

Chapitre II: production des organismes unicellulaires (POU)

Introduction

Les micro-organismes sont utilisés pour leurs cellules elles-mêmes ou pour les produits extraits de ces cellules. Les **probiotiques** (pro: pour, biotique: la vie) sont des bactéries ou des levures aident à la digestion ou à la défense immunitaire. Certains probiotiques peuvent être pris sous forme de compléments alimentaires. Les plus connus sont les levures de bière ou encore les bactéries lactiques que l'on trouve dans les yaourts. Lorsqu'ils sont absorbés, ils apportent des effets bénéfiques pour la santé, comme l'amélioration de la digestion, lutter contre la diarrhée ou certaines infections de système digestif.

2.1. Productions des levures

Les levures destinées à la production de cellules sont cultivées dans de grands fermenteurs aérés des milieux à base de mélasses qui contiennent une grande quantité de sucres comme une source de carbone et d'énergie, ainsi que des minéraux, des vitamines et des acides aminés nécessaires à leur croissance. Pour compléter le milieu, on ajoute une source de phosphore (l'acide phosphorique) et une source d'azote et de soufre (le sulfate d'ammonium).

Pour atteindre des volumes de fermenteurs allant de 40000 à 200000 litres.

2.1.1. Les étapes de la production des levures

Plusieurs étapes intermédiaires de mise à l'échelle sont nécessaires.

- A partir de la souche pure reçue du laboratoire, la levure est d'abordensemencée en tubes et ballons pour préparer l'inoculum, source biologique de la production industrielle.
- L'inoculum est destiné à être propagé dans des fermenteurs de tailles croissantes. Depuis le tube à essais initial jusqu'à la phase finale en fermenteur commercial.
- Chaque fermenteur estensemencé par de la levure, avec des apports précis de mélasse, de sels nutritifs et d'air, et des contrôles stricts de température et de pH pour assurer le bon développement et le bon équilibre de la cellule. La fermentation commerciale dure environ 16 heures.
- En fin de croissance, le milieu de culture est éliminé par fermentation et les cellules lavées à l'eau et recentrifugées, jusqu'à ce qu'elles soient de couleur claire.

➤ On fabrique les cubes de levure humide compressée en ajoutant à la levure de l'agent émulsifiant, de l'amidon et d'autres additifs pour lui donner la consistance et la durée de vie souhaitée.

➤ La levure vendue à l'état sec l'est souvent sous dénomination de levure sèche active. Après mélange avec les additifs, les cellules lavées de levure sont séchées sous vide jusqu'à 8 % d'humidité, puis emballées en sachets. La levure sèche n'a pas un bon pouvoir levant en boulangerie que la levure fraîche, mais elle a une durée de vie plus longue.

➤ La levure diététique, vendus comme complément alimentaire, est stérilisée et en général sèche à l'air. Elle est riche en vitamine B et en protéines, mais est carencés en acides aminés soufrés. Elle peut être par exemple ajoutée à la farine de blé ou maïs pour en augmenter la valeur nutritionnelle.

2.2 Production des bactéries

Les probiotiques sont généralement des bactéries lactiques, Gram (+), qui nécessitent des milieux de culture riches. L'optimisation des conditions de fermentation des souches doit obtenir une grande quantité de biomasse avec une viabilité élevée, et de maintenir la survie lors du séchage et de la conservation à l'état sec. A l'échelle industrielle, l'optimisation des conditions de croissance représente une étape importante du procédé de production. Tout d'abord, le choix des composants du milieu de culture doit répondre aux besoins nutritionnels des micro-organismes, à des critères réglementaires et à des critères économiques (**Tab. 1**). Les meilleures conditions de croissance pour la production par exemple la bactérie de *L. acidophilus* sont de 40 g/L de glucose, 20 g/L de peptone, 20 g/L d'extraits de levure, 5 g/L de sodium acétate, 3 g/L de sodium citrate (pH=6,0 et T=30 °C). Des substances prébiotiques comme le fructose ou l'oligofructose peuvent également être ajoutées.

Tableau 1. Principaux ingrédients entrant dans la composition des milieux de production des bactéries lactiques

Ingrédients	Rôle des composants
-Monosaccharides ; Disaccharides -Lactosérum et lait écrémé.	Source de carbone
-Hydrolysats protéique de lactosérum - hydrolysats de caséine ; -extrait de levure et -Peptones d'origine animale ou végétale (soja).	Source d'azote
Acide ascorbique	Vitamines et facteurs de croissance

Ca ⁺² ; Mg ⁺² ; Mn ⁺² ; Fe	Sels minéraux
K ⁺ Na ⁺ NH ₄	Sels à pouvoir tampon
Monoglycérides acétylés	Antimousses

Lors de la production industrielle, la fermentation est réalisée en culture fermée (batch) ou Fed-batch. Malgré, la fermentation continue donne généralement de meilleurs rendements mais elle engendre des risques de contamination et peut conduire à une perte des caractéristiques de la souche au cours du temps. La biomasse est récupérée par centrifugation. Elle se présente sous forme de «pâte bactérienne très concentrée », qu'il s'agit alors de sécher avec grande précaution afin de maintenir un maximum de bactéries en vie.

2.4. L'application des microorganismes dans l'industrie

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 (**Fig. 1**).

2.4.1. Industrie 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.

2.4.2. Industrie alimentaire

- L'utilisation des microorganismes est résumée pour la fabrication du pain, des fromages, de la bière et du vin par fermentation.
- Les protéines d'organismes unicellulaires (POU) constituent un type de produits occupant une place importante sur le marché des produits alimentaires

issus des biotechnologies. Elles sont obtenues par culture de micro-organismes sur des substrats de matière organique.

- Les sirops à haute teneur en fructose qui constituent l'essentiel des produits de ce marché (environ 92 %). Ils sont produits à partir de l'amidon du maïs.
- Les acides aminés (lysine et acide glutamique surtout) et les acides organiques (citrique, lactique et itaconique) sont utilisés principalement comme additifs dans l'alimentation.

2.4.3. 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 butanédiol, les acides organiques, les biodétergents, les huiles et les graisses...

2.4.4. L'agriculture :

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

2.4.5. 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 phénoliques et chloriques,...) 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.

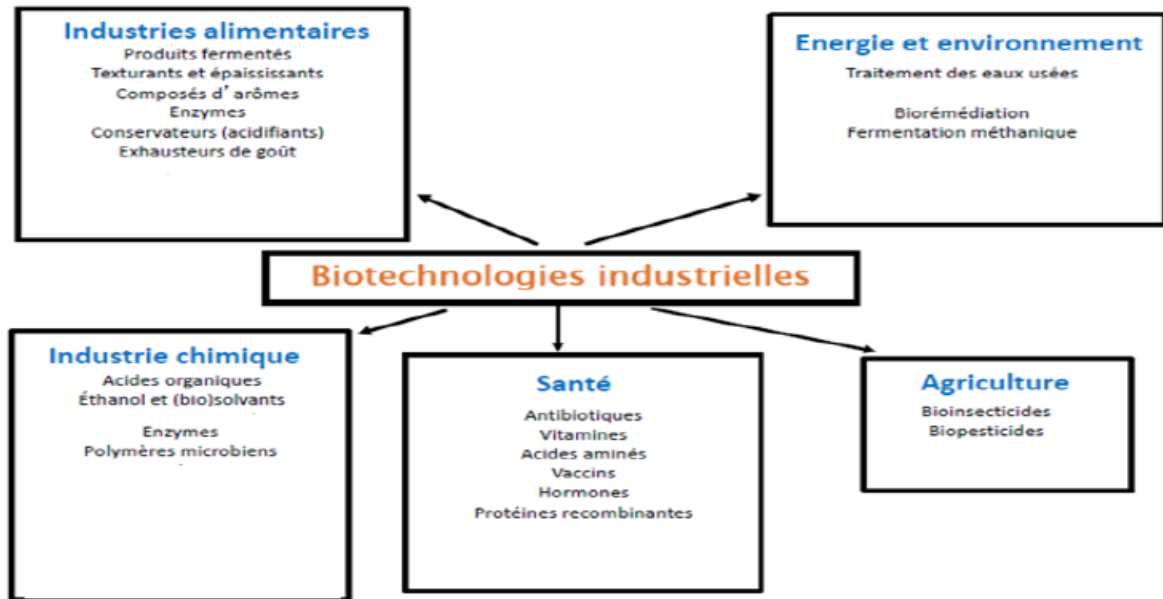


Figure 1. Applications industrielles des microorganismes.

Chapitre III : Production industrielle des enzymes microbiennes

3.1. Définition

Une enzyme est une protéine possédant de propriétés catalytiques. Pratiquement toutes les biomolécules capables de catalyser des réactions chimiques dans les cellules sont des enzymes.

3.2 Méthodes de production d'enzymes

On distingue les enzymes d'extraction (à partir d'organismes végétaux ou animaux) ou les enzymes de fermentation (microorganismes).

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.

3.3 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.
- Les microorganismes utilisés pour la production d'enzymes peuvent être des eucaryotes tels que les levures et les champignons, ou des procaryotes tels que les gram-positifs ou les gram-négatifs.

3.4. L'avantage de la production des enzymes par les microorganismes

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

3.4.1. Caractéristiques recherchées dans une souche produisant une enzyme industrielle

Ces caractéristiques consistent en :

- 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,
- La souche doit pouvoir se développer sur des substrats moins couteux.
- 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 :

*mutagenèse (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.

La fermentation en vue de produire une enzyme se fait à très grande échelle.

Quand l'enzyme est extracellulaire, on peut utiliser un fermenteur jusqu'à 450 m³. Dans le cas d'enzymes intracellulaires, la nécessité de traitements pour l'extraction impose une limite du volume jusqu'à 30 m³.

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

3.5. Milieux de la production des enzymes

Les milieux de productions ont soit des milieux synthétiques ou complexes. Les matières premières apportant les éléments nutritifs (énergie, carbone, azote, phosphore, soufre, vitamines...) (**Tab.2**).

Tableau 2. sources naturelles d'éléments nutritifs aux microorganismes

Milieus de production	Exemples
Source de carbone et d'énergie	Farine de céréales, farine de soja, amidon de maïs, de pomme de terre, les sous- produits tels le lactosérum et les mélasses
Source d'azote (organique)	Farine de poisson, gélatine, caséine, farine de soja, coton, maïs et arachide
Sels minéraux et substances de croissance exigées	Extrait de levure, huiles végétales, farine de graines

3.6. Le procédé de la fermentation

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

3.7. Induction de production

Les inducteurs doivent être présents dans les milieux de production (exemple: l'amidon pour l'amylase, l'urée pour l'uréase, le xylose pour la xylose isomérase). Certaines molécules agissent comme inducteurs à faible concentration et comme répresseur à fortes doses (exemple: cellobiose pour les cellulases). Un effet inducteur est très souvent démontré par des analogues de substrats (exemple: isopropyl-béta-D- thiogalactoside qui est l'analogue du lactose pour la β -galactosidase). Les coenzymes peuvent aussi avoir un effet inducteur (exemple: la thiamine augmente la production du pyruvate carboxylase).

3.8. Microorganismes producteurs des enzymes

Chaque microorganisme produit, généralement en petite quantité, un grand nombre d'enzymes impliquées dans des mécanismes cellulaires .Toutefois, quelques enzymes sont produites en beaucoup plus grande quantité par certains micro-organismes pour, par exemple, dégrader des différentes molécules complexes comme la cellulose, l'amidon ou les protéines.

Les enzymes ont une action spécifique sur certains composés. Elles permettent la transformation rapide et efficace de ceux-ci à des températures modérées.

Au cours des fermentations alimentaires, ce sont les multiples enzymes des cellules microbiennes qui provoquent les modifications complexes observées. Il est également possible de faire intervenir des enzymes seules, en l'absence de toute cellule vivante.

Ces enzymes jouent plusieurs rôles dans les productions alimentaires industrielles :

Faciliter le procédé de préparation (exemple : les jus de fruits ou de légumes sont plus faciles à filtrer après hydrolyse enzymatique des macromolécules en suspension)

Améliorer la texture (exemple : la formation de gel dans certains jus de fruits concentrés sucrés est évitée en hydrolysant la pectine naturelle par des pectinases)

Provoquer une insolubilisation de certaines molécules (exemple : l'utilisation de la présure bovine ou microbienne pour la coagulation de la caséine du lait dans la fabrication des fromages)

Clarifier et stabiliser certains liquides en vue de la conservation (exemple : l'emploi de cellulases et de pectinases permet de clarifier le vin et les jus de fruits)

Améliorer les qualités organoleptiques (exemple : l'ajout de lipases à certains fromages améliore leur saveur)

Augmenter le rendement (exemple : la saccharification du moût de céréales peut être amplifiée par l'addition d'amylases au cours de la préparation de la bière)

Améliorer la digestibilité (exemple : l'hydrolyse enzymatique du lactose du lait permet d'éviter les symptômes d'intolérance au lactose)

Permettre la production de nouveaux produits ou la mise au point de nouveaux procédés de fabrication (exemple : la valorisation du lactosérum, la préparation de sirops ou d'alcools à partir d'amidon de céréales ou de cellulose...)

Sauf quelques exceptions (comme la présure bovine utilisée dans les fromageries ou la papaïne extraite d'un fruit tropical et employée dans la préparation de la bière), les enzymes utilisées dans l'industrie alimentaire sont d'origine microbienne. En effet, les micro-organismes permettent une production abondante et rapide, sans contraintes saisonnières et leur arsenal enzymatique est très diversifié.

Grâce à la sélection et à la modification génétiques, on dispose aujourd'hui de souches microbiennes qui donnent un très bon rendement.

Parallèlement, la mise au point de techniques efficaces de production, d'extraction et de conservation des enzymes a permis une extension considérable de leur utilisation dans l'industrie alimentaire depuis les années 70.

3.9. Enzymes industrielles

3.9.1. Amylases

Action : (hydrolyse de l'amidon en sucres solubles)

Sources : *Aspergillus oryzae* (moisissure) *Bacillus subtilis* (bactérie)

Usages : Améliorer la fermentation (pain, bière)

Clarifier les jus de fruits et de légumes...

Les amylases (α -amylase, β -amylase, amyloglucosidase et α -glucosidase ou maltase) hydrolysent l'amidon en sucres solubles.

Elles peuvent être produites en quantité importante par des moisissures (comme *Aspergillus oryzae* et *A. niger*) et des bactéries (comme *Bacillus subtilis*).

Les amylases bactériennes, à l'inverse des amylases fongiques, sont thermorésistantes mais rapidement inactivées en pH acide.

Les principaux usages des amylases sont :

- Élimination de l'amidon dans les jus et les extraits de fruits, ce qui les clarifie et facilite leur filtration
- Conversion de l'amidon de céréales en sirops de sucres (tel le sirop de maïs).
- Accélération de la levée de la pâte à pain.
- Saccharification de l'amidon de céréales (en complément ou en remplacement des amylases du malt d'orge) avant la fermentation alcoolique durant la fabrication de la bière.

3.9.2. Invertase

Action : hydrolyse le saccharose en glucose et fructose

Sources : *Saccharomyces cerevisiae* (levure) ; *Candida utilis*

Usages : Réduire la cristallisation dans les sirops ; Produire du sucre inverti

L'invertase hydrolyse le saccharose (sucre de table) en glucose et fructose.

Son action donne un sirop plus fluide, qui a un plus grand pouvoir sucrant, une pression osmotique plus élevée et qui cristallise moins facilement que le saccharose.

Dans l'industrie, l'invertase est produite principalement par des levures:

Saccharomyces cerevisiae, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Kluyveromyces marxianus* et *Candida utilis*.

Le sucre inverti est utilisé en grande quantité pour la fabrication de confiseries, de gommes à mâcher et de pâtisseries.

3.9.3. Lactase (β -Galactosidase) (α -galactosidase)

Action : hydrolyse le lactose en glucose et galactose

Sources : *Aspergillus niger* (moisissure) *Kluyveromyces fragilis* (levure)

Candida

Usages : Faire disparaître le lactose dans les produits laitiers

La bêta-galactosidase hydrolyse le lactose en glucose et galactose.

Elle est produite par certaines levures et moisissures, comme *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae*.

L'enzyme peut être utilisée pour enlever le lactose du lait, ce qui le rend plus digeste pour les personnes souffrant d'intolérance au lactose.

Son action donne un lait plus sucré et plus soluble, ce qui est favorable pour la fabrication de lait en poudre, lait concentré, lait congelé et base de crème glacée.

On l'ajoute aussi au lait pour accélérer la fabrication du fromage frais.

Cette enzyme permet également la valorisation du lactosérum, un sous-produit de la fabrication du fromage, en transformant ce produit riche en lactose en un liquide plus sucré utilisé en confiserie ou comme substrat pour la culture de levures.

L'alpha-galactosidase est une enzyme qui hydrolyse les glucides complexes ou oligosaccharides (raffinose, stachyose et verbascose) contenus dans plusieurs légumes (fèves, haricots, pois, soja, choux...) en sucres simples facilement assimilables.

Ces oligosaccharides, qui ne sont pas digérés par nos sucs digestifs mais fermentes par la flore intestinale, sont à l'origine de problèmes de flatulence.

L'addition d'une petite quantité d'enzyme α -galactosidase aux mets incriminés, juste avant leur consommation, permet de digérer la plus grande partie des oligosaccharides qu'ils contiennent et prévient donc la flatulence.

Cette enzyme, produite par des moisissures, est maintenant commercialisée et offerte au grand public dans les pharmacies et les magasins de produits naturels.

3.9.4. Glucose isomérase

Action : conversion du glucose en fructose

Sources : *Streptomyces*, *Bacillus coagulans*, *Arthrobacter*

Usages : Produire du sirop de maïs à teneur élevée en fructose .La glucose isomérase convertit le glucose en fructose.

Cette enzyme est produite industriellement par différentes bactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* et *Actinoplanes*.

La glucose isomérase est surtout utilisée pour la fabrication de sirop de maïs riche en fructose.

Ce sirop est d'abord produit par l'action d'amylases sur l'amidon de maïs.

Le sirop glucose qui en résulte est ensuite traité avec le glucose isomérase, ce qui rend le sirop plus sucré (le fructose a un pouvoir sucrant supérieur à celui du glucose).

Il est très utilisé en confiserie et dans la préparation de boissons non alcoolisées.

3.9.5. Glucose oxydase

Action : transformation du glucose en acide gluconique

Sources : *Aspergillus niger*, *Penicillium*

Usages : Éliminer le glucose dans les œufs déshydratés

La glucose oxydase est produite par *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum* et d'autres moisissures semblables.

Cette enzyme catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique.

Une autre enzyme, la catalase (produite par *Aspergillus niger* ou *Micrococcus lysodeikticus*), est jointe à la préparation enzymatique pour décomposer le peroxyde d'hydrogène formé.

Cette préparation est employée principalement pour éliminer le glucose des blancs d'œuf ou des œufs entiers avant leur séchage, ce qui aide à prévenir leur brunissement, leur détérioration et améliore leurs propriétés moussantes.

3.9.6. Pectinases

Action :

hydrolyse de la pectine

Sources : *Aspergillus niger* (moisissure) ; *Rhizopus oryzae* ; *Penicillium*

Usages : Clarifie le jus de fruits et de légumes, Empêcher la gélification

Les pectinases produites par des moisissures (principalement *Aspergillus niger* et *Rhizopus oryzae*) permettent d'hydrolyser la pectine des fruits et d'éviter ainsi la formation de gel lorsque celui-ci est contre-indiqué (jus de fruits concentrés, par exemple).

Ces enzymes permettent la clarification des jus de fruits, du vinaigre et des sirops.

L'addition de pectinases dans des fruits écrasés aide à l'extraction du jus.

3.9.7. Cellulase

Action : hydrolyse de la cellulose en sucres

Sources : *Trichoderma viride* (moisissure) ; *Aspergillus niger* (moisissure)

Usages : Clarifier les jus de fruits ; Produire davantage de sucres fermentescibles

La cellulase permet de dégrader la cellulose en sucres solubles.

Elle est produite par différentes espèces de mycètes comme *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Stachybothrys atra*, etc. Cette enzyme permet de produire davantage de sucres fermentescibles dans le moût de brasserie. Elle aide également à clarifier les jus de fruits.

3.9.8.Lipases

Action : hydrolyse les lipides en acides gras et glycérides

Sources : *Saccharomycopsis lipolytica* (levure) ; *Aspergillus niger* (moisissure) *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus*, *Candida lipolytica*

Usages : Produire davantage de composés d'arômes dans les fromages et autres produits laitiers

Les lipases agissent sur les matières grasses en les hydrolysant en glycérides, acides gras et glycerol.

Elles sont produites par un grand nombre de levures et de moisissures comme *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida lipolytica*, *Torulopsis ernobii* et certaines bactéries du genre *Pseudomonas*.

Les lipases peuvent être utilisées pour améliorer la saveur des fromages, de la crème glacée, de la margarine, du beurre, de pâtisseries et d'autres produits.

Elles permettent également d'éliminer les graisses insolubles dans les préparations de poissons et de blancs d'œufs destinées à la déshydratation.

3.9.9.Enzymes protéolytiques (Proteases)

Action : hydrolyse des protéines en acides aminés

Sources : *Aspergillus oryzae* (moisissure) ; *Bacillus subtilis* (bactérie)

Usages : Améliorer la texture de la pâte à pain, Stabiliser la bière

Les proteases hydrolysent les protéines.

Chaque type d'enzymes brise les chaînes polypeptidiques à des endroits précis, libérant des peptides puis des acides aminés.

Les bactéries *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseus* et la moisissure *Aspergillus oryzae* sont les principales sources d'enzymes protéolytiques d'origine microbienne.

Les usages sont :

Amélioration de la texture de la pâte (action sur le gluten de la farine)

Attendrissement de la viande.

Clarification et stabilisation de différents liquides comme la bière (empêche la formation d'opacité durant le refroidissement).

Amélioration de la filtrabilité de certains liquides et de blancs d'œufs destinés à la déshydratation.

Production de protéines hydrolysées solubles.

3.9.10. Rennine (ou rennet)

Action : coagulation de la caséine du lait

Sources : *Mucor pusillus* (moisissure) ; *Mucor miehei* (moisissure) ; *Endothia parasitica*

Usages : Coaguler le lait pour la fabrication de fromages

D'autres proteases permettent la coagulation de la caséine du lait.

C'est le cas de la rennine fongique, qui peut remplacer la présure bovine pour la fabrication de fromages.

Les espèces utilisées actuellement pour cette production sont *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* et *Mucor pusillus*.

3.10. Préparation de l'inoculum

L'échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité élevée (**Fig. 2**). La préparation d'inoculum consiste à obtenir les organismes dans un état optimal qui est compatible avec l'inoculation dans les fermentateurs. L'objectif principal est généralement d'obtenir un niveau élevé de biomasse viable dans un état physiologique approprié pour l'utilisation comme inoculum. Une culture adéquate et un milieu de production sont essentiels pour fournir le bon environnement pour l'inoculum.

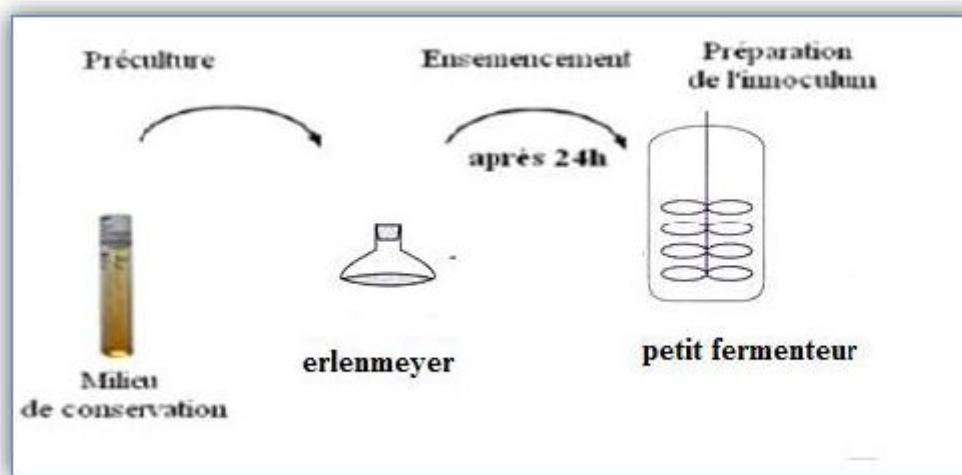


Figure 2. Les étapes de préparation d'inoculum.

3.11. Méthodes d'extraction et de purification des enzymes

L'enzyme souhaitée produite peut être excrétée dans le milieu de culture (enzymes extracellulaires) ou peut être présente dans les cellules (enzymes intracellulaires). Selon l'exigence, l'enzyme commerciale peut être brute ou très

purifiée. En outre, il peut être sous forme solide ou liquide. Les étapes impliquées dans le traitement en aval, c'est-à-dire que les étapes de récupération et de purification utilisées dépendront de la nature de l'enzyme et du degré de pureté souhaité.

3.11.1. Extraction

• Définition

Extraction désigne l'action de séparer une enzyme du composé dont elle fait partie. Cette méthode consiste à libérer l'enzyme de la cellule par éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire par des procédés physique ou chimique. En général, le rétablissement d'une enzyme extracellulaire présente dans le bouillon est relativement plus simple par rapport à une enzyme intracellulaire. Pour la libération d'enzymes intracellulaires, des techniques spéciales sont nécessaires pour la perturbation cellulaire. Les cellules microbiennes peuvent être décomposées par des moyens physiques (sonication, haute pression,) ou chimiques (solvants organiques). Les parois cellulaires des bactéries peuvent être lysées par l'enzyme lysozyme. Pour les levures, on utilise l'enzyme β -glucanase. Cependant, les méthodes enzymatiques coûtent cher.

3.11.2. Purification

• Définition

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

• Les étapes de la purification (séparation)

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

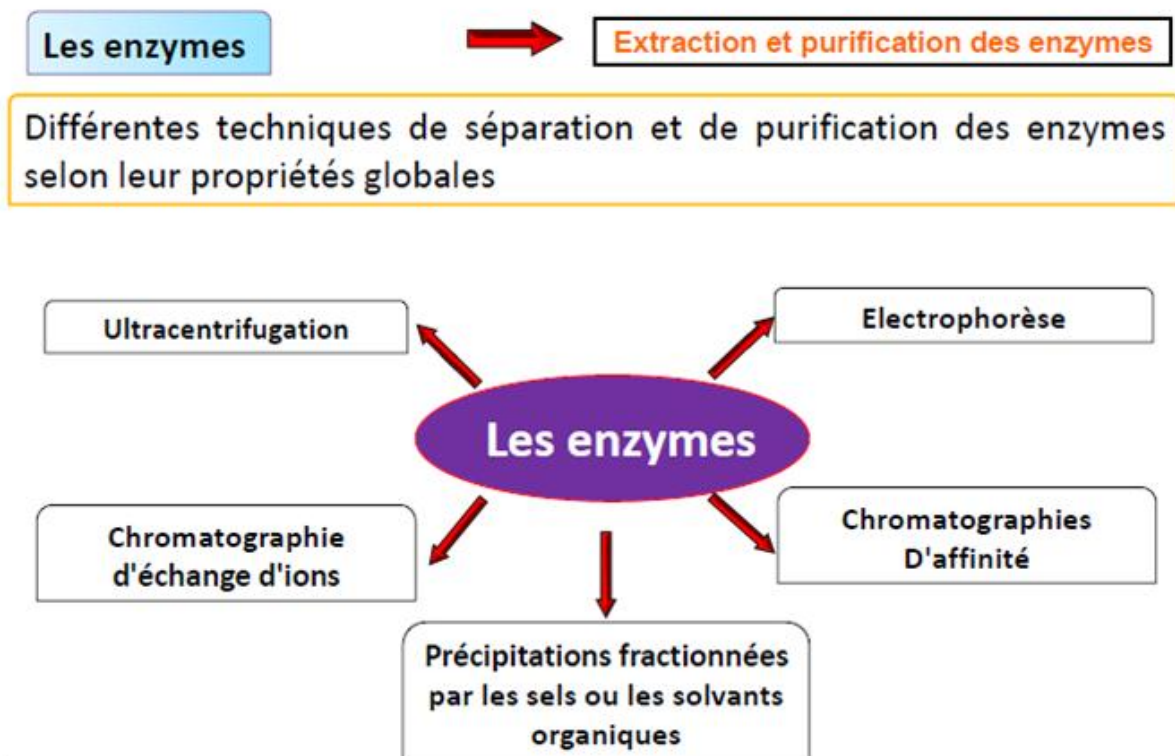
Enlèvement des débris cellulaires: La filtration ou la centrifugation peuvent être utilisées pour éliminer les débris cellulaires.

Enlèvement des acides nucléiques: Les acides nucléiques interfèrent avec la récupération et la purification des enzymes. Ils peuvent être précipités et éliminés en ajoutant des substances spécifiques comme les polyamines et la polyéthylèneimine.

Précipitation enzymatique: Les enzymes peuvent être précipitées en utilisant des sels (sulfate d'ammonium) ou solvants organiques (isopropanol, éthanol et

acétone). La précipitation est avantageuse puisque l'enzyme précipitée peut être dissoute dans un volume minimal pour concentrer l'enzyme.

Séparation par chromatographie: Il existe plusieurs techniques chromatographiques pour la séparation et la purification des enzymes. Ceux-ci comprennent l'échange d'ions, l'exclusion de taille, l'affinité et l'interaction hydrophobe. Parmi ceux-ci, la chromatographie d'échange d'ions est la plus couramment utilisée pour la purification enzymatique.



3.11.3. Conservation

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

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

Exemple :

L'invertase [β -fructofuranosidases (EC.3.2.1.26)] est une enzyme largement utilisée dans l'industrie des aliments et des boissons pour produire des bonbons, des chocolats, de l'acide lactique et du glycérol, etc....