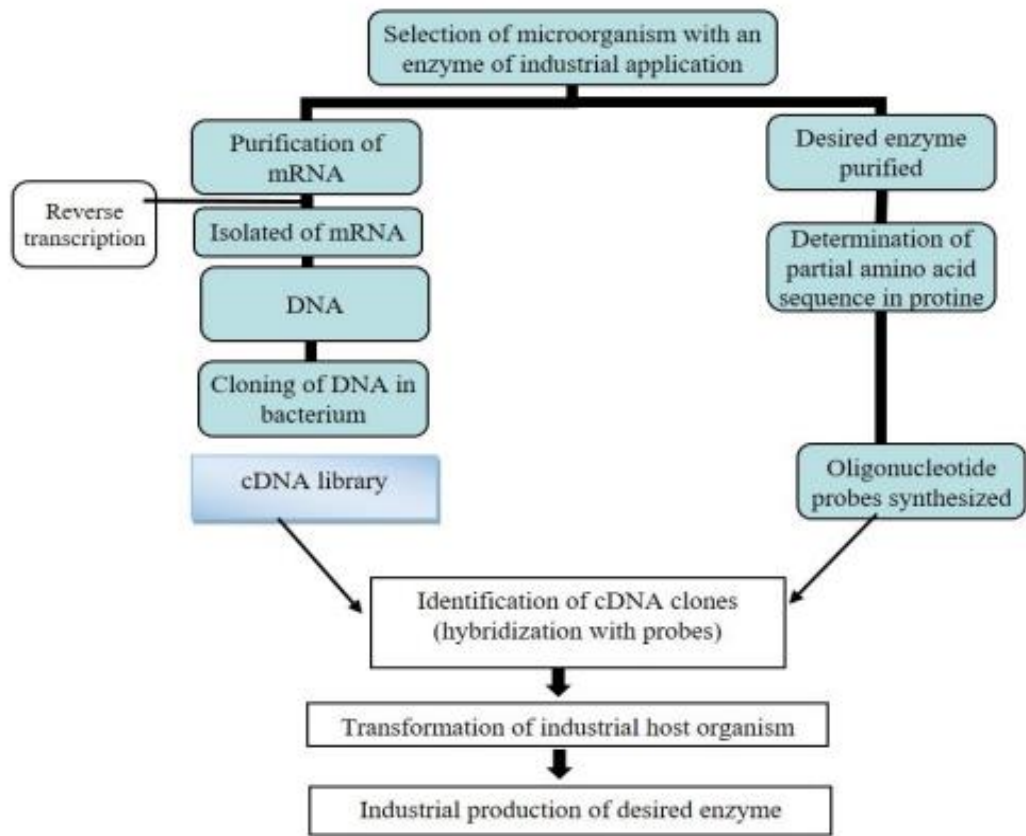


Figure 37. Schéma général de production d’enzymes.

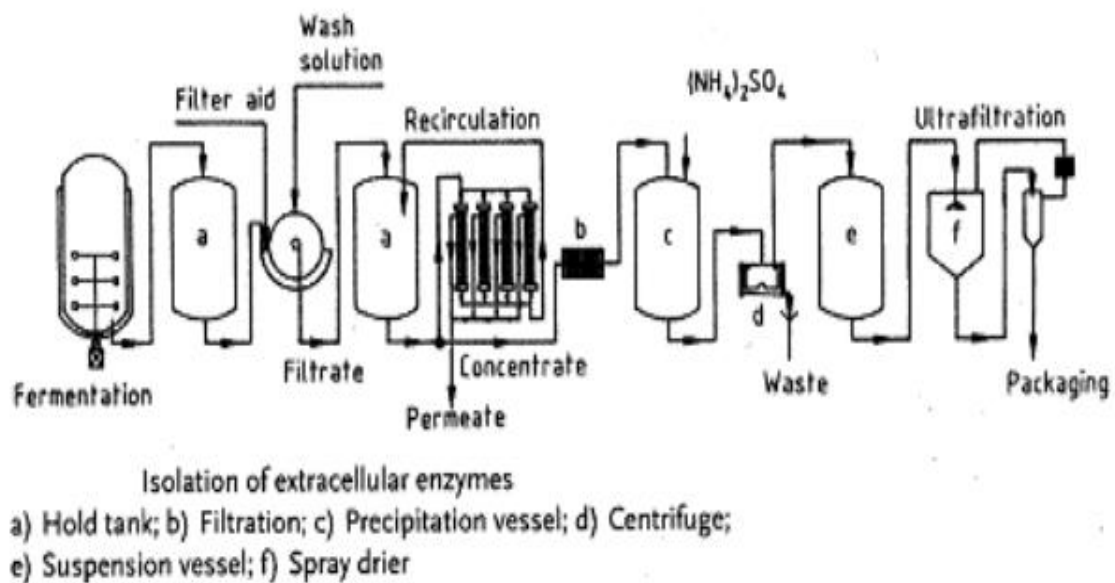


Figure 38. Chaîne de production d’enzymes à l’échelle industrielle.

Une grande variété de microorganismes (bactéries, levures, moisissures, algues, protozoaires, gastéropodes et arthropodes) produisent les enzymes xylanolytiques. Les moisissures constituent le groupe le plus intéressant à cause de leur large spectre d'activités xylanolytiques De plus en plus, les xylanases commerciales sont produites aussi bien par fermentation liquide que solide.

Exemple. La production des xylanases de moisissures, particulièrement par *Penicillium canescens* en fermentation solide.

Les xylanases constituent la proportion commerciale majoritaire des hémicellulases. Elles peuvent être utilisées seules dans une large gamme de procédés industriels. Les xylanases sont fréquemment

utilisées dans la formulation d'aliments pour les animaux (amélioration de la digestibilité et de la valeur nutritive), en industries des jus de fruits et brassicoles (amélioration de l'extraction ou la filtration), en amidonnerie (amélioration de l'opération d'extraction), en industrie du papier (amélioration de la pureté de la cellulose, permet une réduction de 50 % de la quantité de chlore nécessaire au blanchiment du papier et de la quantité d'organochlorés rejetés dans l'environnement.

D'autres applications existent, dans l'extraction du café et dans la préparation des cafés solubles, dans les détergents, dans la production de polysaccharides actifs pharmacologiquement (pour une utilisation comme agents antimicrobiens ou comme antioxydants), dans la production des alkyl glycosides (pour une utilisation comme surfactants), etc.

Le nombre de gènes xylanases Xln R (chez les Aspergilli et les Penicillia) et le type de substrat carboné inducteur expliqueraient le niveau de xylanases synthétisées par une moisissure. Deux types de substrats carbonés existent : les substrats solubles simples et les substrats insolubles complexes (les résidus agricoles et agroalimentaires). Cela suggérerait l'existence de deux groupes de Penicillia : ceux ne possédant que des sites de fixation pour les substrats simples et ceux possédant des sites de fixation pour les substrats complexes.

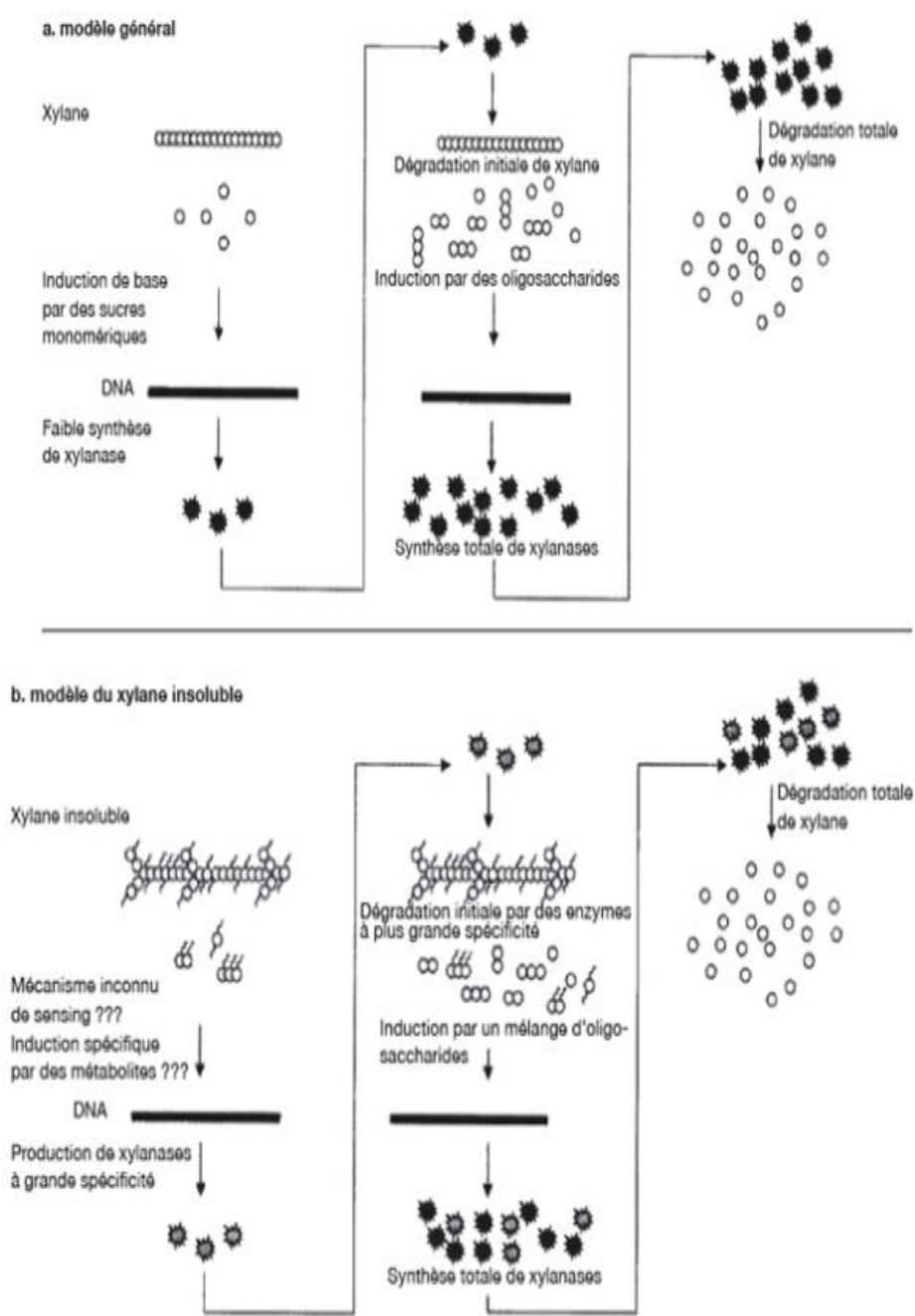


Figure 39. Modèle proposé pour l’expression des xylanases par les Penicillia.

Série de TD 02 : La production des métabolites primaires et secondaires

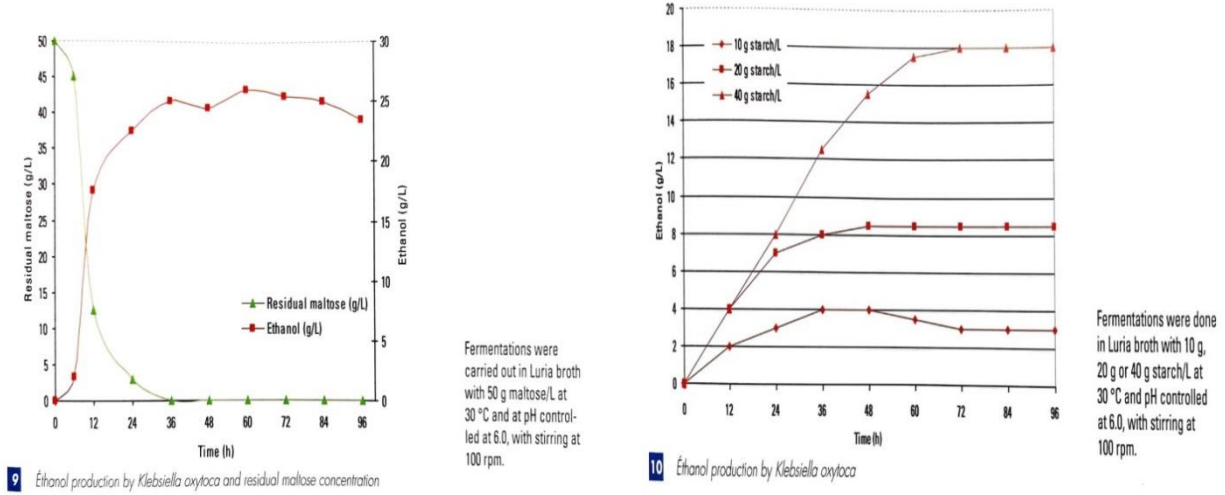
Exercice 1: Utilisation de l'amidon pour la production d'éthanol

Des études ont été réalisées pour produire de l'éthanol, comme biocarburant, à partir de l'amidon de pomme de terre. La fermentation de l'amidon et du maltose par une souche de *Klebsiella oxytoca* a été effectuée dans un bioréacteur de laboratoire de 2 litres.

- 1) 10 mL de milieu de culture sont prélevés toutes les 12 heures. Les dosages de l'éthanol et des glucides résiduels sont effectués après centrifugation. Pourquoi doit-on centrifuger le milieu avant d'effectuer les dosages ?
- 2) Fermentation du maltose : Les résultats obtenus avec le maltose sont représentés sur la **figure 1**. Calculer le rendement de conversion obtenu en g d'éthanol produit par g de maltose consommé après 36 heures de fermentation. Comparer cette valeur au rendement maximum théorique de 53 %. Conclure.
- 3) Production d'éthanol à partir de l'amidon : Les résultats sont portés sur la **figure 2**. Afin d'exploiter ces résultats, compléter le tableau ci- dessous. Quelle condition de fermentation (durée et concentration en amidon) semble la plus intéressante sur le plan industriel pour produire de l'éthanol à partir d'amidon?

Tableau. Production d'éthanol à partir de l'amidon

Concentration initiale en amidon (g/L)	10	20	20	40	40
Temps (h)	36	48	72	60	84
Concentration en éthanol (g/L)					
Rendement de conversion (g d'éthanol /g d'amidon initialement présent)					
Productivité volumique (g d'éthanol/L.h)					



Exercice 2. Valorisation d'un sous-produit de la betterave la mélasse pour la production de levure boulangère.

La mélasse résiste bien à l'envahissement microbien, pour peu qu'elle soit stockée à l'abri de l'air. Sa composition est présentée dans le **tableau 1**. Par contre, une fois diluée, elle constitue un bon milieu de culture. La mélasse diluée au 1/10 peut alors servir de milieu de culture pour produire de la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*). L'opération se déroule en aérobiose. Une fermentation pilote en continu est lancée afin de tester l'intérêt de ce mode de valorisation.

La teneur en biomasse sèche du milieu sortant du fermenteur est de 9,7 g. L⁻¹. Le **tableau 2** indique la composition chimique partielle de cette levure.

- 1) Calculer le rendement brut R1 de cette fermentation. R1 est exprimé en grammes de matière organique sèche de levure formée par gramme de saccharose dans le milieu de culture (mélasse diluée au 1/10).
- 2) Calculer le rendement azoté R2 de cette fermentation. R2 est exprimé en grammes d'azote fixé dans la biomasse par gramme d'azote dans le milieu de culture. On admettra que 6,1 g de matière organique azotée contiennent 1 g d'azote.
- 3) À la lumière des résultats précédents, quelle hypothèse peut-on formuler pour améliorer le rendement brut de la fermentation?

Tableau 1. Composition partielle de la Mélasse de betterave.

COMPOSANT	CONCENTRATION EN g.L ⁻¹
Saccharose	450
Autres molécules organiques	190
Azote total (Kjeldahl)	14
Cendres	100
pH de la mélasse = 6 à 7	

COMPOSANT	TENEUR EN g POUR 100 g DE LEVURE SÈCHE
Protides et acides nucléiques	49
Lipides	3
Glucides	36
Autres molécules organiques	1
Cendres	11

Exercice 3. Production de l'a-amylase en fermenteur.

Les souches utilisées pour la production de l'-amylase sont toutes chimio-organotrophes. Toute production par fermentation nécessite la sélection d'une souche.

- 1) Citer les critères retenus pour choisir une souche “ bonne productrice “ d'enzymes.
- 2) Présenter sous forme d'un tableau les principaux composants d'un milieu de culture pour ce type de micro-organisme, à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle. Quels sont les avantages et les contraintes liés aux milieux utilisés à l'échelle industrielle ?
- 3) Dans le cas particulier de la production d'amylase, quel composant important doit être présent dans le milieu de culture? Justifier.

Exercice 4 : Production des antibiotiques.

- 1) Citer deux genres microbiens producteurs d'antibiotiques. Préciser à quels groupes d'êtres vivants ils appartiennent.
- 2) À quel type de métabolites appartiennent généralement les antibiotiques ? Justifier.
- 3) Représenter sur un même graphe l'allure générale des courbes de croissance de la souche et de la production d'antibiotique.

Production de l'antibiotique spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*

L'espèce *Streptomyces ambofaciens* a été sélectionnée pour sa production de spiramycine. À partir d'une fermentation type en bioréacteur, on a suivi l'évolution de la biomasse (X) et de la spiramycine (P) en fonction du temps (t) (**tableau 1**).

- 1) Tracer la courbe $\ln X = f(t)$. Déterminer la durée de la phase exponentielle, le temps de génération G et la vitesse spécifique de croissance pendant la phase exponentielle $Q_{x\text{ expo}}$
- 2) Tracer $P= f(t)$ sur le même graphique. En déduire le type de métabolite produit par la bactérie. Justifier la réponse.

t (h)	X (g.L ⁻¹)	P (mg.L ⁻¹)
0	3,1	0,0
6	3,2	0,0
12	4,4	0,0
17	6,2	0,0
24	8,8	0,0
36	15,2	9,9
52	18,0	94,5
66	18,2	156,0
72	18,2	182,0
88	18,2	227,0
100	18,2	255,0
114	16,9	280,0
138	14,0	297,0
144	13,3	298,0
162	11,5	306,0
190	10,0	300,0

La spiramycine est produite industriellement depuis plus de vingt ans. Le milieu de production est un milieu liquide complexe, utilisant quelques sous- produits de l'industrie agroalimentaire. Sa composition est détaillée dans le **tableau 2**.

- Analyser la composition de ce milieu en donnant le ou les intérêts des différents constituants.

Tableau 2. Composition de milieu de production.

COMPOSANT	CONCENTRATION EN g.L ⁻¹
<i>Corn steep</i>	20,0
Amidon soluble	50,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
KH ₂ PO ₄	2,8
FeSO ₄	0,5
NaCl	10,0
pH ajusté à 7,7	
Huile de maïs	20,0

Exercice 5 : Production industrielle d'un bio-émulsifiant : l'alsan

Dans le but de produire l'alsan, une substance tensioactive (appelée bio-émulsifiant) utilisée en industrie cosmétique. La culture d'Acine D’*Anstobacter radioresistens* (type aérobie strict) se fait en bioréacteur 15 L (10 L utiles), en procédé fed-hatch à 30 °C avec une forte agitation (500 tr/min) et un débit d'air élevé (1 VVM).

- 1) Justifier le choix des valeurs d'agitation et de débit d'air pour cette culture.
- 2) Légender le bioréacteur de la **figure 1**

3) Les résultats de la croissance bactérienne et de la production d'alsan au cours du procédé sont présentés dans la **figure 2**.

- 1) Délimiter et nommer sur le graphique de la figure 2 les différentes phases de la croissance.
- 2) Décrire brièvement la courbe de l'évolution de l'activité émulsifiante due à la sécrétion de l'alsan en fonction du temps.
- 3) Déterminer la productivité horaire globale en alsan exprimée en U.h⁻¹.

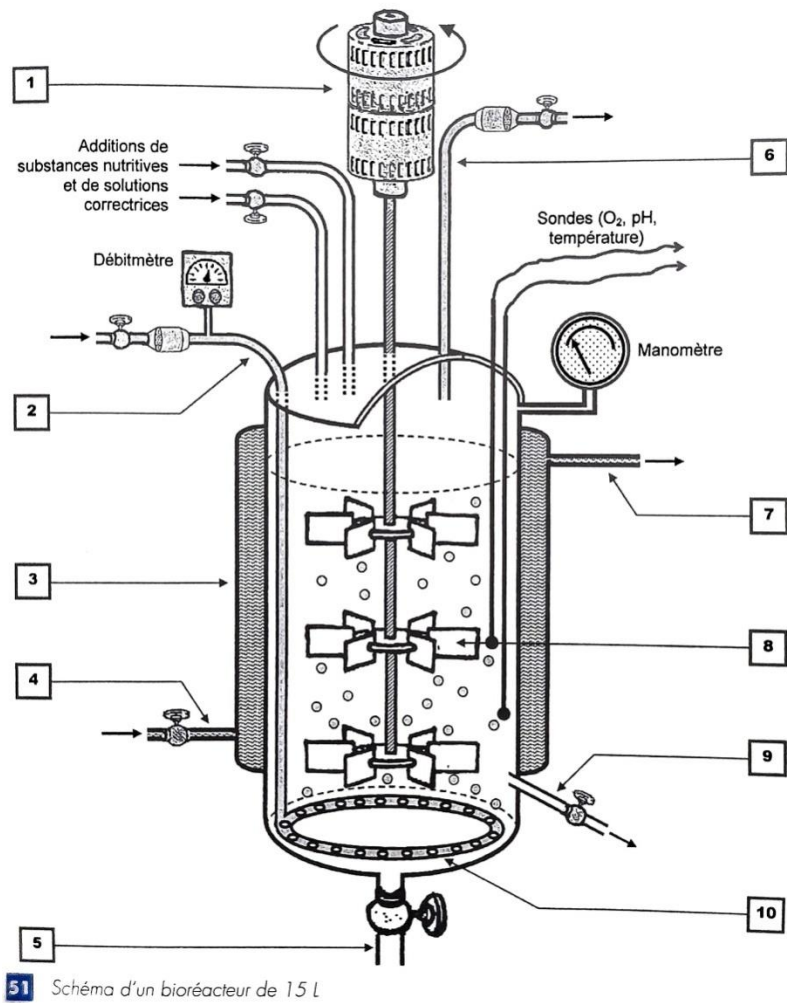


Figure 1. Schéma d'un bioréacteur.

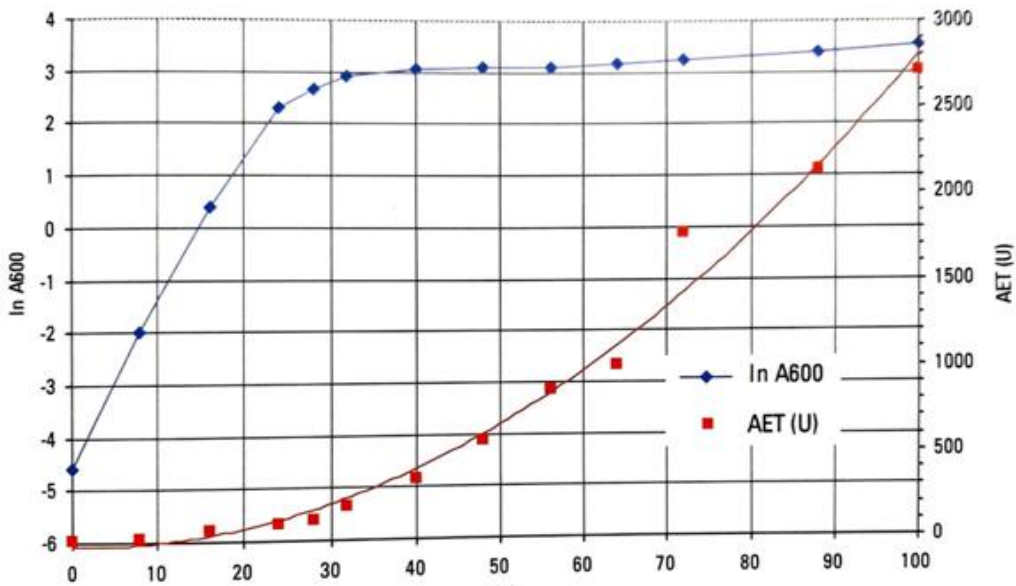


Figure 2. Courbe de croissance *D'Anstobacter radioresistens* en bioréacteur 15 L. Evolution de l'activité émulsifiante totale AET au cours de la culture.

Exercice 6 : Production de microcines

Les microcines sont des peptides produits par *Escherichia coli* et qui ont une activité anti-salmonelle. La microcine E492 est produite dans des conditions optimales par culture de la souche E492 d'E. coli en milieu approprié (bouillon M 63).

Des prélèvements de cette culture sont effectués toutes les heures. Sur chaque prélèvement :

- On mesure l'absorbance à 600 nm afin de suivre la croissance de la souche;
- On détermine la concentration de microcine produite en mesurant son activité.

Les résultats obtenus pour le suivi de la production de microcine sont donnés dans la **figure 1**.

1) Pendant quelle phase de croissance la microcine est-elle produite? Justifier.

2) Déterminer à partir de la **figure 1**.

- La vitesse maximale de production de microcine:
- Les productivités volumiques horaires maximale (Pv_{hm}) et globale (Pv_{hg}).

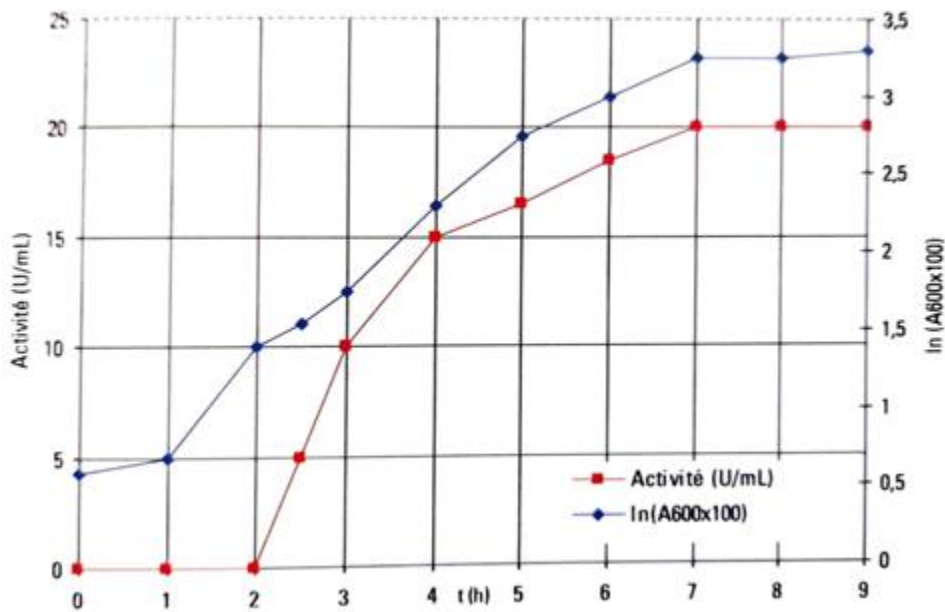


Figure1. Production de microcines E492 d'*E. coli*

Exercice 7.

On a inoculé un fermenteur contenant un milieu à base de lactosérum avec un volume important d'une culture de *Lactobacillus casei* dans le but de produire de l'acide lactique. La fermentation a ensuite été réalisée pendant 24 heures dans des conditions contrôlées (température = 37 °C, pH = 6,5; conditions anaérobies). Le tableau suivant présente les données qui ont été recueillies au cours du suivi de la fermentation.

Temps de fermentation (h)	Biomasse X (g/L)	Concentration en lactose S (g/L)	Concentration en acide lactique P (g/L)
0	0,59	30,0	0,00
1	0,66	29,1	0,54
2	0,79	28,3	1,12
3	0,99	27,3	2,22
4	1,22	26,0	3,59
8	2,98	19,1	8,87
12	5,25	12,6	14,4
16	8,65	9,8	16,9
20	9,55	9,7	17,1
24	9,55	9,6	17,1

- Construire une courbe de croissance (lnX en fonction de t), déterminer la phase log et calculer le taux de croissance spécifique maximal ainsi que le temps de génération.
- Calculer le rendement en biomasse et le rendement en acide lactique.
- Calculer la productivité globale en acide lactique de cette fermentation.

Chapitre IV: Application des biotechnologies dans le domaine médical

Objectifs : Les objectifs fondamentaux de ce chapitre sont :

- Définir le domaine d'application des biotechnologies dans le secteur médical ;
- Développer les étapes de production d'hormone.

Introduction :

Aujourd'hui, les biotechnologies sont utilisées dans de larges domaines, notamment celui de la santé où elles ont révolutionné l'approche de la recherche et la production de nouveaux médicaments. Ces biomédicaments (ou médicaments issus des biotechnologies) représentent l'application concrète des biotechnologies, qui ont permis à l'homme la production de molécules d'intérêt en thérapeutique ayant des dimensions trop importantes pour une synthèse chimique.

La biotechnologie a permis de découvrir et de développer une nouvelle génération de médicaments à usage humain. Grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la biologie cellulaire et de la biologie moléculaire, les scientifiques ont identifié et développé tout un éventail de nouvelles thérapies. Ces molécules qui ont des effets cliniques significatifs ont rendu possible la mise à disposition de nouvelles avancées thérapeutiques pour des pathologies encore sans traitement connus

Les biotechnologies appliquées au secteur pharmaceutique recouvrent l'ensemble des techniques utilisant les ressources du vivant pour concevoir et produire des substances actives.

La maîtrise des biotechnologies a aussi permis dans ce domaine les recherches ciblées de traitements en fonction des pathologies grâce au génie génétique et à l'étude de l'ADN et des gènes d'intérêt. Les biotechnologies appliquées à la santé concernent la santé humaine et animale, que ce soit pour la prévention, la thérapie ou le diagnostic.

Les biotechnologies appliquées à la santé concernent la santé humaine et animale, que ce soit pour la prévention, la thérapie ou le diagnostic. Les biotechnologies permettent au secteur de la santé de faire encore plus de progrès : organes artificiels, thérapies innovantes (géniques ou cellulaires), développement de biomédicaments, de vaccins...

Les applications biotechnologiques visent à solutionner des problèmes :

1. Thérapeutique (production de produits biopharmaceutiques du type vaccins, anticorps, hormones..., et les biothérapies du type thérapies géniques, cellules souches...) ;
2. Diagnostic (utilisation de tests et notamment les tests génétiques) ;
3. Pharmacogénétique (interactions entre gènes et médicaments pour personnaliser la médecine).

IV.1. Applications existantes ou en développement :

- Biomédicaments et vaccins

Les médicaments issus des biotechnologies comprennent :

- Des médicaments dont la production est issue d’organismes vivants ou de leurs composants cellulaires (par exemple, l’insuline humaine, l’hormone de croissance, les facteurs antihémophiliques ou les anticorps) ;
- Des médicaments relevant de la chimie de synthèse, mais dont la conception a fait appel aux biotechnologies, à travers par exemple l’identification d’une cible cellulaire nouvelle.

Pour rappel, la vaccination est apparue en 1798 grâce à Edward Jenner¹⁸ qui mit au point la vaccine un des seuls moyens de contrer le fléau de la variole. De ce procédé dérive la vaccination qui consiste en l’inoculation d’un agent présentant une action pathogène envers l’organisme et dont l’objectif est de prévenir l’apparition d’une maladie. Plusieurs types de vaccins sont actuellement utilisés : vivants atténués, inactivés et les fractions antigéniques.

• **Thérapie cellulaire**

Ce mode de thérapie permet de soigner un patient en lui injectant des cellules sur l'organe touché (cellules souches la plupart du temps). La thérapie cellulaire est utilisée par exemple pour la maladie d’Alzheimer, diabète, leucémie…

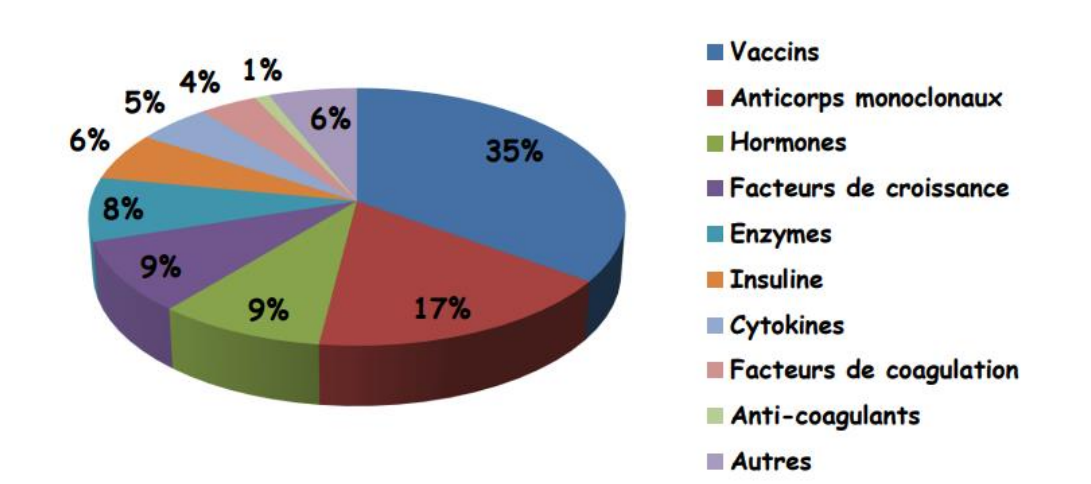


Figure 40: Marché des biomédicaments

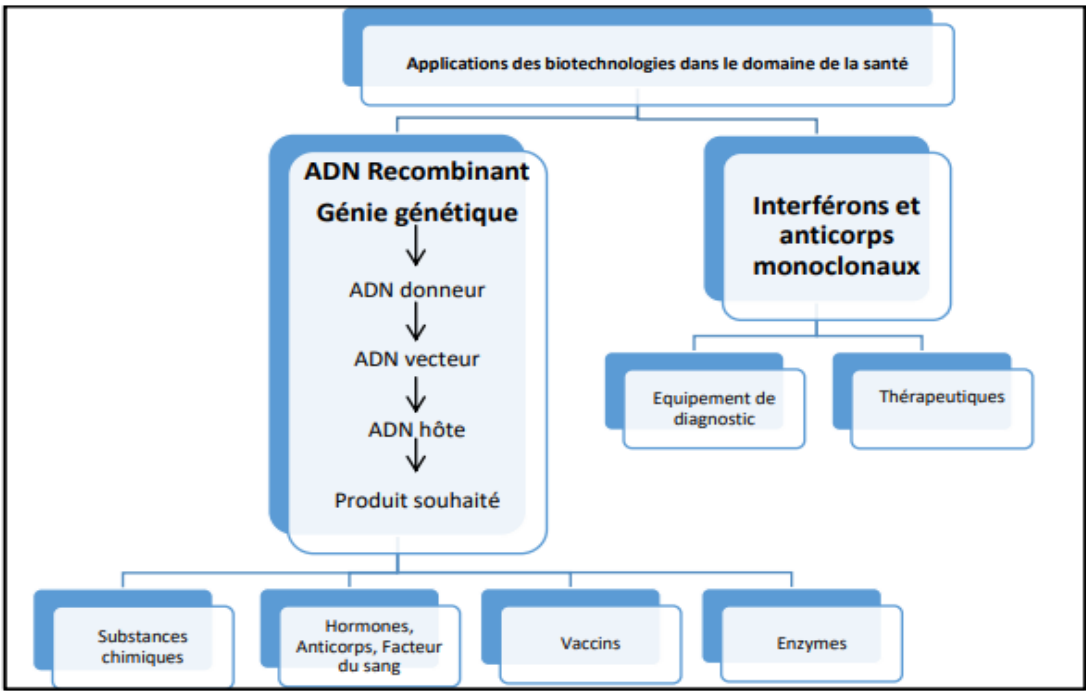


Figure 41 : Application des biotechnologies dans le domaine de santé.

Classification des biomédicaments

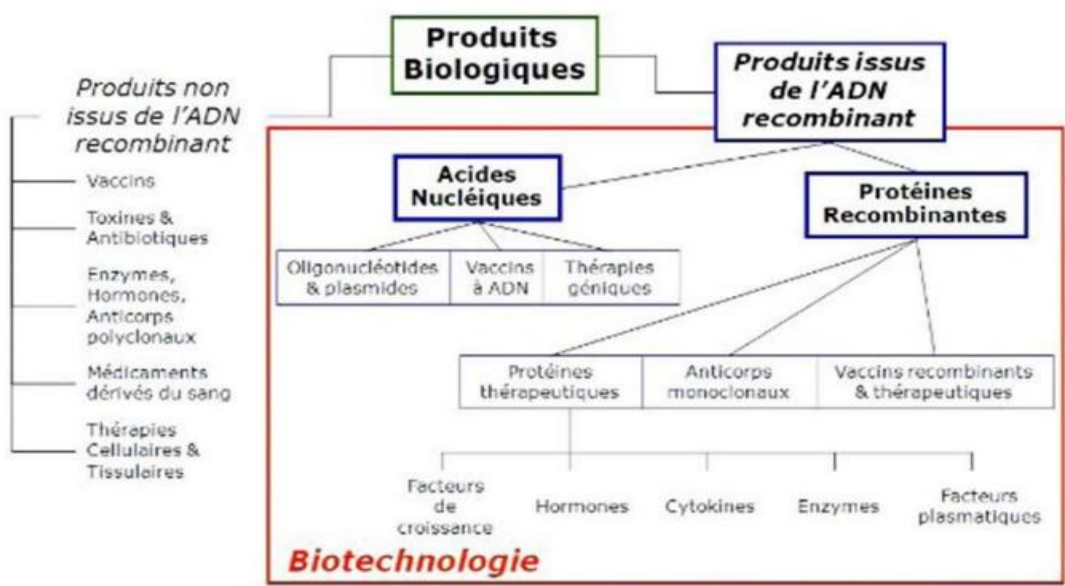


Figure 42 : Classification des biomédicaments.

IV.2. Production d’hormones

Une hormone est une substance biologique synthétisée par des cellules spéciales (les cellules endocrines) et directement sécrétée dans le sang ou la lymphe.

Une hormone est un messenger chimique véhiculé par le système circulatoire qui agit à distance de son site de production par fixation sur des récepteurs spécifiques.

Une hormone est une molécule chimique biologiquement active, sécrétée par une glande endocrine, régulant à distance et par voie sanguine des cellules cibles. L’hormone est relâchée dans la circulation sanguine afin d’atteindre la cellule cible. Certaines hormones peuvent parfois agir sur des cellules proches sans passage par la circulation générale. D’autre hormones peuvent agir directement sur la cellule qui les a sécrétées (activité est dite autocrine) et en dernier on a les hormones qui peuvent avoir une action intracrine en agissant au sein même de la cellule endocrine, sans avoir été relarguées dans le compartiment extracellulaire.

Système endocrinien (SE) = organes + de cellules productrices d’hormones.

Rôle des glandes endocrines= production et relargage d’hormones dans la circulation sanguine ou le système lymphatique.

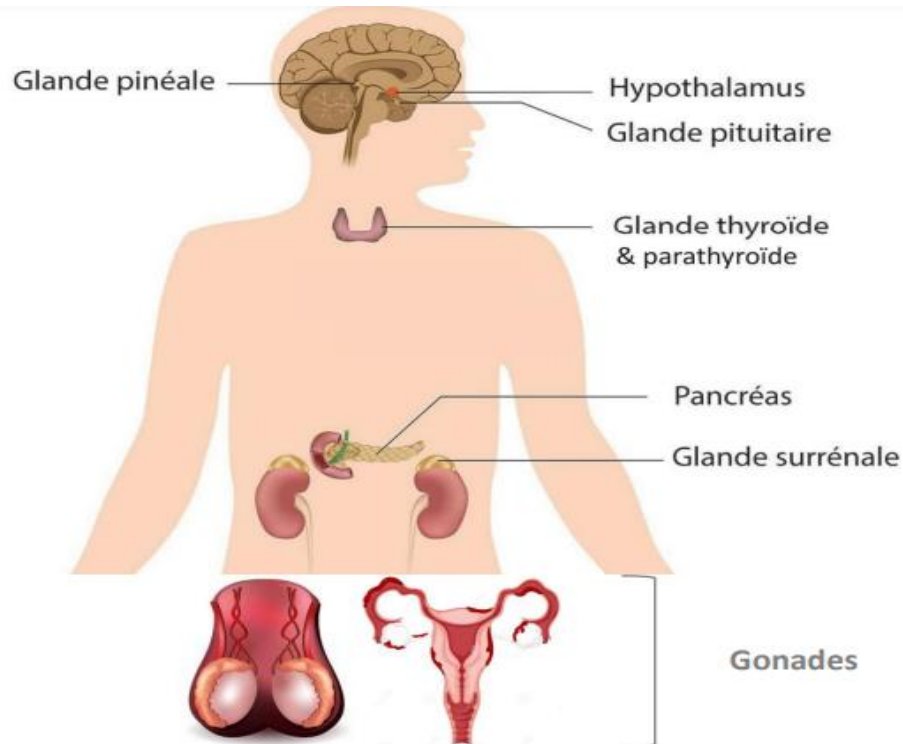


Figure 43 : Hormones/Cibles (cellules, tissus ou organes).

Il existe 3 grands types d'hormones (trois groupes classés selon leur nature biochimique, dont dépendra aussi leur mode d'action).

- **Hormones peptidiques**

Elles subissent une maturation enzymatique dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, passant du stade de préprohormones à prohormones pour terminer en hormones actives. Exemple : l'insuline et l'hormone de croissance.

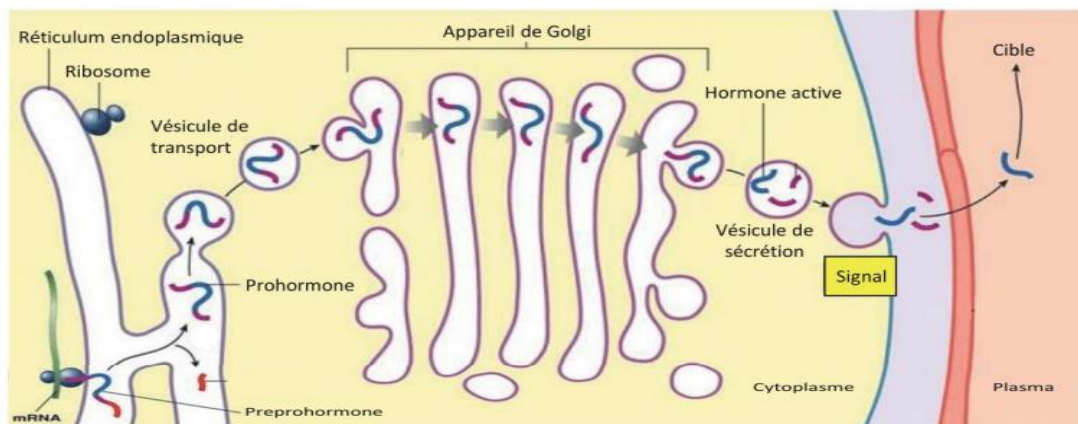


Figure 44: Hormones peptidiques

- **Hormones stéroïdiennes**

Le précurseur de ces hormones est le cholestérol. Ce dernier subit un processus de conversion enzymatique avant de devenir une hormone. Ce processus est appelé stéroïdogénèse. Exemple : les œstrogènes, la testostérone et le cortisol.

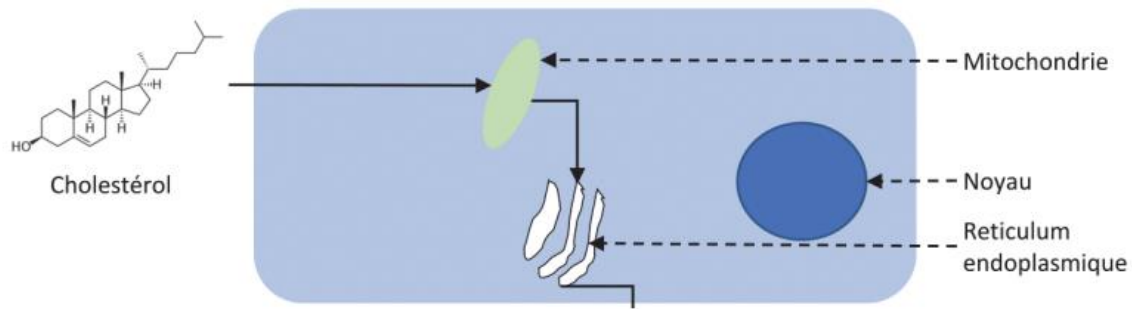


Figure 45: Hormones stéroïdiennes

- **Hormones monoamines**

Les hormones monoamines. Ces hormones dérivent le plus souvent de la tyrosine ou du tryptophane. Exemples: les catécholamines et la thyroxine.

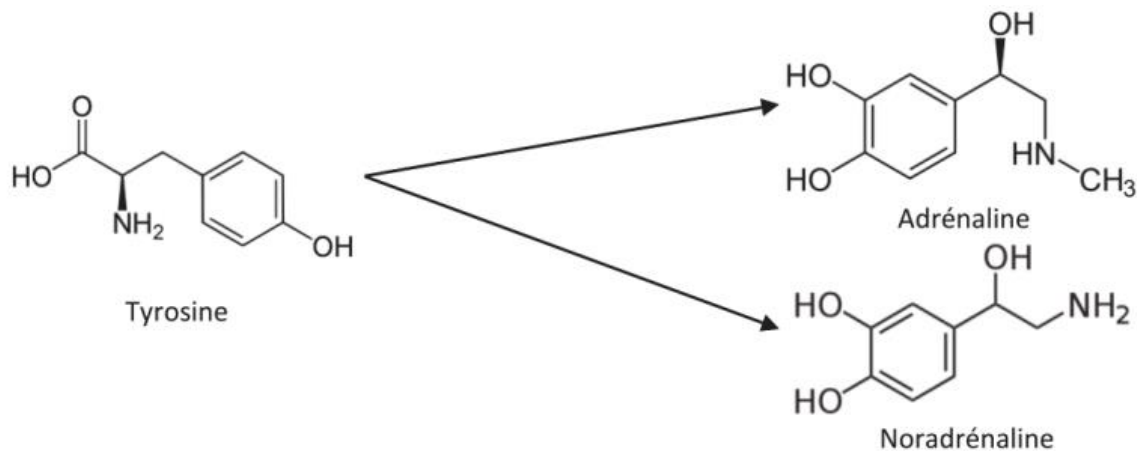


Figure 46: Hormone monoamines

A côté des méthodes classiques de fermentation, le génie génétique a permis depuis environ vingt ans, la production de substances actives, en particulier des protéines endogènes recombinantes, et a favorisé le développement de médicaments plus sûrs telle que l'hormone de croissance humaine recombinante. Des organismes génétiquement modifiés, plantes ou animaux transgéniques, microorganismes recombinants sont utilisés soit pour la production de molécules actives, soit comme vecteur permettant de délivrer ces molécules à leur site d'action.

Des hormones naturellement présentes telles que la progestérone, la testostérone, l'oestrone et celles du cortex peuvent actuellement être synthétisées par des microorganismes et à faible coût.

L'hormone de croissance humaine : ou HGH (Human Growth Hormone) utilisée pour traiter les déficiences hypophysaires entraînant le nanisme (hypopituitarisme), était précédemment obtenu on prélevant les glandes pituitaires d'humains décédés. Obtenir suffisamment d'hormone était à la fois difficile et coûteux, l'utilisation de cette hormone était très limitée. L'hormone de croissance extraite des animaux n'est pas efficace sur l'homme. Le gène pour la synthèse de l'hormone de croissance a été introduit chez *E. coli*, et cette bactérie génétiquement modifiée, constitue à présent, la source commerciale de l'hormone. Près de 30 000 enfants prenaient cette hormone aux États-Unis.

L'insuline humaine : Avant de produire l'insuline par des microorganismes, on utilisait celle, extraite des porcs ou des boeufs. Du point de vue structural, ce n'est pas précisément la même que l'insuline humaine, et elle n'est de ce faite pas aussi efficace. En plus, Le nombre de cas de diabètes augmentant continuellement, il a fallu trouver une autre méthode afin de produire de l'insuline en grande quantité et à faible coût. Avec le développement du génie génétique, on s'est donc tourné vers les microorganismes. Depuis 1984, la production à grande échelle de l'insuline est réalisée commercialement avec la bactérie *E. coli* génétiquement modifiée. En 1987

on a également commencé à produire de l'insuline avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Le chloroplaste modifié par génie génétique du tabac et de la carotte exprime de nombreuses protéines à activité thérapeutique tels que l'hormone somatotrope humaine, la sérualbumine humaine, des interférons et les facteurs de croissance IGF (insulin-like growth factor).

- **Qu'est-ce que l'insuline ?**

L'insuline est une hormone protéique hypoglycémisante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas.

Rôle : absorption du glucose/cellules adipeuses, du foie et des muscles squelettiques.

Conversion du glucose en glycogène ou en triglycérides.

La libération de glucose par le foie dans le sang est limitée par un taux sanguin élevé en insuline.

(Insuline/Glucagon) : un rôle majeur dans la régulation des substrats énergétiques (le glucose, les acides gras et les corps cétoniques).

Hyperglycémie : le pancréas libère l'insuline qui favorise l'entrée du glucose sanguin dans les organes de stockage. Hypoglycémie : le pancréas sécrète du glucagon. La fixation de l'insuline aboutit à la consommation du glucose par les cellules cibles. Au niveau des organes de stockage du glucose (le foie et les muscles), cette hormone stimule la synthèse de glycogène. Elle stimule aussi la synthèse de lipides dans les tissus adipeux.

Il faut attendre en 1921 pour assister à la découverte de l'insuline par Banting et Best, deux professeurs de l'Université de Toronto. Ils avaient isolé l'insuline à partir d'extraits pancréatiques et avaient démontré que le pancréas sécrétait dans le sang une substance qui permettait l'assimilation du sucre.

Cette découverte a rendu possible le traitement de cette maladie et a permis à de nombreux malades de mener une vie normale. L'insuline a permis d'éliminer presque complètement la mortalité directe et l'infertilité due à cette maladie.

L'insuline employée dans le traitement de ces malades provenaient de pancréas de bœufs ou de porcs. Cette insuline animale diffère de l'insuline humaine et cause des problèmes d'allergie.

Les insulines humaines obtenues par génie génétique sont, contrairement aux anciennes insulines prélevées chez les bovins et le porc, d'une stabilité telle que depuis 2010 beaucoup de patients insulinotraités ne sont pas des patients insulinodépendants : l'usage de l'insuline évite une fatigue à long terme des reins observée avec les médicaments chimiques genre metformine.

• Structure chimique de l'insuline

La structure a été déterminée par Frederick Sanger : ce fut en 1958 l'objet du premier de ses deux prix Nobel de Chimie. L'insuline est une hormone peptidique de formule brute C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆, de poids moléculaire 5 800, cristallisée (F = 81°C). Elle est constituée de 2 chaînes, comportant l'une (chaîne A) 21 et l'autre (chaîne B) 30 acides aminés, réunies par deux ponts disulfure, avec un troisième pont interne sur la chaîne courte.

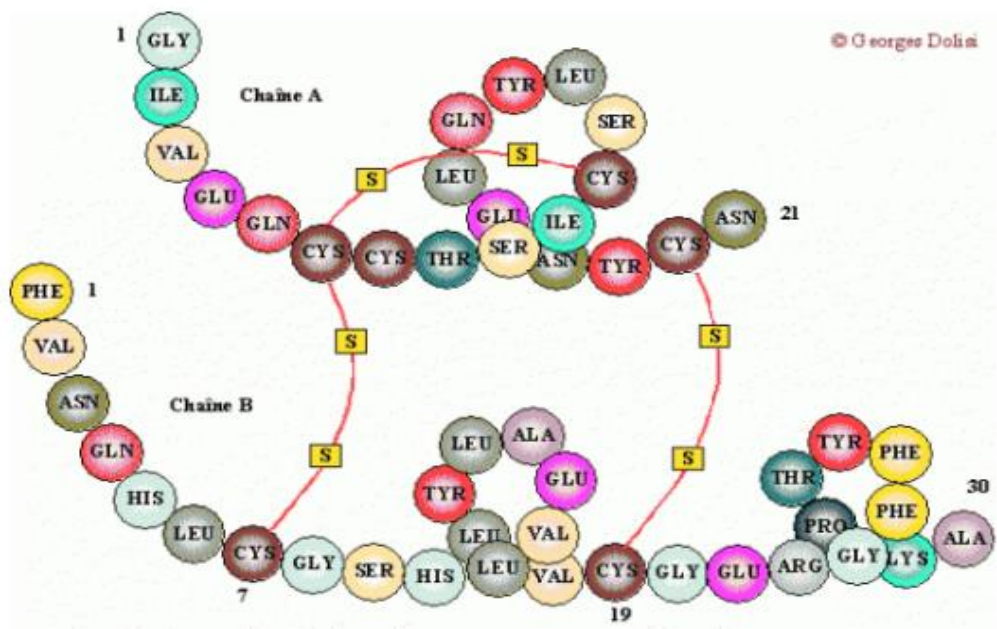


Figure 47. Structure chimique de l'insuline

L'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sous la forme d'une préproinsuline constituée d'une seule chaîne peptidique, dont deux fragments :

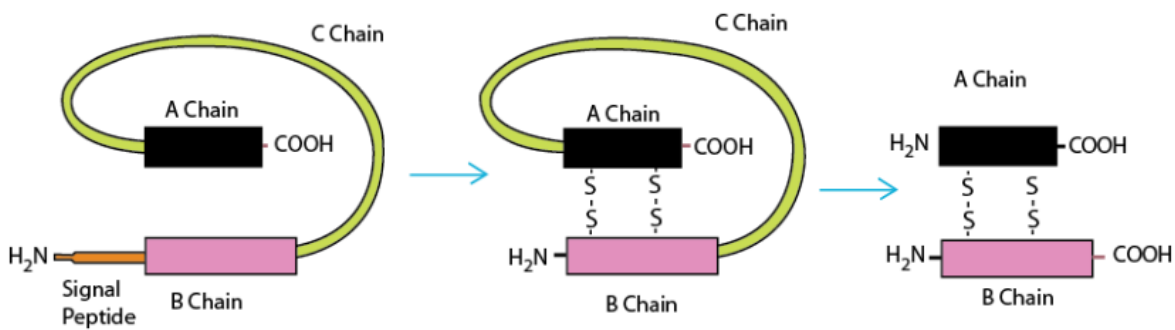


Figure 48 : Maturation de l'insuline : de la proinsuline à l'insuline active

Le peptide signal (24AA) est éliminé par l'action d'une enzyme, la signal peptidase qui va cliver le peptide signal entraînant la création des trois ponts disulfures (proinsuline) ; • La proinsuline obtenue subira l'élimination du peptide C par une autre enzyme, la PC1, ce qui va libérer un fragment central, tandis que les deux chaînes néoformées vont rester associées grâce aux ponts disulfures;

L'extrémité C-Terminale d'une des chaines va être clivée par l'action d'une carboxypeptidase E (CPE) pour devenir l'insuline sous sa forme mature, et donc active.

Insuline humaine recombinante : forme d'insuline (nom commercial Humulin) fabriquée à partir d'ADN recombinant qui est l'insuline humaine.

• Insuline produite par la technologie de l'ADN recombinant

Tout d'abord, le vecteur approprié (plasmide) est isolé de *E. coli* puis il est coupé par une enzyme de l'endonucléase de restriction.

Le gène d'intérêt (c'est-à-dire le gène codant pour l'insuline) est isolé de la cellule β et inséré dans un plasmide ouvert.

Le plasmide et le gène d'intérêt sont recombines ensemble par l'enzyme ADN ligase.

Ce plasmide recombiné va être insérer dans une cellule hôte appropriée (c'est-à-dire *E. coli*). Le plasmide recombinant est inséré dans *E. coli* par le processus de transformation (électrique et/ou chimique par choc thermique). Les bactéries recombinantes sont triées en les cultivant en présence d'un antibiotique. Les bactéries qui survivent sont celles qui ont absorbé le plasmide. Elles sont dites transformés.

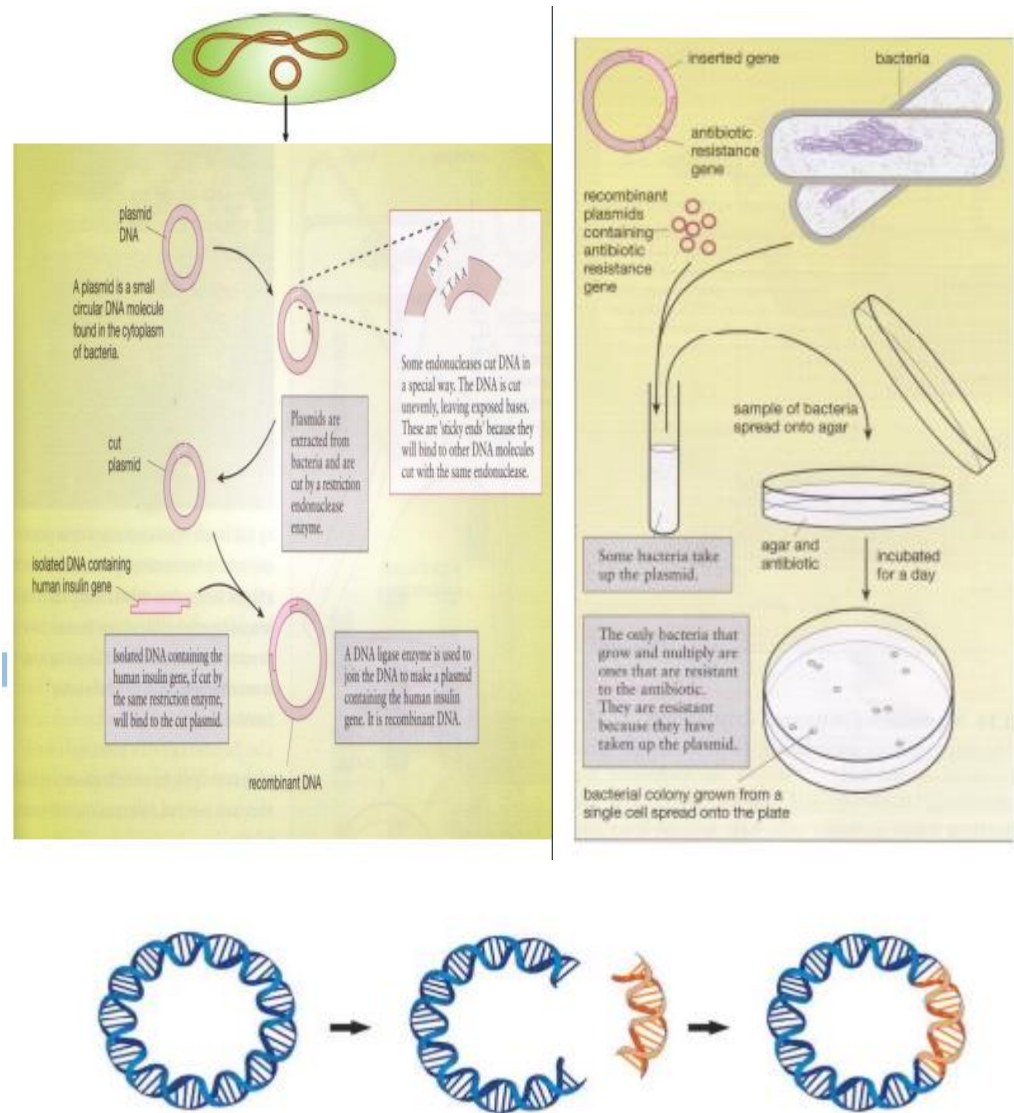


Figure 49. Production d'insuline par génie génétique.

Des chercheurs en (1977) ont synthétisés chimiquement la séquence d'ADN des deux chaînes d'insuline et ces dernières ont été insérées séparément dans deux vecteurs plasmidiques PBR322. Ces gènes sont insérés à côté du gène de la β -galactosidase du plasmide. Les plasmides recombinants sont ensuite transformés séparément dans l'hôte *E. coli*. Les hôtes recombinants produisent des chaînes de pro-insuline : les protéines formées consistent en partie en β -galactosidase, jointif à la chaîne A ou B de l'insuline.

Les chaînes A et B sont alors extraites à partir du fragment β -galactosidase et purifiées. Ces chaînes pro-insuline A et B ont été séparées de la β -galactosidase par traitement au bromure de cyanogène. Le détachement des chaînes pro-insuline de la β -galactosidase est possible car une méthionine sous forme de codon supplémentaire a été ajoutée à l'extrémité N-terminale de chaque gène pour les chaînes A et B. Après le détachement, les chaînes A et B sont jointes in vitro pour reconstituer l'insuline native en sulfonant les chaînes peptidiques avec du disulfonate de sodium ($C_8H_7SO_3Na$) et du sulfite de sodium (Na_2SO_3).

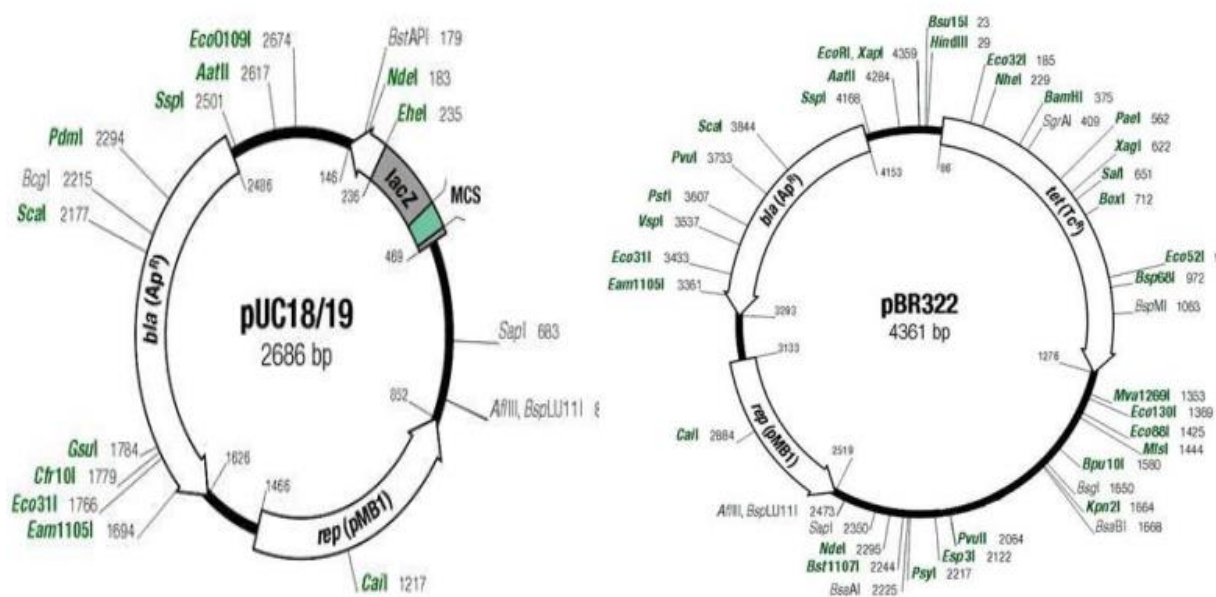


Figure 50. Vecteurs plasmidiques.

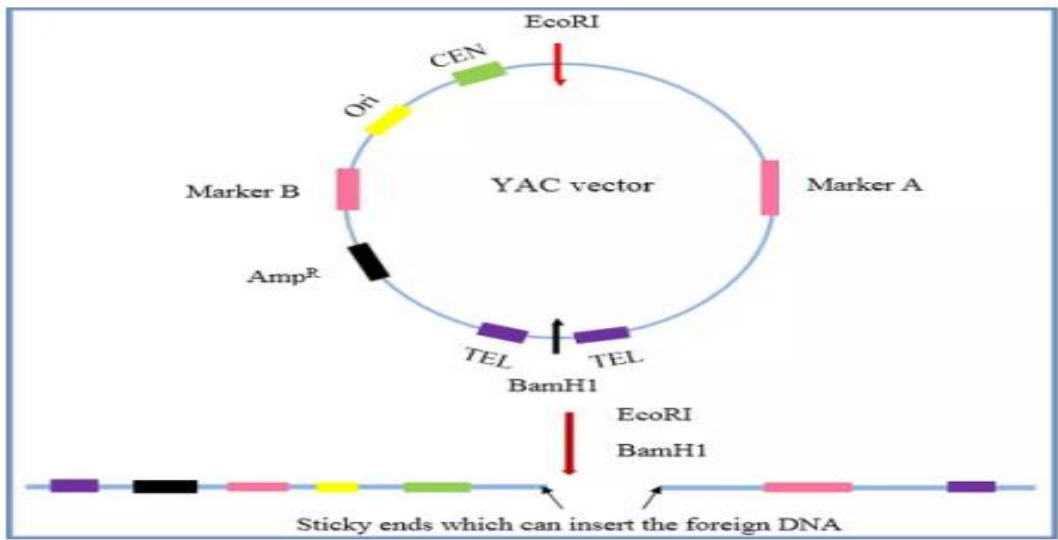


Figure 51. Vecteur d'expression YAC.

Le milieu de culture utilisé dans cette méthode est composé de :

Biotine ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$);
Chlorure de calcium déshydraté ($CaCl_2$);
Dihydrogénosulfate de potassium (KH_2SO_4);
Glycérol ($C_3H_8O_3$);
Sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$);
Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$);
Trace d'extrait de levure;
Oligo-éléments (acide borique (H_3BO_3), acide sulfurique (H_2SO_4), sulfate de manganèse ($MnSO_4$), chlorure ferrique hexahydraté ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), sulfate de zinc ($ZnSO_4$), etc.).

Conditions de culture en Bioreacteur

- Volume de travail total de 10L.
- Phase de croissance de 31 heures.
- $T = 37^\circ C$.
- $pH = 7$.



La biotechnologie au secours des diabétiques

Il faut attendre en 1921 pour assister à la découverte de l'insuline par Banting et Best, deux professeurs de l'Université de Toronto. Ils avaient isolé l'insuline à partir d'extraits pancréatiques et avaient démontré que le pancréas sécrétait dans le sang une substance qui permettait l'assimilation du sucre.

Cette découverte a rendu possible le traitement de cette maladie et a permis à de nombreux malades de mener une vie normale. L'insuline a permis d'éliminer presque complètement la mortalité directe et l'infertilité due à cette maladie.

L'insuline employée dans le traitement de ces malades provenaient de pancréas de porcs ou de bœufs. Cette insuline animale diffère de l'insuline humaine et cause des problèmes d'allergie.

Les insulines humaines obtenues par génie génétique sont, contrairement aux anciennes insulines prélevées chez les bovins et le porc, d'une stabilité telle que depuis 2010 beaucoup de patients insulinotraités ne sont pas des patients insulinodépendants : l'usage de l'insuline évite une fatigue à long terme des reins observée avec les médicaments chimiques genre metformine.

IV.3. Production de vaccins

Les antigènes génétiquement modifiés sont maintenant une réalité grâce aux avancées des biotechnologies. Ces antigènes présentent plusieurs avantages par rapport aux antigènes extraits de bactéries pathogènes ou de virus. Les antigènes générés par des bactéries sont moins coûteux, plus facilement purifiés et exempts de contaminants par d'autres protéines.

L'hépatite B est une maladie du foie causée par le virus HBV (Hepatitis B Virus). Afin de prévenir l'infection causée par ce virus, on a mis au point un vaccin qui, en administrant au corps de petits fragments du HBV, lui permet de beaucoup mieux se défendre lorsque le virus complet se présente. Le premier vaccin contre l'hépatite B

provenait du sang de personnes infectées par le virus HBV. On isolait, dans le sang de personnes malades, un fragment de virus susceptible d'être reconnu par notre système immunitaire. Administré à des personnes saines, ce fragment donnait alors l'occasion au corps d'identifier le virus pour ensuite l'éliminer. Cette méthode de vaccination comportait des risques. Malgré les étapes de purification, il pouvait parfois arriver qu'un virus complet se retrouve dans le vaccin. Sans le vouloir, c'est alors la maladie elle-même qu'on donnait à une personne saine. Par ailleurs, le recours à des personnes malades pour fabriquer un vaccin n'est plus pratiqué. On s'est donc tourné vers les microorganismes afin de produire des fragments du virus.

Le sang d'individus chroniquement contaminés par ce virus présente une particule protéique appelée Hbs. Cette particule n'est pas toxique en elle-même mais elle constitue un inducteur efficace pour la production d'anticorps anti-hépatite B. Cette protéine a été clonée chez *Saccharomyces cerevisiae* et constitue maintenant la source d'antigène pour l'immunisation humaine.

Série de TD 03 : Production d'insuline par génie génétique

Le diabète de type 1 est dû à la destruction de cellules du pancréas endocrine qui produisent une hormone polypeptidique hypoglycémiante : l'insuline. Les personnes atteintes de diabète, et présentant un défaut de production d'insuline, doivent recourir à des injections de cette hormone pour réguler leur glycémie.

Historiquement, l'insuline utilisée en thérapeutique a d'abord été extraite de pancréas de porc et de bœuf. La demande de plus en plus importante d'insuline au niveau mondial et le risque sanitaire associé à l'utilisation de produits animaux ont conduit à mettre en place des techniques de production d'insuline par génie génétique.

L'insuline humaine est maintenant produite à partir de souches bactériennes d'*Escherichia coli* transformées par un plasmide recombinant contenant le gène codant le précurseur de l'insuline (proinsuline).

On se propose d'étudier les différentes étapes de la production de l'insuline humaine par génie génétique afin de valider les choix réalisés au cours de la mise en place du procédé :

- Obtention d'une souche d'*Escherichia coli* recombinante ;
- Optimisation de la culture de la souche sélectionnée ;
- Purification de l'insuline humaine produite ;
- Dosage de l'insuline humaine purifiée.

1. OBTENTION D'UNE BACTERIE RECOMBINANTE

1.1. Construction du plasmide recombinant

Afin d'obtenir un plasmide recombinant, le gène codant le précurseur de l'insuline (proinsuline) est inséré dans le plasmide pBR322 au niveau du site de restriction de l'enzyme BamH1.

Le document 1 présente la carte de restriction simplifiée du plasmide natif pBR322. La construction du plasmide et la sélection des clones recombinants sont présentées dans le document 2.

Q1. A l'aide du document 1, indiquer les éléments justifiant l'utilisation du plasmide pBR322 en génie génétique.

Q2. Réaliser un schéma annoté du plasmide recombinant.

Q3. A l'aide des documents 1 et 2, argumenter l'intérêt de l'utilisation de l'enzyme BamH I plutôt que l'utilisation des enzymes EcoR I et Hind III, pour la construction du plasmide recombinant.

1.2. Transformation bactérienne et sélection de clones de bactéries recombinantes

Le document 2 présente les différents résultats possibles obtenus après transformation de la souche d'*Escherichia coli*. Quatre types de clones bactériens A, B, C et D peuvent être obtenus.

Q4. Argumenter le caractère sensible ou résistant de chaque type de clones A, B, C et D vis-à-vis de l'ampicilline et de la tétracycline.

Le document 3 présente les résultats de la sélection des clones de bactéries recombinantes après culture sur des milieux gélosés additionnés d'antibiotiques.

Q5. À partir des documents 2 et 3, identifier par leur numéro les colonies correspondant au clone de type A.

Q6. En déduire le numéro des colonies de bactéries transformées par le plasmide recombinant.

2. OPTIMISATION DE LA CULTURE DE LA SOUCHE SÉLECTIONNÉE

Dans le but d'optimiser la culture d'un clone recombinant, un suivi de croissance dans deux milieux M1 et M2 est réalisé à 37° C en aérobiose.

Le document 4 présente les courbes de croissance de ce clone dans ces deux milieux dont la composition est donnée.

Q7. Déterminer la durée de la phase de latence dans ces deux milieux.

La vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle $\mu_{\text{expo}} (= QX_{\text{expo}})$ peut être déterminée par l'équation aux grandeurs suivante :

$$\mu_{\text{expo}} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

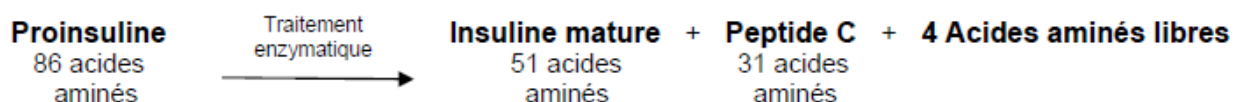
Q8. Déterminer la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle exprimée en min⁻¹, dans les milieux M1 et M2.

Q9. À l'aide de la composition des milieux M1 et M2, expliquer les différences de résultats concernant la durée de la phase de latence et la vitesse spécifique de croissance.

Q10. En déduire le milieu permettant une croissance optimale du clone d'E. coli. Argumenter la réponse.

3. PURIFICATION DE L'INSULINE PRODUITE PAR LA BACTERIE RECOMBINANTE

L'insuline humaine est synthétisée sous forme de proinsuline par le clone sélectionné. Une étape de lyse bactérienne libère la proinsuline, laquelle subit un traitement enzymatique qui conduit à la production d'insuline mature.



Le mélange obtenu est ensuite déposé sur une colonne de chromatographie en vue de la purification de l'insuline mature.

Le document 5 présente le schéma de principe de cette chromatographie et les caractéristiques des différents types de gels Sephadex® G utilisés pour la séparation des molécules.

Q11. Exploiter le document 5 pour dégager le principe de séparation des molécules par cette méthode chromatographique.

Q12. Sachant qu'un acide aminé a une masse moléculaire d'environ 100 daltons (Da), calculer la masse moléculaire approximative de l'insuline mature et du peptide C.

Q13. Choisir le gel «Sephadex ®» le plus adapté à la purification de l’insuline mature. Argumenter la réponse.

4. DOSAGE DE L’INSULINE HUMAINE PURIFIEE

L’insuline humaine ainsi purifiée est dosée par une technique immuno-enzymatique dont le principe est présenté dans le document 6.

Q14. À l’aide des symboles fournis dans la légende, schématiser l’édifice moléculaire obtenu en fin de la réaction immuno-enzymatique dans une cupule contenant l’insuline.

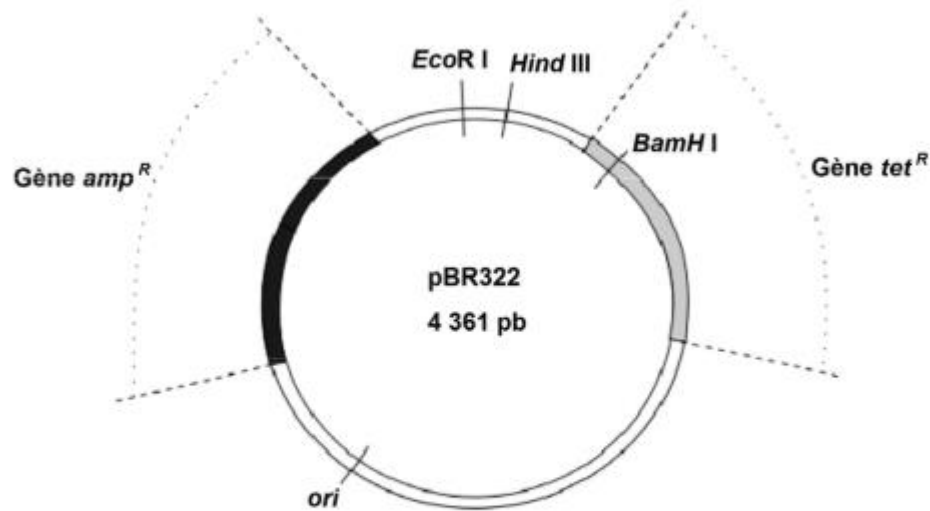
Q15. Expliquer pourquoi l’absorbance mesurée à 450 nm est proportionnelle à la concentration en insuline présente dans l’échantillon.

SYNTHESE

Q16. Réaliser un organigramme des quatre étapes principales de production de l’insuline humaine en y intégrant les choix retenus pour l’optimisation du procédé.

DOCUMENT 1 – Carte de restriction simplifiée du plasmide pBR322

Pour être utilisable en génie génétique, un plasmide doit contenir une origine de réplication lui permettant une réplication autonome dans la cellule, au moins un gène de sélection destiné à discriminer les clones recombinants et des sites de restriction permettant son remodelage.

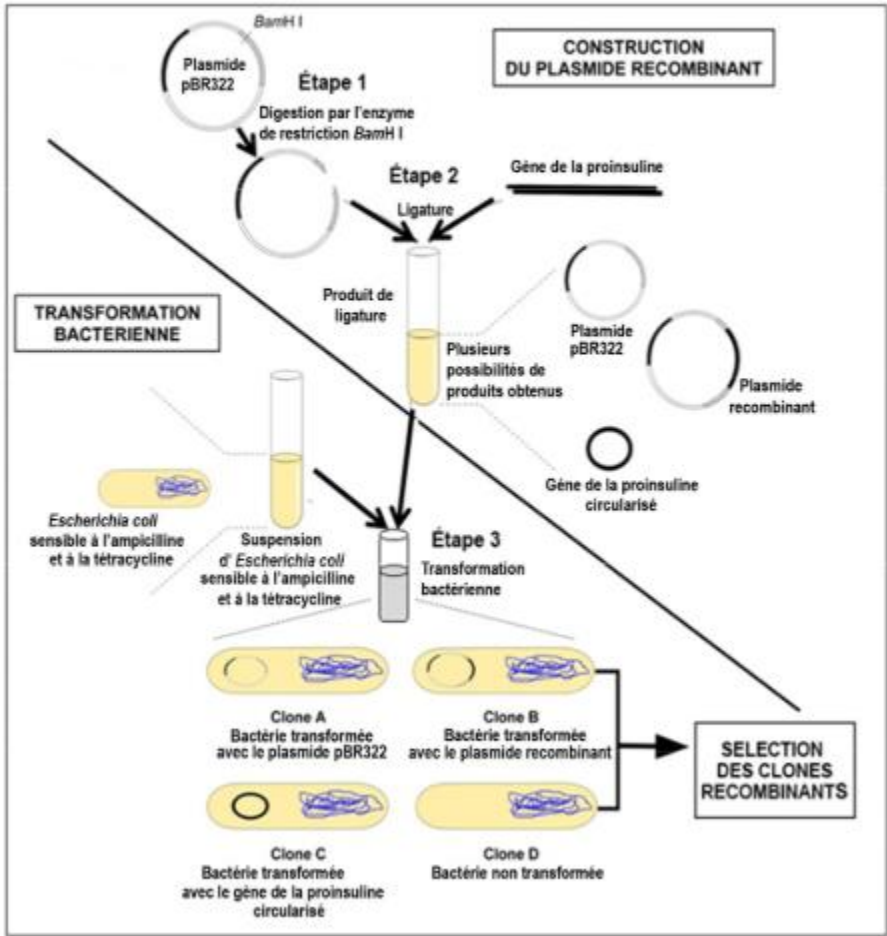


- **Gène amp^R** : gène de résistance à l'ampicilline
- **Gène tet^R** : gène de résistance à la tétracycline
- **ori** : origine de réplication
- **BamH I, EcoR I, Hind III** : sites de restriction spécifiques de chaque enzyme de restriction

Remarque : Un gène n'est traduit en protéine que lorsqu'il est sous sa forme continue, non interrompue.

DOCUMENT 2 – Obtention d’un clone recombinant

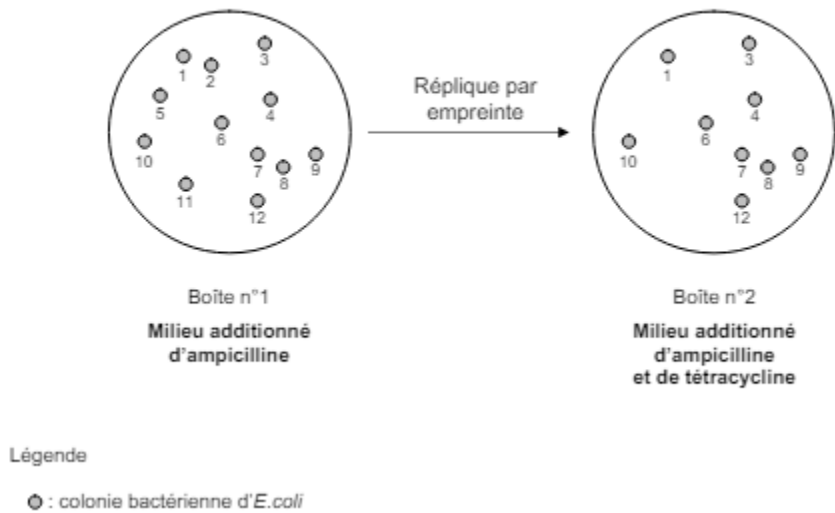
Construction du plasmide, transformation et sélection des clones recombinants



Caractéristiques des 4 types de clone transformés

	Type A	Type B	Type C	Type D
Résistance à l'ampicilline	oui	oui	non	non
Résistance à la tétracycline	oui	non	non	non

DOCUMENT 3 - Représentation schématique de la sélection des clones

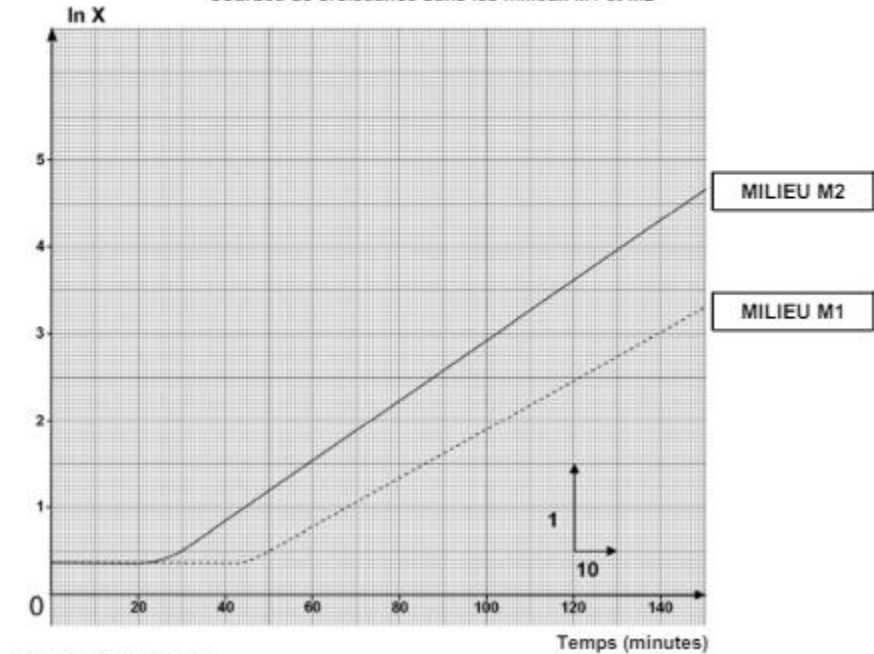


DOCUMENT 4 - Culture d'un clone recombinant dans deux milieux

Composition des milieux M1 et M2

Milieu M1 (bouillon nutritif)	Milieu M2 (bouillon cœur-cerveille)
<ul style="list-style-type: none"> - Peptones - Extrait de viande - Chlorure de sodium - Eau <p>Ajusté à pH 7,2</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Peptones - Extrait cœur-cerveille - Chlorure de sodium - Glucose - Phosphate disodique - Eau <p>Ajusté à pH 7,4</p>

Courbes de croissance dans les milieux M1 et M2

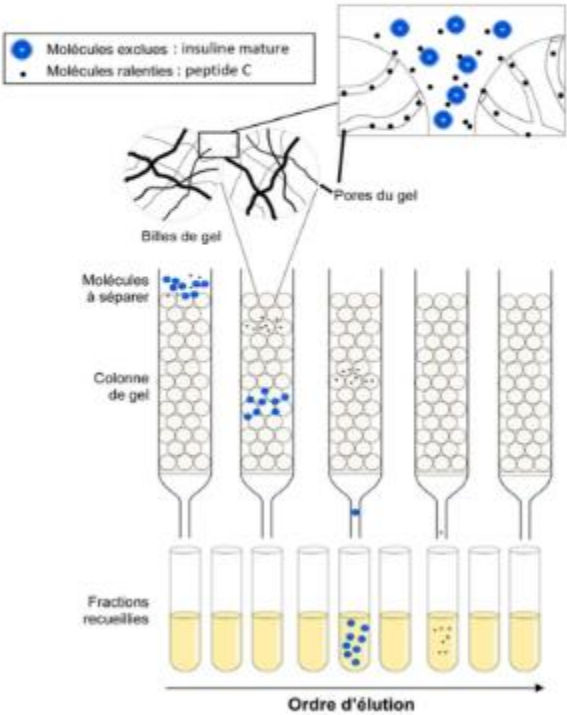


Légende : X = biomasse

DOCUMENT 5 - Chromatographie par gel-filtration

Schéma de principe

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est composée de billes de gel poreuses ; la phase mobile est une solution tampon dont le flux entraîne les molécules à séparer.



Caractéristiques de tamisage moléculaire de trois gels	
Type de gel	Intervalle de masses moléculaires des composés ralentis par le gel (Da)
Sephadex® G15	0 à 1 500
Sephadex® G25	1 000 à 5 000
Sephadex® G200	5 000 à 800 000

DOCUMENT 6 - Principe du dosage immuno-enzymatique de l'insuline

Ce dosage est basé sur la reconnaissance simultanée de l'insuline humaine par deux anticorps.







Dans une microplaque, sont ajoutés successivement :

- le premier anticorps anti-insuline ;
- le milieu contenant l'insuline à doser ;
- le second anticorps anti-insuline, qui est couplé à la peroxydase ;
- le substrat incolore TMB.

Chacune des étapes est suivie de lavages.

La peroxydase catalyse la réaction de transformation du TMB en un produit coloré qui absorbe à 450 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en insuline présente dans l'échantillon.

Les différents acteurs intervenant dans ce dosage sont schématisés dans la légende ci-dessous :

Symbole	Signification
	Cupule de microplaque
	Insuline humaine
	Anticorps anti-insuline humaine fixé au fond des cupules
	Anticorps anti-insuline humaine couplé à la peroxydase
 Substrat  Produit coloré	Réaction catalysée par la peroxydase

Chapitre V : Application des biotechnologies dans le domaine animal

Objectifs :

- L'objectif général de cette partie est d'acquérir une connaissance approfondie sur les procédés de culture de cellules animales, couvrant les applications, les cellules et milieux industriels de culture

Introduction

Au cours de ces dernières décennies, de nombreux progrès en génétique et en culture de microorganismes ont conduit à l'émergence de l'utilisation de cellules animales dans la production de protéines thérapeutiques. Premièrement, il est nécessaire de connaître les paramètres biologiques de la cellule utilisée et de maîtriser leur impact sur la croissance cellulaire et la production de la molécule d'intérêt. Ensuite, la technologie, dans laquelle la culture cellulaire est effectuée, est sélectionnée en regard des conditions opératoires. Enfin, des critères d'extrapolation sont choisis pour réaliser le passage à l'échelle de production industrielle. Les conditions d'opération d'un procédé de culture à l'échelle du laboratoire, ne peuvent être conservées à l'identique à l'échelle industrielle. Pour limiter le risque d'erreur durant l'extrapolation dimensionnelle, il convient de passer par des échelles intermédiaires. Tout procédé de culture de cellules animales possède des caractéristiques propres. Réaliser la transposition d'une petite échelle à une échelle industrielle est à chaque fois une expérience unique et différente qui requiert des compétences multidisciplinaires.

L'utilisation de procédés de cultures de cellules animales pour la production de nombreuses molécules à visée thérapeutique, telles que des protéines recombinantes (facteurs de croissance, anticorps monoclonaux, hormones, cytokines...) ou des vaccins viraux, est en large expansion depuis le milieu du siècle dernier

Dans un premier temps, il est nécessaire de connaître les paramètres biologiques de la cellule animale utilisée et de maîtriser leur impact sur la croissance cellulaire et la production de la molécule d'intérêt. En effet, la connaissance des paramètres optimaux pour la croissance et la production de la molécule d'intérêt permet de définir les conditions opératoires du procédé de culture.

L'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer le comportement des cellules est illustré sur la figure suivante (**Figure 41**):

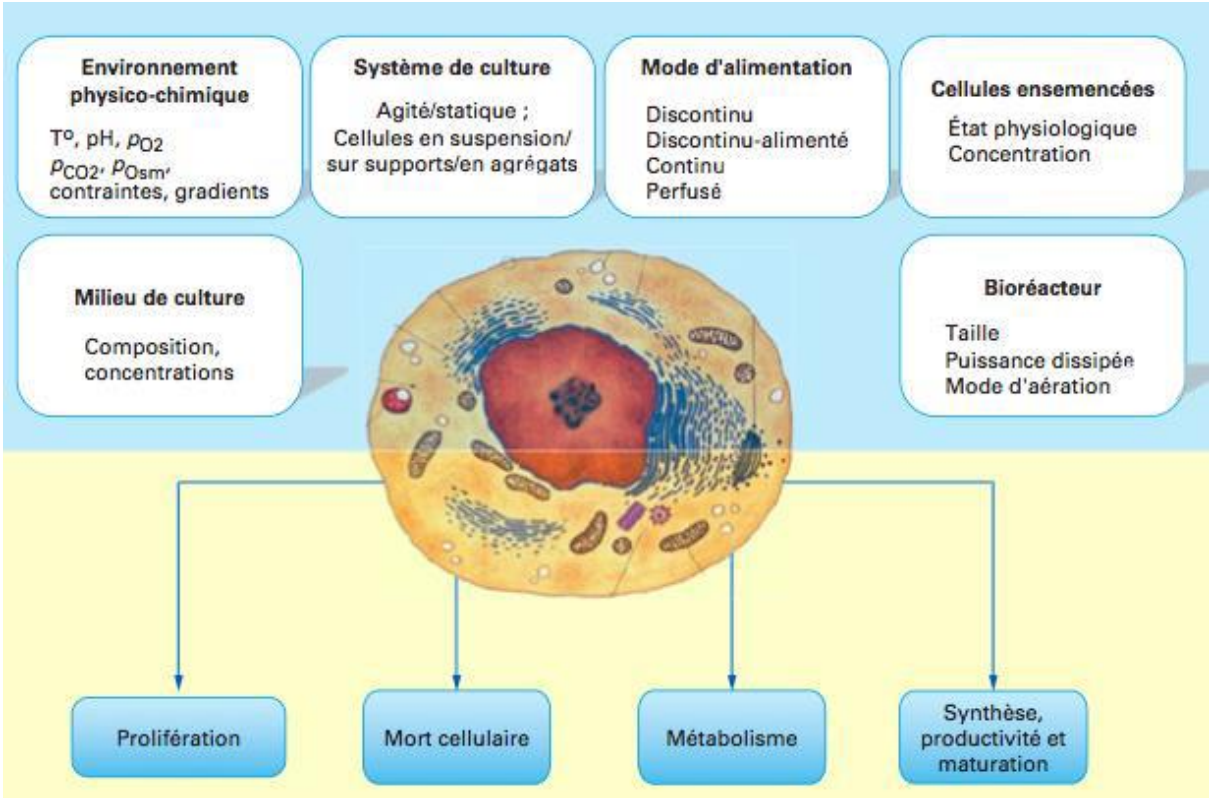


Figure 52. Facteurs du procédé de culture susceptibles d’influencer le comportement des cellules animales

V.1. Les biotechnologies de l’embryon

La biotechnologie de l’embryon l’ensemble des techniques mises au point à partir des connaissances de base acquises sur le développement de l’embryon. Leur essor est récent et encore à bien des égards modestes. Elles se sont développées chez les mammifères domestiques à partir des années 80.

L’évolution des biotechnologies de reproduction animale BRA est classiquement décrite en quatre générations, comme l’illustre la figure ci-dessous. Conjointement à la troisième génération s’est aussi mis en place, à la fin du XXe siècle, le sexage de l’embryon, sa congélation ou encore l’ICSI (Intra Cytoplasmic Spermatozoa Injection).

Ces techniques se sont organisées autour de trois technologies principales : la transplantation embryonnaire, associant la production et la collecte d’embryons *in vivo* (**in utero**) et intégrant maintenant le plus souvent les possibilités offertes par leur congélation ou l’examen de leur cellules (sexage) ;

Plus récemment, une deuxième génération de technologies est apparue qui s’appuie sur la production d’embryons en culture, après maturation et fécondation *in vitro* d’ovocytes prélevés sur l’animal vivant ou après abattage (FIVETE : Fécondation *in vitro* et transfert d’embryons, OPU : Ovum Pick Up).

Les progrès de nos connaissances sur la physiologie de l’embryon de mammifère permettent maintenant l’émergence d’une troisième génération de techniques. Celles-ci tirent parti de

l'extraordinaire plasticité des premiers stades de l'embryogénèse et visent à modifier encore plus en avant les caractéristiques de l'embryon : le transfert nucléaire qui aboutit à la production de clones, et la transgénèse qui consiste à introduire un gène étranger dans les cellules de l'embryon en sont les illustrations.

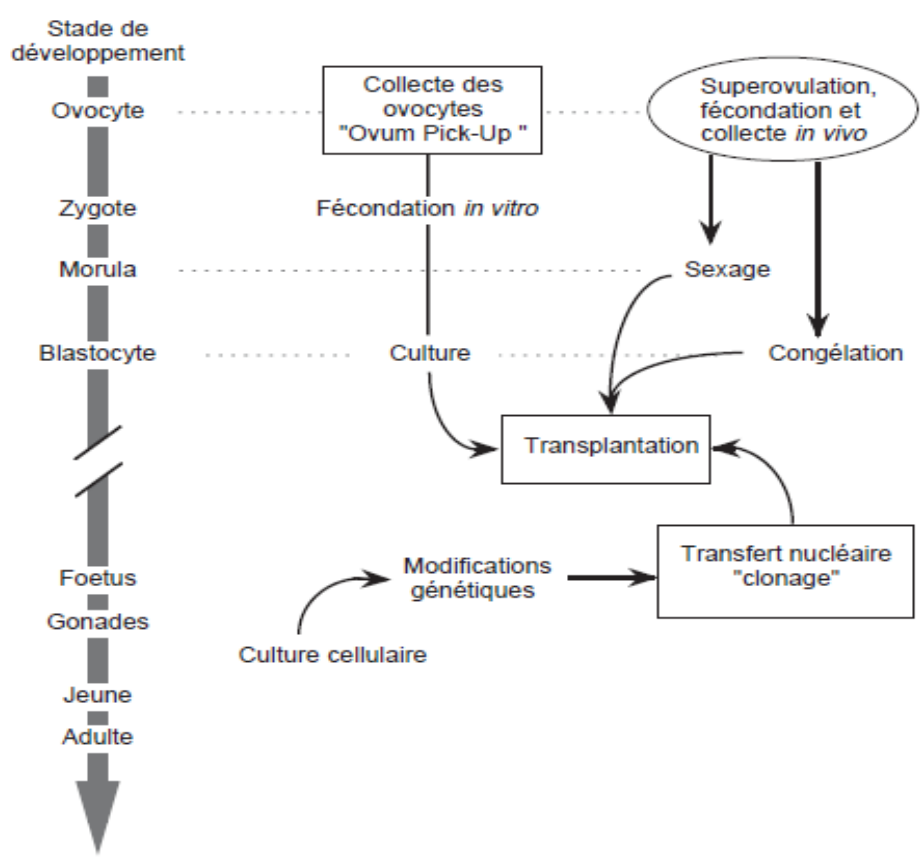


Figure 53. Les principales biotechnologies de l'embryon.

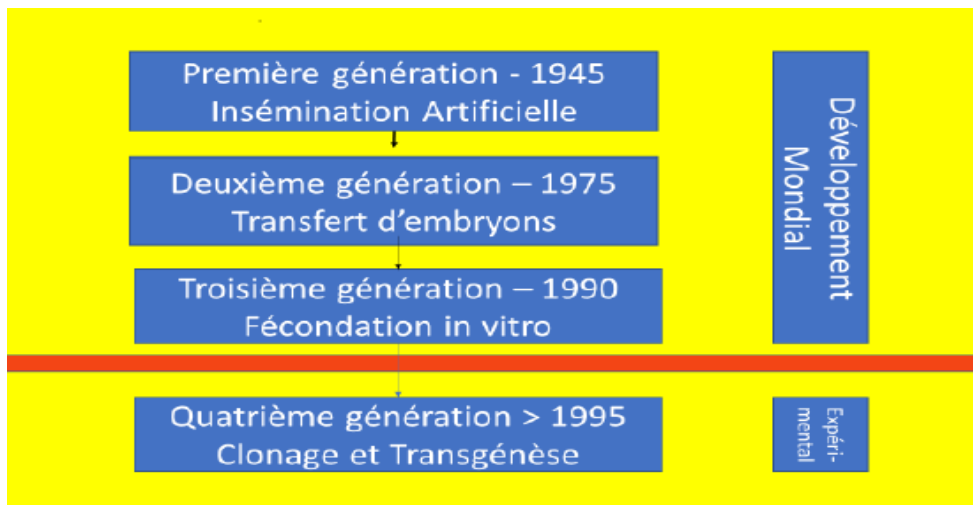


Figure 54. Les quatre générations de Biotechnologies de la Reproduction Animale

V.2. Première génération : l'insémination animale

Le transfert d'embryons est une méthode de reproduction qui consiste à faire naître par des femelles porteuses (receveuses) des descendants issus d'une même mère sélectionnée comme donneuse d'embryons. Les embryons transplantés peuvent être produits in vivo après superovulation de la

femelle donneuse ou in vitro après FIV (FIV : fécondation in vitro). Les femelles donneuses étant des animaux génétiquement supérieurs

L'insémination animale (antérieurement appelée insémination artificielle des animaux) est la plus ancienne de ces Biotechnologies ; elle est aussi, et de loin la plus répandue dans le monde. Les premiers essais méthodiques d'insémination chez les espèces domestiques ont débuté dans les années 1935-1939 sous l'initiative de chercheurs (le soviétique Milovanov, et les français Letard et Laplaud), puis en France par Robert Cassou.

La technique – largement développée en Europe et en Amérique du Nord après la deuxième guerre – consiste à récolter du sperme des reproducteurs, de le traiter et de le déposer dans les voies génitales femelles. Les méthodes diffèrent selon les espèces et l'anatomie de leur tractus génital : le sperme peut être traité à température ambiante, réfrigéré, ou congelé et alors maintenu dans l'azote liquide (-196°C).

Une des contraintes majeures du recours à l'insémination animale est la nécessaire détection des chaleurs, afin d'inséminer en temps opportun. Des techniques de maîtrise des cycles sexuels permettent de lever en partie de telles contraintes.

Selon les statistiques mondiales, le taux de gestation obtenu par insémination, dans l'élevage bovin laitier par exemple, est de l'ordre de 60 % (le plus souvent après une double insémination) ; on constate, en général, une légère réduction du taux de fécondation de la semence congelée par rapport à la semence fraîche, par exemple chez les porcins

Un tel succès traduit le fort impact économique de l'insémination, en raison de trois avantages majeurs :

- le gain génétique généré par cette technique, dont la révolution génomique récente ;
- la flexibilité d'usage, notamment le dé-saisonnement, ou encore la possibilité d'éviter la présence d'un mâle dans le troupeau, parfois dangereux ou difficile à gérer ;
- last but not least, l'intérêt sanitaire, avec la garantie qu'apporte la dose de semence préparée dans un centre agréé soumis à un contrôle sanitaire extrêmement précis.

Enfin la réussite technique offre aux éleveurs un prix de la dose très accessible, qui complète un schéma économiquement très favorable. Deux facteurs limitent aujourd'hui l'efficacité de la transplantation : le nombre relativement faible d'embryons que l'on obtient après un traitement hormonal de superovulation et la variabilité de production entre femelles traitées.

L'objectif premier du transfert embryonnaire étant l'**accélération du progrès génétique**, on choisit une génisse ou une vache de haute production laitière ou de bonne conformation viandeuse associées à de bonnes performances de fertilité et de fécondité. Après une récolte d'embryons, il est indispensable de s'assurer de la lyse des corps jaunes induits pour éviter une gestation

gémellaire et induire aussi rapidement que possible le retour à une cyclicité normale. Deux stratégies sont possibles : injecter une PGF2 α le jour de la récolte ou différer cette injection d'une semaine ou deux. On obtiendra par la suite une **chaleur** dite de **récolte**.

L'objectif d'une stimulation ovarienne est d'obtenir un **maximum d'embryons transférables**. Des réponses variables entre individus voire d'un traitement à l'autre ont été enregistrés. Divers facteurs ont été impliqués. Outre de la **saison** (effet négatif des températures élevées) ou de l'**alimentation** (carence en énergie), ils relèvent essentiellement des facteurs intrinsèques liés au **statut ovarien** de l'animal et du **rythme d'injection** des substances utilisées dans les traitements de super ovulation.

Deux facteurs limitent l'application du transfert d'embryons direct : le nombre **relativement faible d'embryons** que l'on obtient après un traitement hormonal de super ovulation (7 à 8 embryons en moyenne dont seulement 5 à 6 d'entre eux sont transférable) et la **variabilité** de production entre femelles traitées. En outre, 20 à 30 % des femelles traitées ne donnent pas d'embryons transférables, alors que 25 % produisent plus de 6 embryons ce qui **limite** les possibilités de **planification rigoureuse** du nombre de femelles receveuses. Il en résulte un coût technique environ 2 fois plus élevé que celui de l'insémination artificielle.

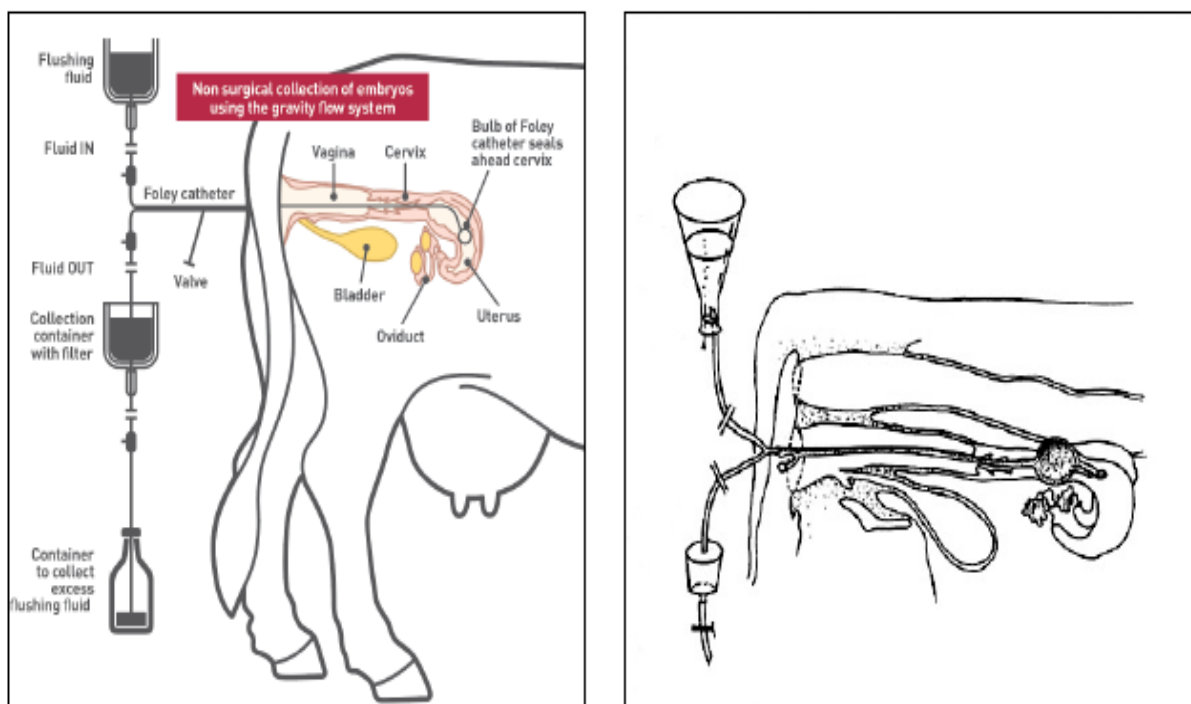


Figure 55 : Schémas de récolte transcervicale d'embryons chez une vache.

V.3. Deuxième génération : la transplantation embryonnaire

Cette deuxième génération de BRA consiste à prélever chez une femelle des embryons fécondés *in vivo*, c'est-à-dire dans l'utérus de l'animal (le plus souvent après insémination animale), puis d'évaluer la qualité de ces embryons, voire de procéder à une conservation de longue durée (congélation) avant de les transférer chez un animal receveur. Chez les bovins, les taux de gestation

de ces embryons remis en place sont en moyenne de 60 % pour les embryons transférés à l'état frais, et de 50 % pour les embryons congelés.

Le succès de cette BRA provient d'avantages majeurs :

- génétique, par la disponibilité pour le propriétaire de la receveuse d'un animal génétiquement amélioré par ses deux composantes paternelle et maternelle (puisque'il possède les 2n chromosomes, contrairement à la semence),
- et surtout sanitaire : la transplantation embryonnaire est le moyen le plus sûr d'échanges de gènes au plan sanitaire

V.4. Troisième génération : la fécondation *in vitro*

Cette troisième génération des BRA s'est mise en place chez les bovins au milieu des années 1980, bien que la première réussite de fécondation *in vitro* publiée fut celle réalisée chez le lapin, en 1954. Cette technique s'étend à d'autres espèces, telles les petits ruminants ou les chevaux.

- La première étape technique est la collecte des ovocytes chez un animal donneur (en général de qualité génétique supérieure). Il y a dans ce cas deux sources différentes :
- Le prélèvement par aspiration sous contrôle échographique, par ce qu'il est convenu d'appeler un ovum pick up (OPU) sur l'animal vivant. L'OPU peut être pratiqué chez le même animal tous les 8 à 10 jours, ainsi que pendant le premier trimestre de la gestation.
- Les provenances d'abattoirs, après abattage des femelles.
- Les étapes suivantes de la manipulation nécessitent un laboratoire hautement équipé, et sous maîtrise sanitaire drastique afin d'éviter toute introduction d'agents pathogènes dans le processus. Les traitements comprennent la capacitation des spermatozoïdes, la mise en présence des deux gamètes en milieu conditionné précis, puis la culture des embryons jusqu'au stade dit blastocyste, soit pendant 7 jours environ. La suite du processus est semblable à celui du transfert d'embryons fécondés *in vivo*.

V.5. Quatrième génération : clonage somatique, transgénèse et réécriture du génome.

Cette quatrième génération de BRA ne concerne désormais presque exclusivement que des activités de recherche ou de développement de molécules pharmacologiques.

Le clonage résulte de la reprogrammation nucléaire, après transfert d'un noyau de cellule somatique de l'individu à cloner, dans un ovocyte mûr préalablement énucléé. L'intérêt actuel du clonage est qu'il constitue un excellent modèle d'étude de la relation génome-épigénome.

Le premier animal transgénique fut obtenu en 1982 par Palmiter, chez la souris, qui exprimait très intensément le gène d'hormone de croissance du rat. Les travaux de transgénèse chez les animaux domestiques de la fin du XXe siècle et du XXIe (vaches, brebis ou porcs) ont consisté à intégrer dans le génome d'un embryon un gène étranger, dans le but de faire produire à l'animal domestique des molécules d'intérêt pharmaceutique ou médical, telles que l'alpha antitrypsine pour traiter l'emphysème pulmonaire, la transferrine, l'albumine humaine ou des facteurs de coagulation du

sang pour soigner les hémophiles. Les techniques initiales sont toutefois extrêmement peu efficaces.

V.6. Culture cellulaire animale pour des productions industrielles

Ce sont des cultures *in vitro* de cellules, de tissus et d'organe dans un milieu artificiel, c'est à dire, de composition connue et sans variation dues au métabolisme. Ces techniques récentes sont liées au développement des biotechnologies. Elles ont pour but d'étudier des phénomènes physiologiques, des mécanismes biochimiques sans avoir recours à l'expérimentation *in vivo*.

L'un des principaux avantages des cellules animales réside dans leur capacité à réaliser les modifications post-traductionnelles, dont la glycosylation, au cours de la synthèse de protéines recombinantes. L'état de glycosylation est important pour de nombreuses propriétés de la protéine: pharmacocinétique, bioactivité, sécrétion, solubilité, antigénicité...

La maîtrise des cultures de cellules animales pour produire des substances bioactives constitue un enjeu thérapeutique majeur qui génère des revenus importants.

Il existe deux types de cellules qu'on peut cultiver :

- **Cellules primaires :**

Il faut remonter à la moitié du dernier siècle pour observer les premières applications industrielles des procédés de culture de cellules animales. Celles-ci concernaient principalement la production de vaccin. Les premiers travaux portaient sur des cultures primaires, dans lesquelles les cellules provenant directement de la digestion de tissus conservent leurs propriétés de différenciation proches de l'organe d'origine. Mais, leur préparation fastidieuse, leur durée de vie limitée, leur sensibilité aux contraintes en bioréacteurs, les risques de contaminations virales et les problèmes de reproductibilité lot-à-lot, en font des outils inadéquats à l'échelle industrielle.

Des souches cellulaires humaines diploïdes ont alors été préférées pour la production industrielle de nombreux vaccins antiviraux. Développées au cours des années 1960, les souches WI-38 et MRC-5, issues de cellules pulmonaires de fœtus humains, en sont des exemples représentatifs. Leur utilisation à grande échelle reste un défi du fait de leur faible productivité et de leur sénescence après quelques semaines de propagation *in vitro*.

- **Cellules continues**

Les cellules issues de lignées continues (Tableau 11) possèdent en théorie une capacité illimitée d'effectuer des divisions. L'utilisation des lignées continues a permis des progrès important dans les procédés de culture en bioréacteur.

Tableau 11. Lignées cellulaires les plus utilisés dans les procédés industriels

Cellules	Origine	Applications
Vero	Cellules épithéliales de rein de singe vert	Vaccin viraux humains et vétérinaires
ST	Cellules épithéliales de testicules de porc	Vaccin viraux vétérinaires
MDCK	Cellules épithéliales de rein de chien	Vaccin viraux vétérinaires
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois	Protéines recombinantes
BHK	Cellules de rein de bébé hamster	Facteur VIII
HEK293	Cellules épithéliales de rein humain transformées	Adénovirus
PER.C6	Cellules de rétine humaine	Protéines recombinantes
NS0	Cellules de myélome de souris	Protéines recombinantes
Hybridomes	Cellules hybrides murines	Anticorps monoclonaux
Sf9 High-5	Cellules d'insectes	Protéines recombinantes

Les lignées continues sont généralement, soit des cellules cancéreuses prélevées chez un patient, soit des cellules ayant subi une mutation dans des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, soit des cellules transformées par un oncogène. L'utilisation de ces cellules dans le but de produire des substances thérapeutiques a été progressivement acceptée dans les années 1980. Cette utilisation est régie par les exigences et réglementations de l'OMS.

Les tous premiers milieux de culture n'étaient constitués que de fluides biologiques. Il s'est très vite avéré nécessaire de proposer des formulations mieux contrôlées et basées sur les composés essentiels à la croissance des cellules. De plus, des problèmes d'approvisionnement sont susceptibles de se produire pour de grands volumes de production. On retrouve ainsi deux grandes catégories de milieux de culture, selon qu'ils contiennent ou non des sérums animaux.

L'utilisation de milieux sans sérum se généralise pour la plupart des procédés qui sont en cours de développement ou qui ont été récemment implantés. Par contre, il existe certains procédés qui utilisent encore du sérum en raison de leur validation ancienne, de la mise en œuvre de cellules plus exigeantes, ou encore de l'usage diagnostic des produits générés.

Généralement, la substitution du sérum s'accompagne d'une perte de productivité. La recherche actuelle s'oriente vers le développement de milieu sans sérum capable de rattraper cette perte en productivité.

Les milieux de culture avec sérum sont constitués d'un **milieu de base** complété par un sérum animal, tel que le sérum de veau fœtal, ajouté à hauteur de 5 à 20% v/v.

Le sérum de veau fœtal contient, de nombreuses substances requises pour la prolifération cellulaire, telles que des facteurs de croissance, des hormones (insuline), des facteurs d'adhérence (fibronectine), des traces de métaux ainsi que des protéines de transport du fer ou des lipides (albumine, transferrine). De plus, il possède un effet protecteur contre le cisaillement et contient des inhibiteurs de protéases, essentiels pour la qualité des protéines produites. Il sert également d'inhibiteur de trypsine dans le cas des cellules adhérentes. En dépit de ces avantages, l'utilisation du sérum de veau fœtal est rendue problématique du fait de sa variabilité entre les lots, de la

demande croissante du marché et d’une charge élevée en protéines qui complique les étapes de purification de la protéine d’intérêt.

Enfin, les risques de contamination par les virus animaux ou par des agents transmissibles non conventionnels, comme le prion, sont redoutés. Toutes ces raisons ont conduit au développement de milieux de culture sans sérum.

Tableau 12. Composition non exhaustive de milieux de culture de base avant supplémentation par le sérum de veau fœtal (concentrations exprimées en mg.L⁻¹)

Composés	Milieux de base			
	MEM	DMEM	RPMI-1640	Ham's F12
Sels inorganiques				
Chlorure de calcium, 2H ₂ O	200	265		44,1
Nitrate de calcium, 4H ₂ O			100	
Chlorure de magnésium, 6H ₂ O				123
Sulfate de magnésium	97,67	97,67	48,84	
Chlorure de potassium	400	400	400	224
Bicarbonate de sodium		3700	2000	1176
Chlorure de sodium	6800	6400	6000	7599
Phosphate de sodium dibasique	122		800	142,04
Phosphate de sodium monobasique		109		
Sulfate de cuivre, 7H ₂ O				0,0025
Sulfate ferreux, 7H ₂ O				0,834
Nitrate de fer, 9H ₂ O		0,1		
Sulfate de zinc				0,863
Acides aminés				
L-Alanine	25			9
L-Arginine, HCl	126	840	200	211
L-Asparagine, H ₂ O	50		50	15,01
L-Acide aspartique	30		20	13,3
L-Cystine, 2HCl	31,3		65,2	
L-Cystéine, HCl, H ₂ O	10	62,6		35
L-Acide glutamique	75		20	14,7
L-Glutamine	292	584	300	146
Glycine	50	30	10	7,51
L-Histidine, 3HCl, H ₂ O	42	42	15	20,96
L-Isoleucine	52	105	50	3,94
L-Leucine	52	105	50	13,1
L-Lysine, HCl	72,5	1460	40	36,5
L-Méthionine	15	30	15	4,48
L-Phénylalanine	32	66	15	4,96
L-Proline	40		20	34,5
Hydroxy-L-Proline			20	
L-Sérine	25	42	30	10,5
L-Thréonine	48	95	20	11,9
L-Tryptophane	10	16	5	2,04
L-Tyrosine, 2Na, 2H ₂ O	51,9	103,79	28,83	7,78
L-Valine	46	94	20	11,7

Tableau 13. Composition non exhaustive de milieux de culture de base avant supplémentation par le sérum de veau fœtal (concentrations exprimées en mg.L⁻¹)

Composés	Milieux de base			
	MEM	DMEM	RPMI-1640	Ham's F12
Vitamines				
Acide p-aminobenzoïque			1	
Acide folique	1	4	1	1,32
D-Acide Pantothénique		4	0,25	0,48
D-Biotine	0,1		0,2	0,0073
Chlorure de choline	1	4	3	13,96
L-Acide ascorbic, Na	50			
Myo-Inositol	2	7,2	35	18
Niacinamide	1	4	1	0,037
Pyridoxine, HCl	1	4	1	0,062
Riboflavine	0,1	0,4	0,2	0,038
Thiamine, HCl	1	4	1	0,34
Vitamine B12	1,36		0,005	1,36
Autres				
Acide alpha-lipoïque				0,21
Acide linoléique				0,084
Acide pyruvique, Na		110		110
Adénosine	10			
D-Glucose	1000	4500	2000	1802
Glutathion			1	
Guanosine	10			
Hypoxanthine				4,08
Rouge de phénol, Na		15,9	5,3	1,3
Putrescine, HCl				0,161
Thymidine	10			0,73

Il est essentiel de mieux comprendre les interactions entre les cellules et leur environnement, pour pouvoir optimiser les procédés de culture de cellules animales. En effet, l’environnement a un impact sur le comportement de la cellule, il peut modifier sa vitesse de prolifération, sa morphologie, son métabolisme, sa capacité de production ainsi que la qualité de la protéine produite.

La concentration en cellules viables résulte de deux mécanismes opposés que sont la croissance et la mort cellulaires. On observe que les conditions qui ralentissent la croissance accélèrent la mort cellulaire: épuisement en nutriment, température non optimale, contraintes hydrodynamiques. La concentration en molécule d’intérêt récoltée dépend des mécanismes de production et de dégradation. La physiologie des cellules, leur capacité de synthèse et de sécrétion sont liées au milieu de culture. Il arrive souvent qu’un compromis doive être trouvé entre les conditions opératoires favorisant la croissance cellulaire et celles favorisant l’obtention du produit d’intérêt, car elles peuvent s’avérer opposées.

Tout procédé de culture de cellules animales possède des caractéristiques propres. Une meilleure compréhension des impacts des lipides, des surfactants, de l’aération et de la stabilité génétique des cellules en culture permettrait d’améliorer les stratégies mise en œuvre pour effectuer l’extrapolation dimensionnelle. Réaliser la transposition d’une petite échelle à une échelle industrielle est à chaque fois une expérience unique et différente qui requiert des compétences multidisciplinaires.

Chapitre VI : Application des biotechnologies dans le domaine végétal

Objectif : Cette partie vise à :

- Acquérir des concepts et des techniques utilisées dans le domaine de la biologie végétale, en vue de préserver les espèces et augmenter la production des cultures d'intérêt alimentaire, industriel et ornemental.

VI.1. Définition :

Les biotechnologies végétales sont des biotechnologies –techniques industrielles- où le matériel végétal constitue la matière première. Les biotechnologies végétales utilisent la culture des tissus végétaux afin d'améliorer la production agricole ou industrielle. Elles permettent l'amélioration et la production des plantes.

Les biotechnologies végétales sont des technologies qui recouvrent toutes les interventions en laboratoire sur les organes, les tissus, les cellules ou l'ADN des végétaux, soit pour mieux maîtriser ou accélérer leur production, soit pour améliorer leurs caractéristiques, au service de la recherche, de l'agriculture ou de productions industrielles. Les biotechnologies vertes s'appliquent à l'agriculture et à l'alimentation, mais elles investissent également d'autres champs. Grâce aux biotechnologies vertes, les chercheurs espèrent parvenir à relever les défis lancés à l'agriculture et assurer tout à la fois production alimentaire, production d'énergie et production de biomatériaux en préservant l'environnement.

Les biotechnologies vertes reposent essentiellement sur les connaissances liées au fonctionnement du génome et des plantes. Les techniques du génie génétique permettent aujourd'hui de transférer certains gènes d'une espèce de plante à une autre pour améliorer de façon ciblée la résistance du végétal tant aux insectes qu'aux virus ou encore aux herbicides. Aussi, la transgénèse dans les plantes est également étudiée comme moyen de développer des variétés végétales pouvant servir de bio-usines et produire des substances d'intérêt médical, biomédical ou industriel en quantités faciles à isoler et à purifier.

VI.2. Les grandes étapes de l'avènement de la culture in vitro.

1860-1862. Sacko et Knop (chimiste allemand Wilhlem Knop) découvrent que les plantes absorbent des substances minérales à partir du sol. Le résultat de ces travaux, c'est l'élaboration d'une solution nutritive liquide (*solution de Knop*).

1870. Premières tentatives de culture d'organes vivants isolés : conservation de queues de têtards de grenouille.

1901. Thoma Hunt Morgan est probablement le premier à avoir précisé la notion de totipotence cellulaire comme étant la capacité de régénérer un organisme complet à partir d'une seule cellule vivante.

VI.3. La totipotence cellulaire

Dès 1902, Haberland, un biologiste allemand, observe les potentialités naturelles de la multiplication végétative (bouturage). Suite à ces travaux, il énonce le premier grand principe qui ouvrira la voie de la micropropagation des végétaux. Il s'agit du principe de la totipotence cellulaire. "toute cellule végétale est capable de régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issue". Sa contribution fut l'hypothèse de l'existence d'une phytohormone qu'il appela **traumatine**.

VI.4. La dédifférenciation cellulaire

On voit les grandes cellules différenciées (dans les feuilles, tiges, pétales,) perdre leurs vacuoles, leur noyau se diviser activement, et de nombreuses et très petites cellules méristématiques apparaître. Une cellule dédifférenciée peut alors évoluer dans toutes sortes de directions

1922. W.J ROBBINS et W.KOTTE obtiennent la croissance de pointes de racines pendant quelques mois seulement.

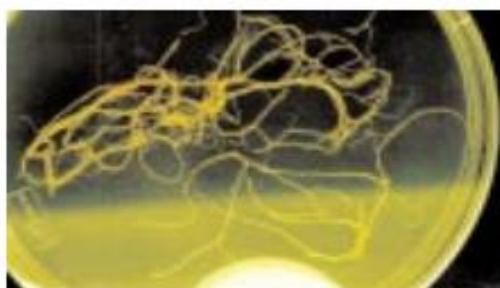
1926. E. KUROSAWA découvre l'action de gibbérelline sur la croissance.

En 1934, WHITE réussit la culture de racines de tomate sur un milieu contenant de l'eau, des sels minéraux, un extrait de levure et du sucre et une hormone végétale, la seule connue à l'époque : l'auxine*.

* En effet, en 1934, on découvre **l'auxine (AIA)** : il faut 100 kg de maïs immature pour obtenir 500 mg d'AIA. Cette substance naturelle est principalement synthétisée dans les parties apicales et agit sur l'élongation des cellules donc sur la croissance des plantes.



Mise en culture de racines de Tomate.



Au bout de quelques semaines on observe la croissance des racines.

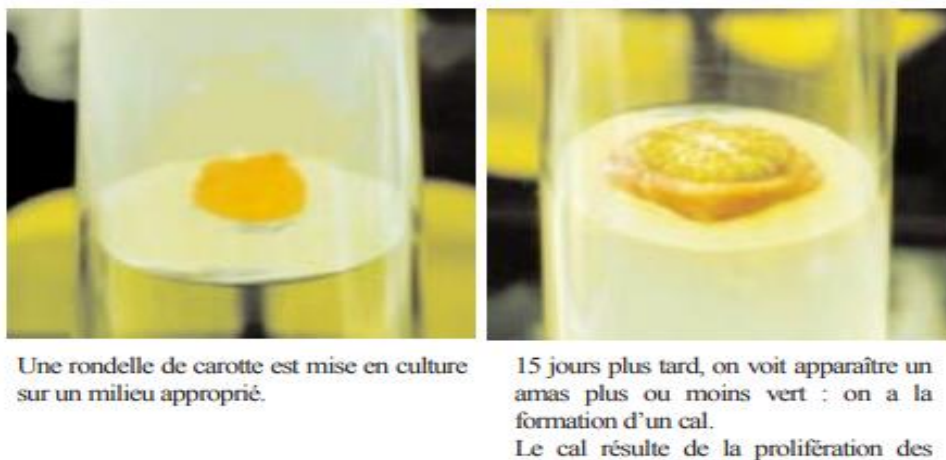


Figure 56. Culture in vitro de tomate

1935. R.J.GAUTHERET cultive et multiplie des cellules cambiales de saule en introduisant des auxines dans le milieu.

1936. O. ORSOS. Induit des cals et des organes à partir de tissus de tubercules de chou-navet.

En 1939, Gautheret obtient à partir de tissu carotte, un amas de cellules dédifférenciées : un cal. On peut cultiver ce cal indéfiniment dans le temps. Avec lui démarre vraiment la culture in vitro ("dans du verre"). Il faut également cité P.NOBERCOURT quatrième pionnier des cultures in vitro végétales sur les carottes.



Une rondelle de carotte est mise en culture sur un milieu approprié.

15 jours plus tard, on voit apparaître un amas plus ou moins vert : on a la formation d'un cal.
Le cal résulte de la prolifération des

Figure 57. Culture in vitro de carotte.

En 1962, Murashige et Skoog étudient la multiplication végétative du tabac et mettent au point le premier milieu de base pour la culture in vitro. Ce milieu contient des sels minéraux, des sucres, des vitamines B, des auxines et des cytokinines*. Ce milieu rend possible la culture et la prolifération de méristèmes* de tiges jusqu'alors réfractaires à la multiplication végétative in vitro.

* **Les cytokinines** ont été découvertes par le biais de la culture *in vitro* en 1956. Ce groupe de substances de croissance végétales est responsable des divisions cellulaires. Les cytokinines sont principalement synthétisées dans les parties racinaires jeunes.

Utilisation des hormones en culture *in vitro*

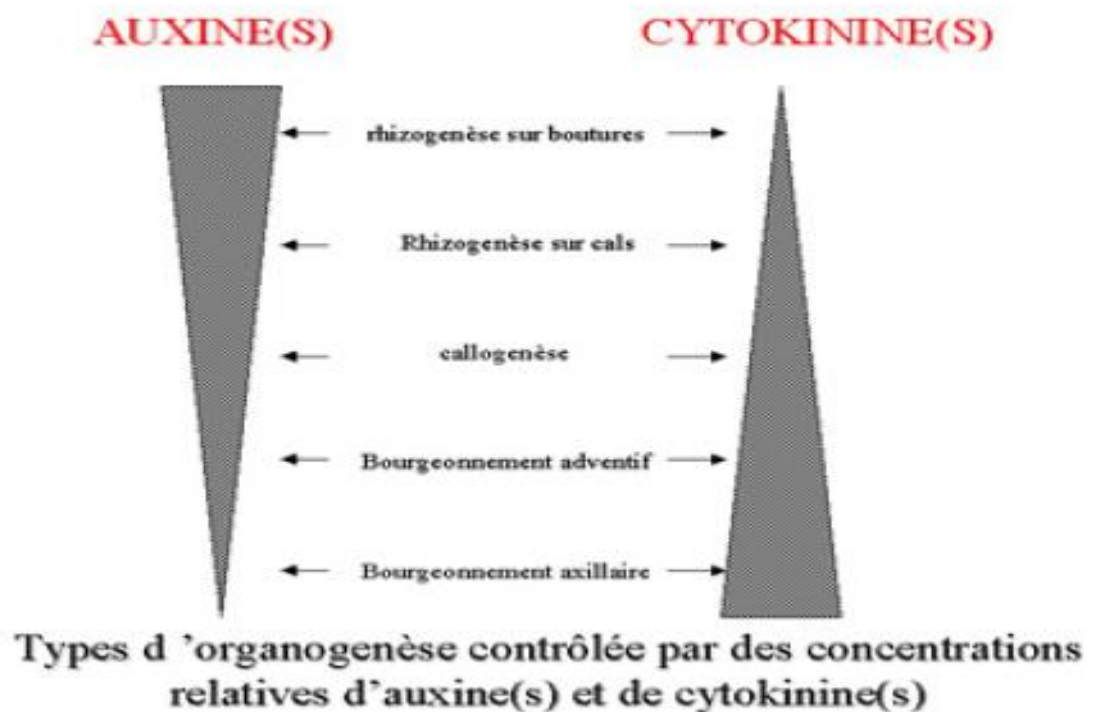


Figure 58. Utilisation des hormones en culture *in vitro*.

1965. Germination et micropropagation *in vitro* des orchidées.

1973. Hybride issu d'une fusion de protoplastes.

1994. Variété de tomate transgénique créée par la société Américaine Calgène.

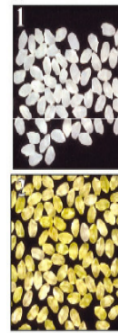
1996. Maïs Bt transgénique commercialisés aux USA (*Bacillus thuringiensis*) résistants à la pirale du maïs.

2000. Création du riz doré (riz transgénique) riche en B carotène.

Production de substances médicalement actives ingérées avec la plante

Exemple: le riz doré (golden rice)

- Carence en vitamine A (dérivé du carotène) chronique dans de nombreux pays
- +100 millions d'enfants -> cécité, maladies infantiles
- Production de provitamine A
- Transformation du riz avec gènes de biosynthèse des caroténoïdes exprimés dans le grain
- prometteur mais production encore insuffisante (100 µg de Vit A pour 300 g de riz)



Résistance aux insectes grâce à la toxine Bt

Les toxines du *Bacillus thuringiensis* (Bt) sont toxiques pour les insectes après ingestion (mais elles ne sont pas toxiques pour les animaux). Kota et al. (1999) ont vu que l'expression de la toxine Bt dans les chloroplastes de plante porte à une mortalité élevée des insectes en protégeant les plantes des attaques. En plus l'expression de la toxine est localisée dans les feuilles et absente dans le tissu (fruits, grains) qui sont mangés par les animaux.



VI.5. Fondements de la culture *in vitro*

La technique *in vitro* est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes. Il s'agit un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants) et d'autre part des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité...).

Ces méthodes s'appliquent des organes ou des fragments d'organes : les explants. - graine immature, - embryon, - ovule, - pollen, - bourgeon terminal, - bourgeon axillaire, - morceau de tige, - morceau de feuille, - de pétale de fleur, - etc...

L'explant doit trouver dans le milieu de culture tout ce dont il a besoin pour survivre, se multiplier et éventuellement régénérer un nouvel individu, en fait, tout ce que la plante mère peut fournir : a) par les racines : les éléments minéraux, l'eau ; b) par les feuilles et grâce à la photosynthèse : des sucres, des vitamines et des acides aminés ; c) les hormones, pour orienter la formation des organes.

Le principe de la culture *in vitro* est réalisable grâce à une propriété que possèdent les cellules végétales : **la totipotence végétative**. C'est l'aptitude de la cellule végétale à exprimer la totalité de ses potentialités pour donner un organisme entier. Une cellule est dite totipotente quand elle a la capacité de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée et de se structurer en formant un organisme pluricellulaire. En effet, les cellules végétales, prélevées sur un organe quelconque d'une plante, possèdent la capacité de régénérer un individu complet identique à la plante mère.

La totipotence débute par la formation de cals : amas de cellules indifférenciées qui permet de régénérer un individu entier génétiquement identique à la plante mère. Pour cela, il faut que les explants soient placés dans des conditions appropriées.

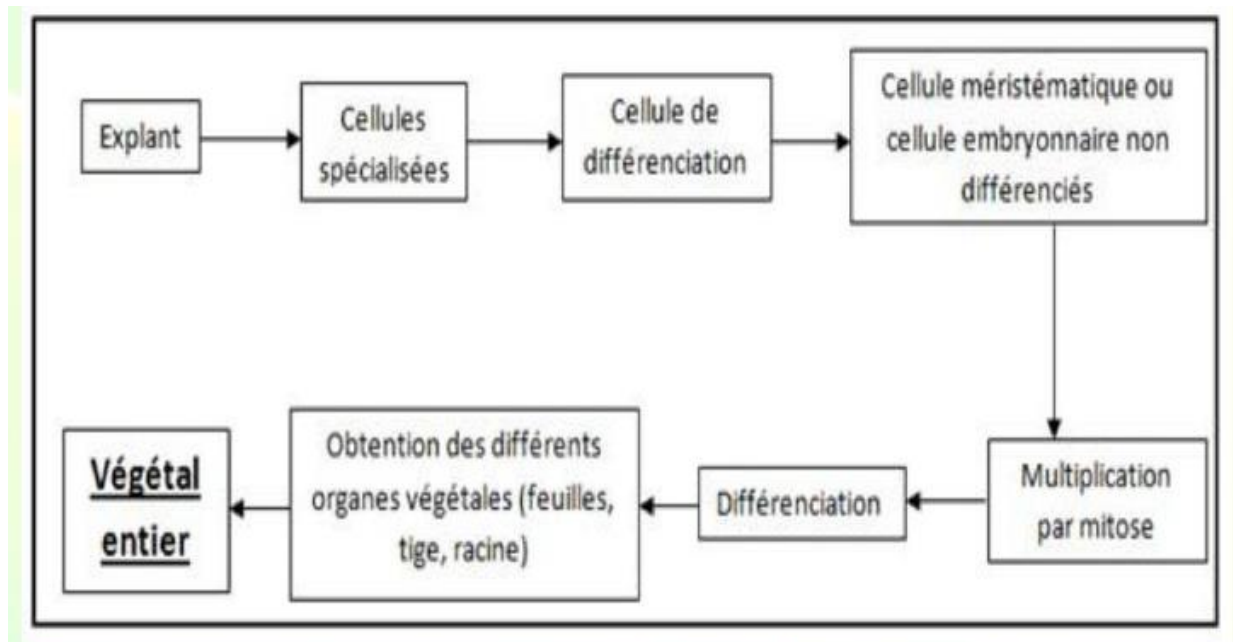


Figure 59. Schéma explicatif de la totipotence

VI.6. Les types de multiplication in vitro

VI.6.1. Multiplication par bourgeonnement axillaire

Le point de départ est un bourgeon terminal ou axillaire. Cette technique de **micropropagation** ne fait qu'accélérer in vitro le fonctionnement normal des bourgeons déjà formés sur une plante.

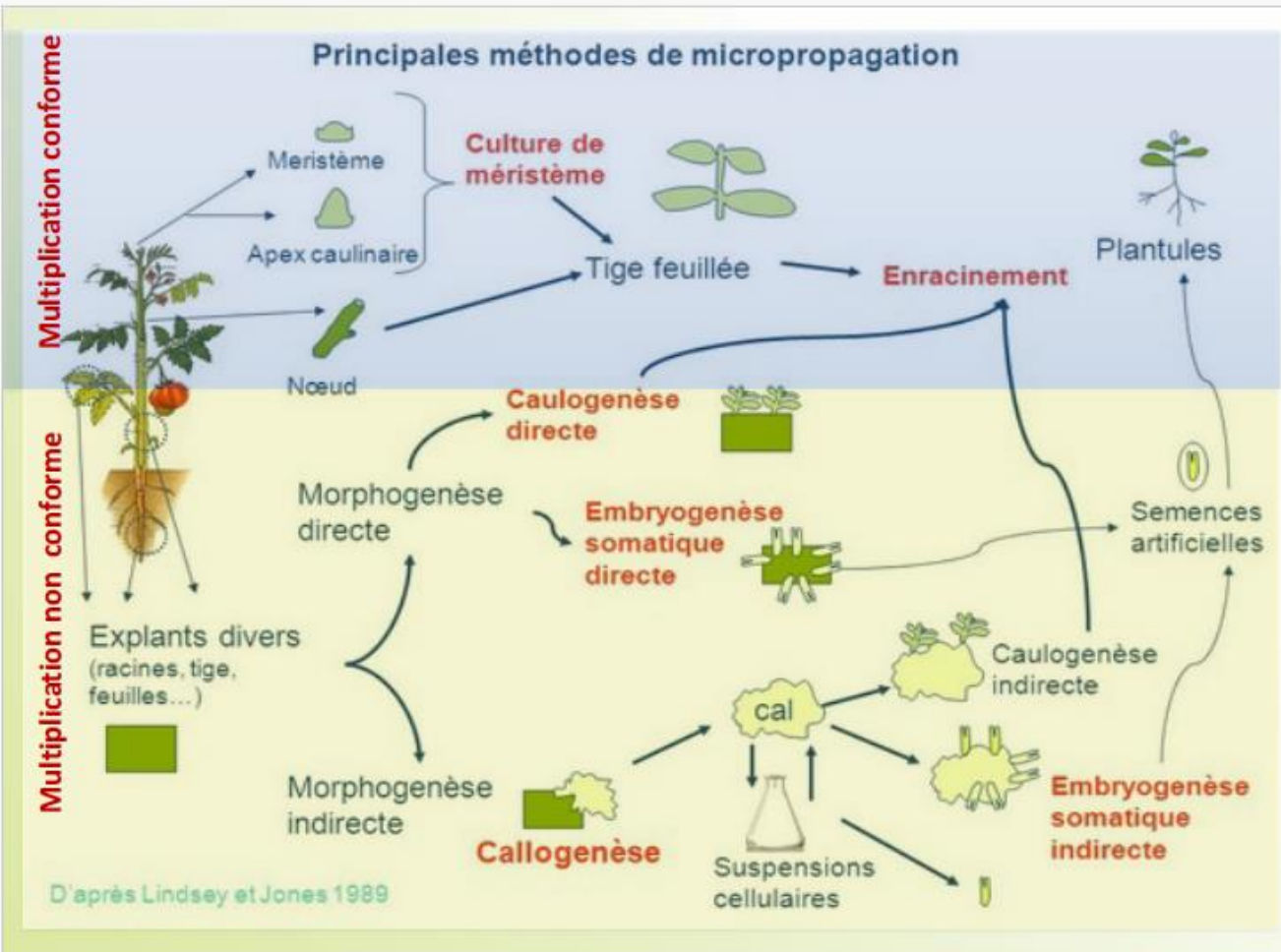
A. L'explant initial peut être soit un méristème, soit un bourgeon, soit un fragment de tige comportant au moins un bourgeon axillaire.

B. Sur un milieu approprié comprenant des cytokinines, le méristème se divise ou le bourgeon débourre et développent tous les deux une tige ou une touffe feuillée.

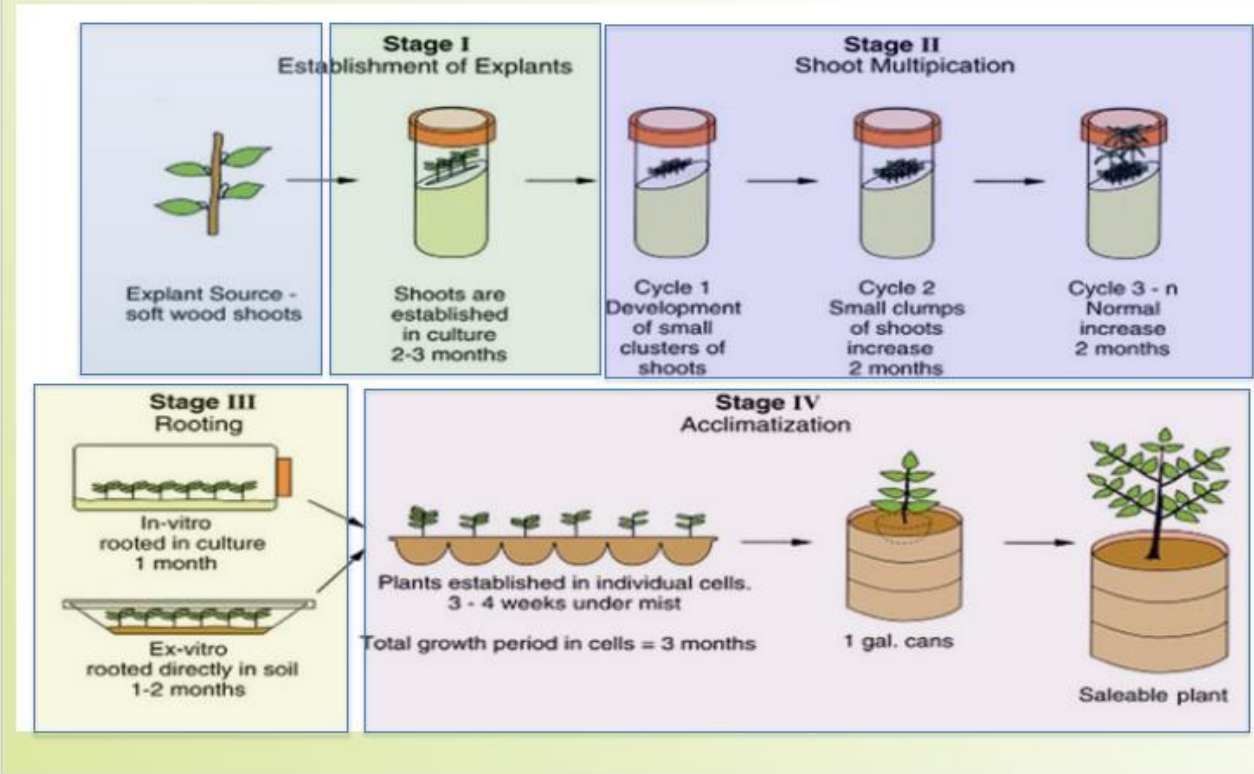
C. Cette tige peut être découpée en fragments (nœuds) qui, remis sur le milieu, vont redonner autant de touffes feuillées qui peuvent être aussi subdivisées : c'est la phase de multiplication.

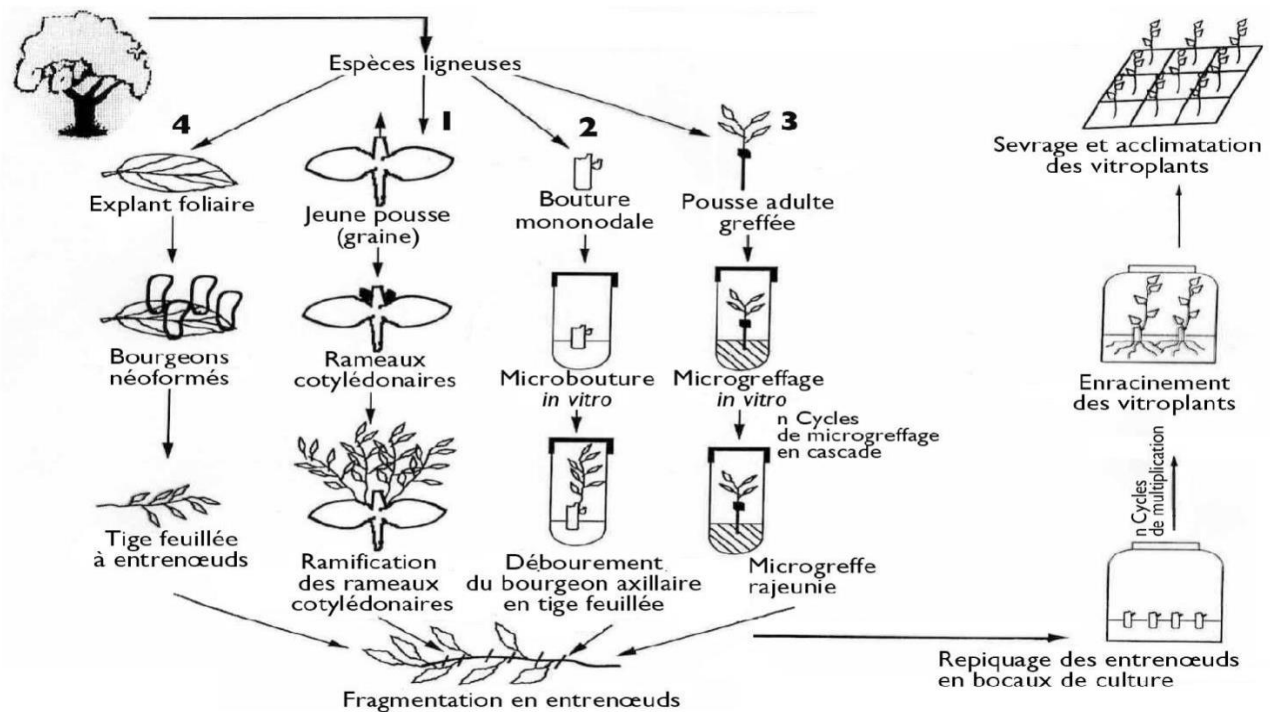
D. Les tiges peuvent alors être transférées sur un milieu enrichi en auxines, qui permet leur enracinement. On obtient finalement dans chaque tube une plantule complète.

E. Les plantules sont mise en acclimatation en terre où elles reconstituent des plantes normales



Les différents stades de la micropropagation

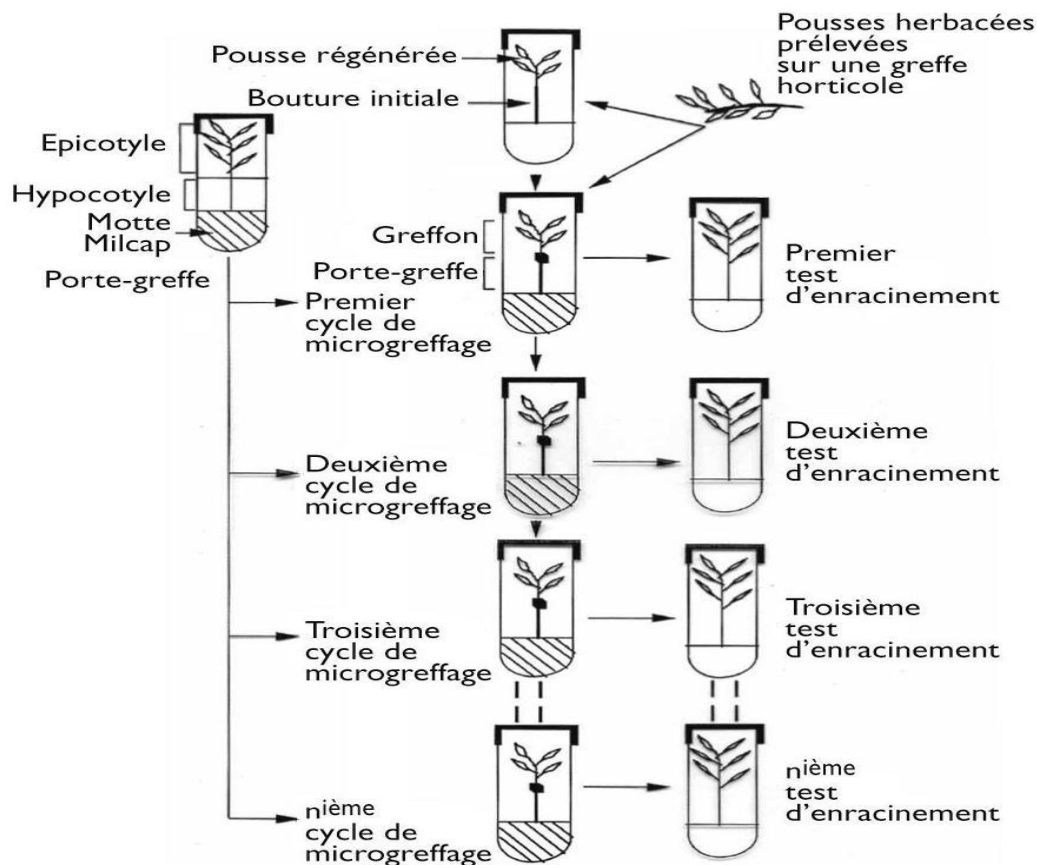




VI.6.2. Multiplication par bourgeonnement adventif exemple : le saintpaulia

Le terme "adventif" s'applique à la formation d'organes en un site inhabituel.

- L'explant est constitué d'un fragment d'organe, d'une portion de tissu, ou même de cellules isolées.
- Il est placé sur un milieu contenant des cytokinines. Soit des bourgeons sont néoformés directement à partir des cellules de l'explant initial (rare).
- Soit des cellules de l'explant initial se divisent rapidement et forment un cal primaire rattaché à l'explant de départ et qui donnera des bourgeons néoformés. C'est la phase de multiplication.
- Toutes les tiges obtenues dans les deux cas sont transférées sur un milieu enrichi en auxine qui va provoquer leur enracinement.
- Les plantules sont alors acclimatées en terre où elles reconstituent des plantes normales.



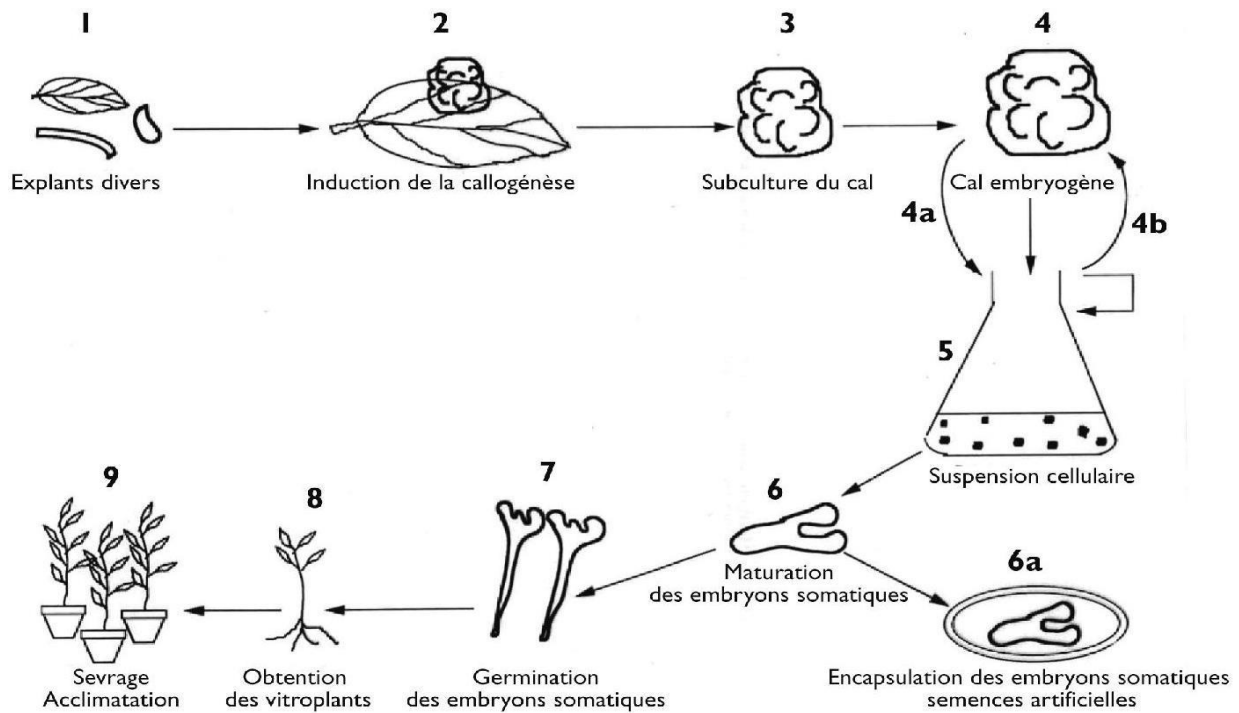
VI.6.3. Multiplication par embryogenèse somatique

Dans une graine, on trouve la future plante sous forme d'embryon (embryon zygotique) qui résulte de la reproduction sexuée. L'embryogenèse somatique consiste à provoquer l'apparition d'embryons à partir de tissus végétaux mis en culture in vitro. Elle apparaît le plus souvent dans les suspensions cellulaires, occasionnellement dans les cales, plus rarement directement sur les organes.

A. Sous certaines conditions, les cultures cellulaires s'organisent en nombreux petits massifs à structure bipolaire (avec un méristème de tige et un méristème de racine) nommés embryons somatiques.

B. Comme les embryons zygotiques (qui sont présents dans les graines), les embryons somatiques se développent, directement en plantules enracinées.

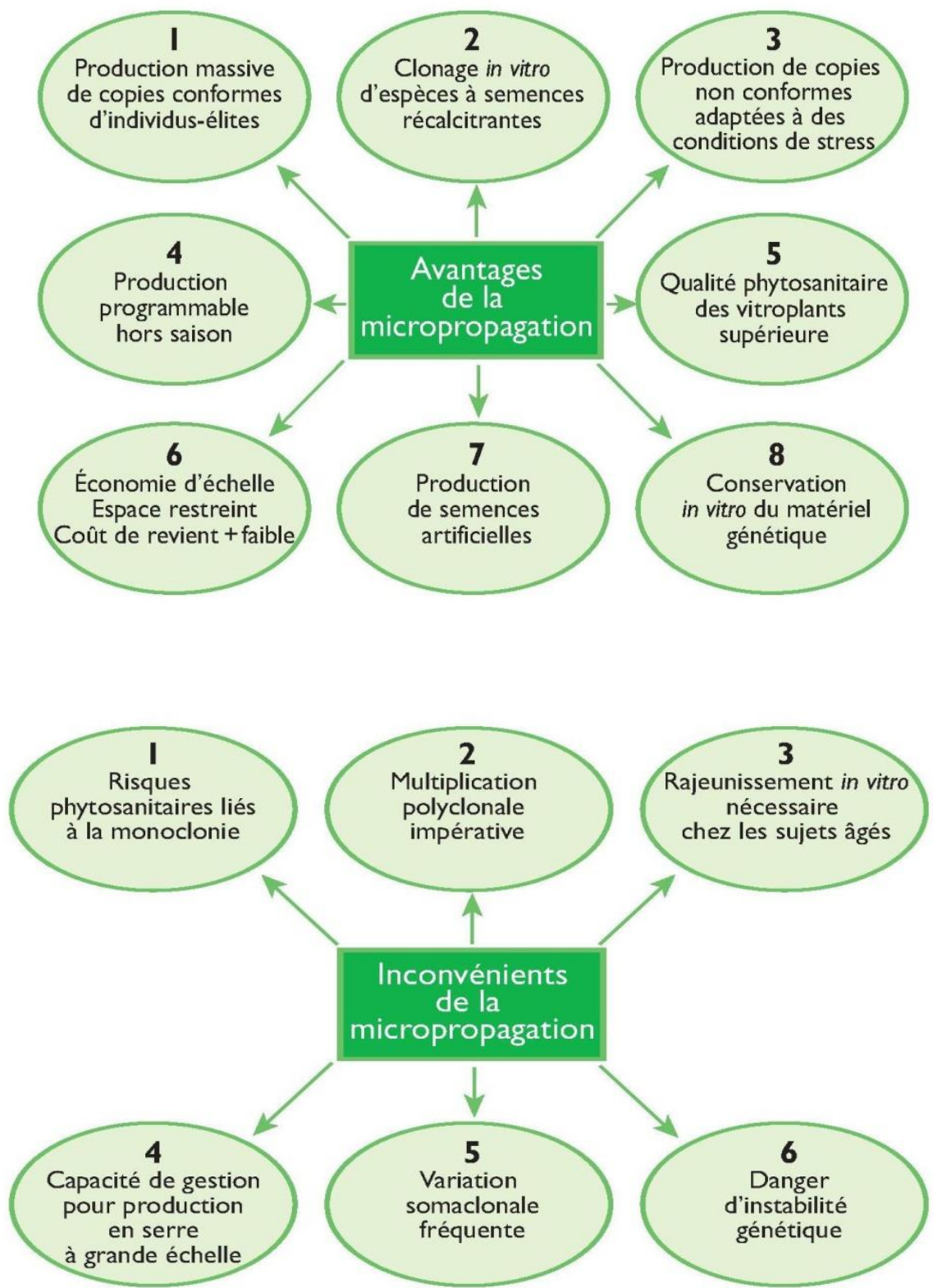
C. Des recherches actuelles tentent l'encapsulation des embryons somatiques, sans altérer leur viabilité, pour en faire des semences artificielles.



VI.7. Avantages de la culture in vitro

La culture in vitro permet :

- l'obtention de clones sélectionnés pour leur vigueur, leur caractères intéressants (Chrysanthème, Fraisier, Bananier), leur rareté (Orchidées) ;
- l'assainissement des végétaux (plantes sans virus) : la Pomme de terre ;
- la production rapide et en masse, à n'importe quel moment de l'année ;
- le raccourcissement des cycles de développement ;
- la diminution des coûts de production (peu de personnel) et des dépenses énergétiques (réduction des surfaces de culture et éclairage réduit) ;
- la facilité de stockage et conservation (au froid) de millions de plantes sur de très petites surfaces, à l'état sain et à l'abri des contaminations ;
- le rajeunissement d'un végétal ;
- la production de substances biochimiques intéressantes pour l'industrie, les secteurs



VI.8. Organismes producteurs de médicaments en système ouvert: les plantes transgéniques :

Les premières plantes transgéniques ont été obtenues dans les années 1980 (*La Recherche*, mai 1987). Les plantes cultivées les plus étudiées sont le tabac, la pomme de terre, le colza, les céréales (maïs, blé et riz), et les espèces potagères, en particulier la tomate, le melon et le concombre L.

Les deux applications concrètes les plus utilisées sont l'introduction de gènes de résistance pour la lutte contre les insectes nuisibles et l'insertion de gènes de tolérance aux herbicides pour la lutte contre les mauvaises herbes. Les travaux de recherche se sont multipliés pour la lutte contre les champignons et les virus, la tolérance à la sécheresse ou encore une meilleure utilisation de l'azote... La transgénèse est utilisée quand les solutions agronomiques ou la sélection classique n'apportent pas de réponses efficaces.

La bactérie *Bacillus thuringiensis* constitue un véritable réservoir de gènes de résistance aux insectes. En effet, les différentes souches de cette bactérie du sol recèlent plusieurs protéines insecticides ayant différents modes d'action, et affectant uniquement certains insectes. Chacune de ces protéines est codée par un seul gène, c'est donc un caractère facilement transférable par génie génétique. Plusieurs équipes ont obtenu des tabacs, des pommes de terre, des cotons, des tomates, des maïs résistants à des insectes grâce à cette source de gènes.

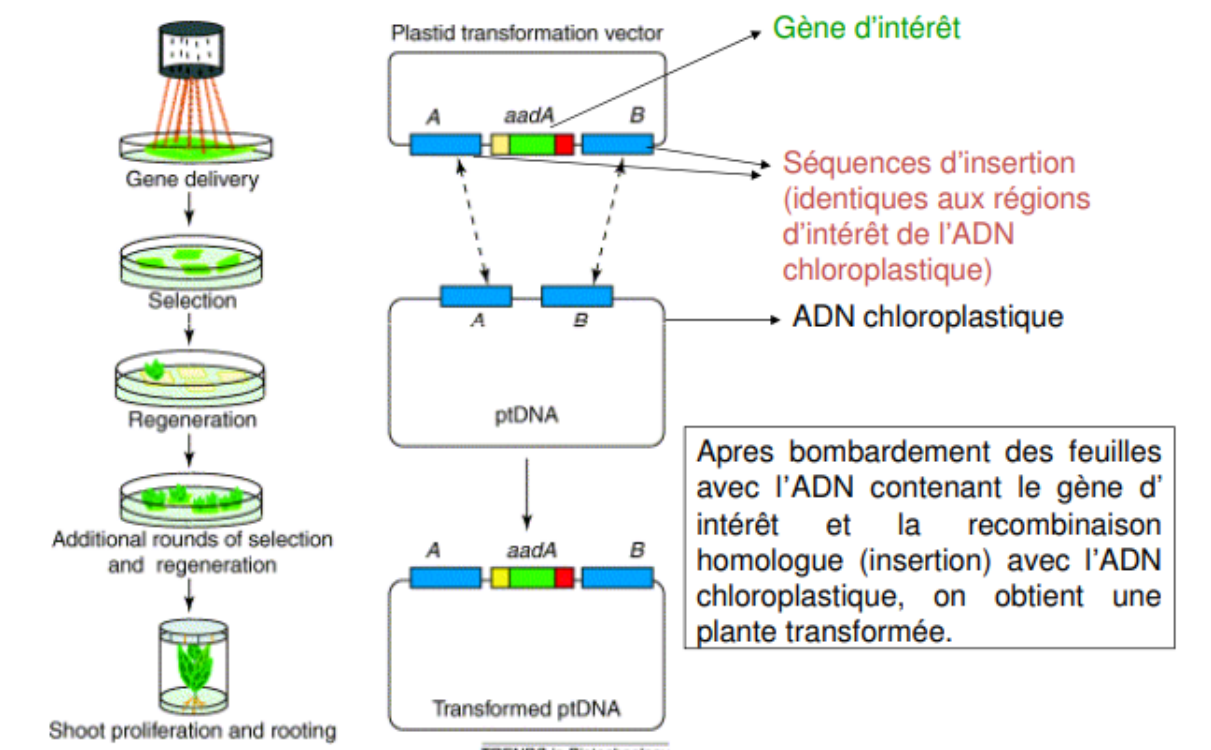
Dans le cas du maïs, la résistance à la pyrale est conférée par le gène *Cry A*, appelé communément *Bt*. Ce gène permet la production dans les cellules de maïs d'une protéine qui fonctionne comme une toxine létale dans le tube digestif de la pyrale car celui-ci contient des récepteurs spécifiques à sa surface. Chez les autres animaux et chez l'homme qui ne possèdent pas ces récepteurs, cette protéine est simplement digérée sans aucun effet toxique.

Autre exemple d'application de la résistance à un virus : des chercheurs de l'Institut de recherche publique brésilien (EMBRAPA) ont travaillé dix ans pour obtenir un haricot génétiquement transformé résistant au virus de la mosaïque et autorisé à la culture par la commission technique de biosécurité brésilienne en 2011.

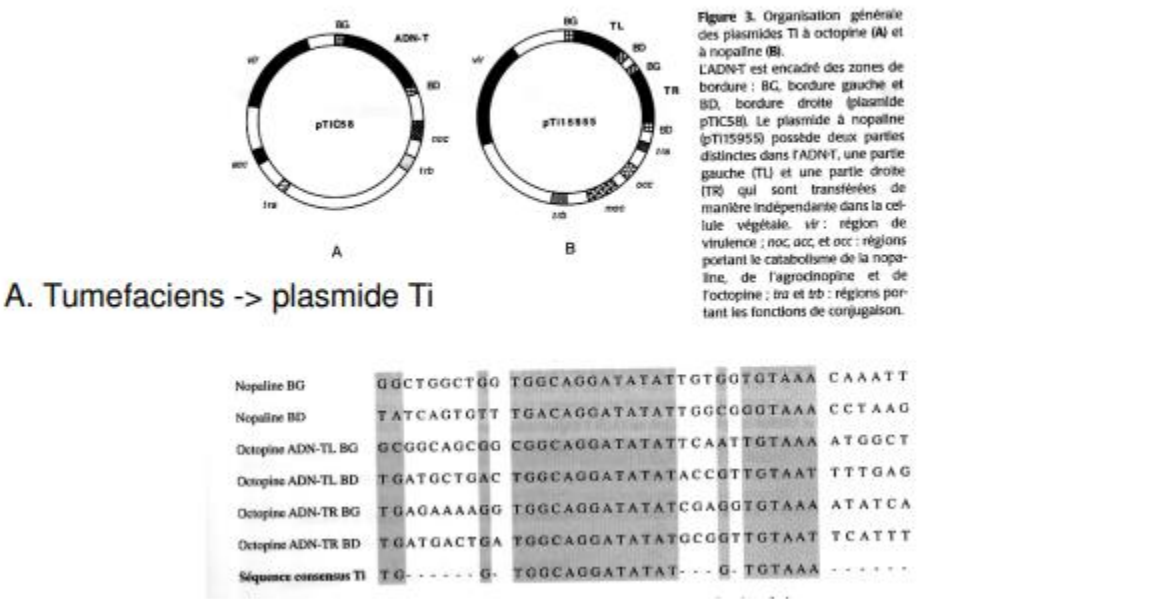
La technique de modification sur le haricot est celle de l'interférence par ARN. Elle repose sur l'insertion de petites séquences d'acide ribonucléique (ARNsi) qui reconnaissent et détruisent l'ARN messager responsable de la production de la protéine que l'on veut éliminer. Ainsi la protéine n'est plus produite et l'effet est le même que si le gène était silencieux.

Le glufosinate et le glyphosate sont deux principes actifs d'herbicides totaux qui détruisent aussi bien les mauvaises herbes que les plantes cultivées. Les gènes de tolérance à l'herbicide introduits dans une plante empêchent la matière active d'agir sur celle-ci, transformant l'herbicide total en herbicide sélectif pour cette plante. Ainsi l'herbicide détruit toutes les mauvaises herbes en laissant la plante cultivée poursuivre son développement. Ces principes actifs sont connus pour être moins rémanents. De nombreuses plantes transgéniques ont été développées pour obtenir une tolérance à ces herbicides. Il s'agit de variétés de betterave, colza, coton, maïs, pomme de terre et de soja.

Technique de transformation du chloroplaste

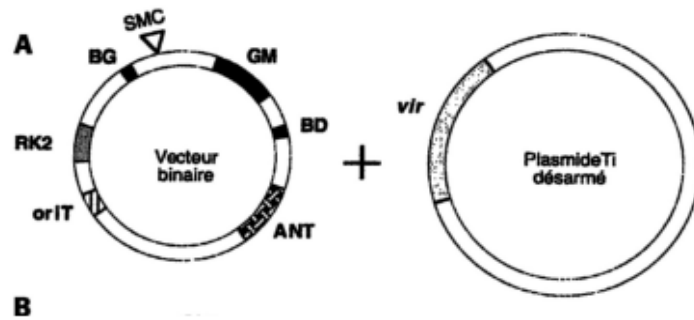


Les agrobactéries hébergent de très grands plasmides nécessaires à La formation des tumeurs/chevelu racinaires



Modification des plasmides Ti pour transférer des gènes

- délétion des gènes responsables de la croissance tumorale
- Délétion des gènes de synthèse d'opine
- Addition d'un gène sélectionnable (résistance aux antibiotiques ou herbicides)
- Séparation en deux plasmides -> système binaire



Conclusion générale

La biotechnologie est une branche moderne de la science. Elle a connu une évolution spectaculaire au cours des 50 dernières années mais son avenir semble plus fascinant encore. En fait, de nombreux scientifiques disent que nous sommes face à une révolution biotechnologique, comparable à la révolution informatique que nous avons connues ces dernières décennies. Les inventions et les applications existantes ne semblent que les premières étapes de cette évolution.

Connaissant ses nombreuses applications et les perspectives qu'elle offre, la biotechnologie remplit plusieurs missions :

- Elle participe à l'amélioration des conditions de vie des individus et des populations ;
- Elle joue un rôle déterminant sur la **sécurité alimentaire** régionale et mondiale ;
- Elle encourage les idées nouvelles et les expérimentations dans le domaine de l'**écologie**, surtout l'exploitation des nombreuses vertus de la nature **végétale** et de l'**enzymologie** ;
- Elle doit être toujours dirigée pour les bienfaits de l'humanité et de la planète dans son ensemble, y compris les biodiversités animales et **végétales**.

D'un point de vue global, les missions et objectifs de la biotechnologie s'alignent avec les trois principes fondamentaux de l'éthique de la recherche que sont la bienfaisance, la justice et le respect de la personne. Les biotechnologies cherchent en priorité le bien-être et la **santé** de l'Homme. Pour cela, elles font appel à des techniques basées sur la **biologie végétale**, la **biologie médicale**, la **biologie santé** et la **biologie cellulaire et moléculaire**.

La biotechnologie est définie comme l'application de la science et de la technologie à des organismes vivants, de même qu'à ses composantes, produits et modélisations, pour modifier des matériaux vivants ou non-vivants aux fins de la production de connaissances, de biens et de services » (OCDE). Au cours de la dernière décennie, les progrès de la biotechnologie se sont accélérés rapidement. Il s'agit d'une discipline scientifique complexe et exigeante – une discipline qui est dominée par des entreprises innovantes et performantes

Les biotechnologies industrielles font partie des technologies essentielles pour le développement économique de demain. Elles consistent à mettre à profit la biotechnologie pour assurer la production et la transformation éco-efficientes de produits chimiques, de matières et de bioénergie. Les biotechnologies industrielles exploitent les extraordinaires propriétés des micro-organismes et des enzymes, ainsi que leur diversité, leur efficacité et leur spécificité, pour fabriquer des produits dans des secteurs tels que la chimie, l'alimentation humaine et animale, les pâtes et papiers, le textile, l'automobile, l'électronique et, surtout, l'énergie.

L'engouement pour les biotechnologies industrielles fait écho, dans une large mesure, aux grands défis mondiaux du changement climatique et de la sécurité énergétique. Cependant, de nombreux obstacles freinent encore la croissance de ces technologies et empêchent les différents secteurs de l'industrie d'en tirer le meilleur profit. Grâce au développement rapide de la recherche biologique les obstacles techniques ne sont pas aussi insurmontables qu'auparavant : les progrès du séquençage de l'ADN, les avancées de la protéomique et l'émergence de la biologie de synthèse contribuent au développement sans précédent des sciences biologiques. Concernant les autres secteurs, les procédés biotechnologiques sont utilisés dans la protection de l'environnement depuis très longtemps, bien avant l'invention du terme biotechnologie, les micro-organismes et notamment les bactéries pouvant posséder des capacités étonnantes de traitement.

Les biotechnologies pharmaceutiques, en ayant favorisé l'identification et la validation de cibles diagnostiques et thérapeutiques ainsi que le développement de thérapies ciblées, offrent donc la possibilité de personnaliser la prise en charge des patients. Cependant, ce nouveau paradigme fait face à la complexité des pathologies, à la multiplication des paramètres individuels et à la nécessité d'une certaine standardisation inhérente au développement des thérapies et à leur évaluation clinique. Plutôt qu'une approche individualisée, personnalisée, de chaque patient, le meilleur compromis résiderait donc dans le découpage de la population par groupe ou strate suffisamment fine. Dans cette vision, les progrès récents et à venir des biotechnologies pharmaceutiques offrent des perspectives réjouissantes.

Les biotechnologies vertes ambitionnent notamment d'améliorer le bien-être de la population mondiale à travers un accroissement soutenu des rendements agricoles, la réduction de l'empreinte écologique des activités agraires, la protection de la santé des exploitants, et l'obtention de végétaux, alimentaires et industriels, de meilleure qualité.

Références Bibliographiques

Ahmad S., Ashraf SM., Sharmin E., Zafar F., Hasnat A. (2002). Studies on ambient cured polyurethane modified epoxy coatings synthesized from a sustainable resource. *Prog. Cryst. Growth Character. Mater.* 45 (1), p. 83–88.

Akiyama M., Tsuge T., Doi Y. (2003). Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polym. Degrad. Stab.* 80, p. 183–194.

Asrar, Gruys KJ. (2002). Biodegradable Polymer (Biopol), In Doi Y., Steinbüchel A. (ed). *Biopolymers. Vol. 4, Polyesters III.*

Applications and Commercial Products. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p 53–81.

Auras R., Harte B., Selke S. (2004). An overview of polylactides as Packaging Materials. *Macromol. Biosci.* 4, p. 835–864.

Bastioli C. (1998). Properties and applications of Mater-Bi starch based materials. *Polym. Degrad. Stab.* 59, p. 263–272.

Briassoulis D. Aristopoulou A., Bonora M., Verlodt I. (2004). Degradation characterisation of Agricultural Low-density

Polyethylene Films. *Biosystems Eng.* 88 (2), p. 131–143. Chakar F., Ragauskas AJ. (2004). Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Ind. Crop Prod.* 20, p. 131–141.

Chandra R., Rustgi R. (1998). Biodegradable polymers, *Prog. Polym. Sci.* 23, p. 1273–1335.

Chen SC., Lu Y. (2004). Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 56, p. 1621–1633.

Chen GQ., Wu Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 26, p. 6565–6578.

Chiellini E., Chiellini F., Cinelli P., Ilieva VI. (2003). Bio-based polymeric materials for agriculture applications. In Chiellini E.,

Solaro R. *Biodegradable polymers and plastics.* New-York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 185–220.

Davis G. (2003). Characterization and characteristics of degradable polymer sacks. *Mater. Charact.* 51, p. 147–157.

Davis G., Song JH. (2006). Biodegradable packaging based on raw materials from crop and their impact on waste management. *Ind. Crop Prod.* 23 (2), p. 147–161.

De Wilde B. (2003 a). *Compostable packaging - a potential or a threat for compost?* Gent, Belgium: Organic Waste Systems.

De Wilde B. (2003b). Plastiques biodégradables : emballages compostables, point de la situation. Pack News 154.

Dierckx S., Dewettinck K. (2002). Seed gums. In Vandamme EJ., De Baets S., Steinbüchel A. (eds.). Biopolymers, vol. 6.

Polysaccharides II. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 321–343.

Gattin R., Copinet A., Bertrand C., Couturier Y. (2001). Comparative biodegradable on study of starch-and polylactic acid-based materials. J. Polym. Environ. 9 (1), p. 11–17.

Gross Richard A., Kalra Bharu (2002). Biodegradable polymers for the environment. Science 297, p. 803–807.

Gu JD. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. Int. Biodeter. Biodegr. 52, p. 69–91.

Hasirci V., Lewandrowski K., Gresser JD., Wise DL., Trantolo DJ. (2001). Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. J. Biotechnol. 86, p. 135–150.

Klauss M., Bidlingmaier W. (2004). Pilot scale field test for compostable packaging materials in the city of Kassel, Germany. Waste Manage. 24, p. 43–51.

Klemm D., Schmauder HP., Heinze T. (2002). Cellulose. In Vandamme EJ., De Baets S., Steinbüchel A. (ed.). Biopolymers, vol. 6. Polysaccharides II. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 275–319.

Kumar R., Choudhary V., Mishra S., Varma IK., Mattiason B. (2002). Adhesives and plastics based on soy protein products. Ind. Crop Prod. 16, p. 155–172.

Liu JW., Zhao Q., Wan CX. (2001). Research progresses on degradation mechanism in vivo and medical applications of polylactic acid. Space Med. Eng. 14 (4), p. 308–312.

Liu X., Sun Q., Wang H., Zhang L., Wang JY. (2005). Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. Biomaterials 26, p. 109–115.

Lorcks J. (1998). Properties and applications of compostable starch-based plastic material. Polym. Degrad. Stab. 59, p. 245–249.

Lunt J. (1998). Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. Polym. Degrad. Stab. 59, p. 145–142.

Martin DP., Williams SF. (2003). Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. Biochem. Eng. J. 16, p. 97–105.

Masahiko O. (2002). Chemical syntheses of biodegradable polymers. Prog. Polym. Sci., p. 87–133.

Mazollier C., Taullet A. (2003). Paillages et ficelles biodégradables: une alternative pour le maraîchage bio. Alter Agri 59, p. 10–13.

Mecking S. (2004). Nature or petrochemistry? Biologically degradable materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, p. 1078–1085.

Middleton JC., Tipton AJ. (1998). Synthetic biodegradable polymers as medical devices. *Med. Plast. Biomater. Mag.* March 1998, p. 30–39.

Okada M. (2002). Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* 27, p. 87–133.

Onar N., Pamukkale (2005). Usage of biopolymers in medical applications, available on <http://www.ft.vslib.cz/indoczech-conference/conference-proceedings/>

Paster M., Pellegrino JL., Carole TM. (2003). Industrial bioproducts: today and tomorrow. Report prepared for the US Department of Energy, Washington, DC.

Petersen K., Vaeggemose Nielsen P., Bertelsen G., Lawther M., Olsen MB., Nilsson NH., Mortensen G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Sci. Technol.* 10, p. 52–68.

Pillai O., Panchagnula (2001). Polymers in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, p. 447–451.

Plastics Europe (Association of Plastics Manufacturers in Europe) (2001). Biodegradable plastics. Position.

Plastics Europe (Association of Plastics Manufacturers in Europe) (2004). Plastics in Europe. An analysis of plastics consumption and Recovery in Europe.

Ralet MC., Bonnin E., Thibault JF. (2002). Pectins. In Vandamme EJ., De Baets S., Steinbüchel A. (eds.). *Biopolymers*, vol. 6.

Polysaccharides II. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 345–380.

Reddy CS., Ghai R., Rashmi, Kalia VC. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour. Technol.* 87, p. 137–146.

Reddy N., Yang Y. (2005). Biofibers from Agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* 23 (1), p. 22–27.

Ruan W., Chen J., Lun S. (2003). Production of biodegradable polymer by *A. eutrophus* using volatile fatty acids from acidified waste water. *Process Biochem.* 39 (3), p. 295–299.

Rutot D., Dubois P. (2004). Les (bio)polymères biodégradables : l'enjeu de demain ? *Chim. Nouv.* 86, p. 66–75.

Schroeter J. (1997). Creating the framework for a widespread use of biodegradable polymers (standardization, labelling, legislation, biowaste management). *Polym. Degrad. Stab.* 59, p. 377–381. Scott G. (2000). « Green » Polymers. *Polym. Degrad. Stab.* 68, p. 1–7.

Shih IL., Shen MH., Van YT. (2006). Microbial synthesis of poly-L-lysine and its various applications. *Bioresour. Technol.* 97 (9), p. 1148–1159.

Shimao M. (2001). Biodegradation of plastics. *Biotechnology* 12, p. 242–247. Södergard A., Stolt M. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog. Polym. Sci.* 27, p. 1123–1163.

Steiner PR. (1994). Biobased, biodegradable geotextiles USDA forest service research update. In *Proceedings of the 2 nd Pacific Rim bio-based composites symposium*, nov 6-9 Vancouver, Canada

Stevens ES. (2002). What makes green plastics green? *Biocycle*, march 2003, p. 24–27.

Tester RF., Karkalas J. (2002). Starch. In Vandamme EJ., De Baets S., Steinbüchel A. (eds) *Biopolymers. Vol. 6. Polysaccharides II*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 381–438.

Tharanathan RN. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends Food Sci. Technol.* 14, p. 71–78.

Tsuji H. (2002). Polylactides. In Doi Y., Steinbüchel A. (eds.). *Biopolymers. Vol. 4. Polyesters III, Applications and Commercial Products*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 129–177.

Van Dam JEG., de Klerk-Engels B., Struik PC, Rabbinge R. (2005). Securing renewable resource supplies for changing market demands in a bio-based economy. *Ind. Crop Prod.* 21, p. 129–144.

Van de Velde K., Kiekens P. (2002). Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polym. Test.* 21, p. 433–442.

Vert M. (2002). Polymères de fermentation. Les polyacides lactiques et leurs précurseurs, les acides lactiques. *Actual. Chim.* 11-12, p. 79–82.

Vink ETH., Rabago KR., Glassner DA., Springs B., O'Connor RP., Kolstad J., Gruber PR. (2004). The sustainability of

natureworks TM polylactide polymers and ingeo TM polylactides fibers: an update of the future. *Macromol. Biosci.* 4, p. 551–564.

Warwel S., Bruse F., Demes C., Kunz M., Klaas MRG. (2001). Polymers and surfactants on the basis of renewable resources. *Chemosphere* 43, p. 39–48.

Williams S., Martin D. (2002). Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In Doi Y., Steinbüchel A. (eds.). *Biopolymers. Vol. 4. Polyesters III, Applications and Commercial Products*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 91–127.

Xiu-LI W., Yang K., Wang YZ. (2003). Properties of Starch blends with biodegradable Polymers. *J. Macromol. Sci., Part C – Polymer Reviews* 43 (3), p. 385–409.