

Stérilisation des milieux

Malgré l'intérêt des nombreux agents physiques stérilisants tels que les rayons X, les rayons β , les rayons ultra-violet ou les ondes ultrasons (Figure 1), ceux-ci n'ont pu être appliqués à la stérilisation des énormes volumes de liquides mis en œuvre dans les industries de fermentation.

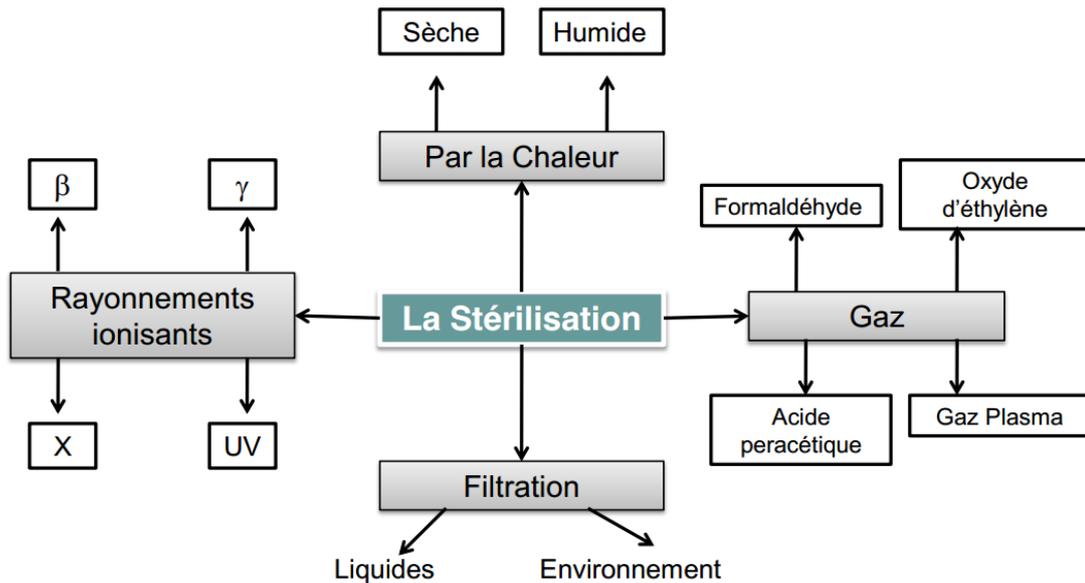


Figure 1: Différentes méthodes de stérilisation.

La stérilisation des fermenteurs vides par des agents chimiques gazeux est possible (β -propiolactone, oxyde d'éthylène), mais c'est la vapeur d'eau sous pression qu'est universellement employée pour la stérilisation des fermenteurs et des milieux de culture, parce que son utilisation est plus pratique et moins onéreuse.

Dans certaines fermentations, il est nécessaire de réaliser une asepsie rigoureuse (Tableau 1).

Tableau 1 : Production de tétracycline par *Streptomyces aureofaciens*

| <i>Conditions de fermentation</i> | <i>Rendement en fin de fermentation (mg de tétracycline /l)</i> |
|--|---|
| Asepsie totale | 1328 |
| Contamination par une souche de levure (<i>Candida utilis</i>) | 794 |

La stérilisation par la vapeur, malgré sa simplicité apparente, présente cependant certains inconvénients :

- dénaturation des protéines et inactivation de certaines enzymes ;
- destruction de certaines vitamines et de certains facteurs de croissance;
- surchauffage qui entraîne la polymérisation de certains composés ;
- caramélisation des sucres, oxydation des phénols et de l'acide ascorbique, polymérisation des aldéhydes insaturés, réaction de Maillard.

Les méthodes classiques de stérilisation par la vapeur peuvent se faire de deux manières :

1° En cuves, dans le fermenteur :

Celui-ci est chauffé, soit par injection de vapeur dans le milieu (il faut alors tenir compte du volume d'eau ainsi condensée sans la constitution finale du milieu de culture), soit par chauffage de la cuve et de son contenu portés à une température convenable par de la vapeur circulant dans un serpentin ou dans une double paroi.

2° Stérilisation continue :

Elle permet un gain de temps et une meilleure utilisation du milieu. Ainsi, dans le cas de la vitamine B₁₂, on obtient un rendement plus élevé (160%).

Le milieu passe dans un échangeur de température où il est porté instantanément à une température élevée, puis refroidi.

Les procédés de fermentation peuvent, en effet, être classés au point de vue des impératifs de stérilité, en deux groupes :

- ceux dans lesquels la pénétration d'une microflore étrangère dans le milieu ne présente pas trop d'inconvénients (production d'acides organiques, solvants organiques, levures, stéroïdes et nucléotides).
- ceux exigeant le maintien de conditions strictement aseptiques (production d'antibiotiques, vitamines B₁₂, vitamine B₂ et cellules animales).

Stérilisation de l'air

La stérilisation par filtration est plus adaptée pour l'air ou le gaz de fermentation et les solutions de composés thermolabiles tels que vitamines et enzymes ou encore les liquides peu chargés comme l'eau des milieux de culture. Cette filtration ne permet pas d'éliminer les particules virales et les bactériophages, qui peuvent être préjudiciables aux cultures cellulaires et microbiennes.

Il est d'usage d'utiliser des filtres dont les pores sont calibrés à $0,2 \mu m$ pour assurer une stérilité microbienne des fluides.

Extraction des produits désirés

Il y a un grand nombre de procédés. En effet, le produit désiré est souvent présent à faible concentration dans un milieu aqueux qui renferme à la fois des substances dissoutes et en suspension. Parfois même, ce qui complique le problème, il se trouve à l'intérieur des cellules qu'il faut faire éclater. Le milieu contient, au départ, des substances nutritives de bas poids moléculaire (oses et sels minéraux), et des produits complexes, sous forme de composés de haut poids moléculaire, voire de particules solides en suspension (farine de soja, corn steep liquor). En fin de culture, la teneur en substances nutritives est faible, tandis que les produits de fermentation se sont accumulés. Ils peuvent avoir un poids moléculaire bas (acide lactique, acide glutamique), moyen (antibiotiques), élevé (enzymes). Leur concentration peut être faible (quelques mg/l de vitamine B₁₂), moyenne, ou élevée (13% dans le cas de l'acide lactique). Quelques valeurs significatives sont données dans le tableau 2.

Tableau 2: Substances nutritives et produits de fermentation à l'échelle industrielle.

| <i>Composé</i> | <i>Poids moléculaire</i> | <i>Polarité</i> | <i>Concentration industrielle en g/l</i> |
|--------------------------|--------------------------|-----------------|--|
| Glucose | 180 | Non polaire | 50 |
| Sulfate d'ammonium | 132 | Forte | 2 |
| Urée | 60 | Faible | 5 |
| Phosphate monopotassique | 136 | Forte | 1 |
| Levure séchée | — | — | 5 |
| Farine de soja | — | — | 10 |
| α -Amylase | 48 900 | Faible | 20 |
| Vitamine B ₁₂ | 1 357 | Faible | 0,023 |
| Sulfate de streptomycine | 582 | Faible | 4 |
| Glutamate de sodium | 169 | Faible | 35 |
| Acide lactique | 90 | Faible | 130 |

Il y a, en outre, une grande quantité de cellules microbiennes. Les diverses phases de l'extraction sont représentées dans la figure 2.

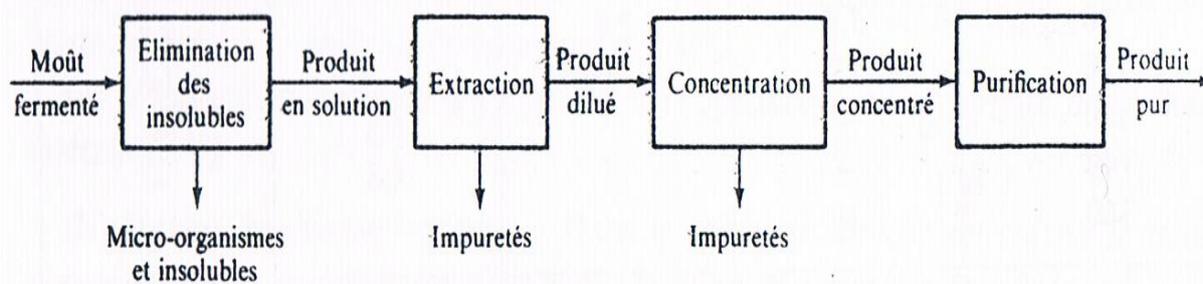


Figure 2 : Divers phases de l'extraction d'un produit de fermentation.

En premier lieu, on élimine les insolubles qui peuvent représenter plus de 10% du moût, constitués surtout par les micro-organismes. Ces derniers peuvent cependant représenter le produit intéressant (microbes aliments), ou contenir la substance recherchée si elle est endocellulaire.

Les méthodes utilisées peuvent être représentées dans la figure 3.

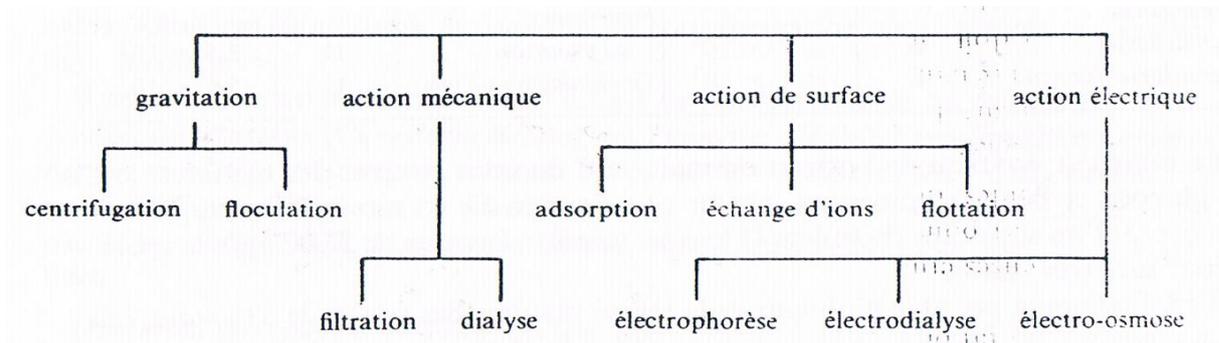


Figure 3: Principales méthodes utilisées pour éliminer les insolubles.