

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**  
**Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
Département de Biochimie



# **Support de cours**

**Production des biomolécules dans systèmes cellulaires  
eucaryotes et procaryotes**

**Niveau: 1<sup>ere</sup> année master biotechnologie et pathologie moléculaire**

**Dr. Djidel Saliha**

**FSNV-UFAS1 :2024**

# Sommaire

<b>Introduction</b>	1
<b>Chapitre 1: Microorganismes producteurs des biomolécules</b>	
1. Systèmes cellulaires procaryotes	2
1.1. Bactéries	2
1.2. Actinomycètes	4
2. Systèmes eucaryotes (Les champignons microscopiques).	5
2. 1. Levures	5
2. 2. Moisissures	7
<b>Chapitre 2. Bioréaction et paramètres de croissance</b>	
1. Milieux de culture	12
1.2. Types des milieux de culture	12
1.3. Composition du milieu de culture	16
1.4. Conditions de croissance (facteurs physico-chimique)	18
2. Paramètres de croissance	21
2.1. Test de croissance	22
2.2. Phases de croissance	23
3.2. Types de bioréacteurs	24
3.3. Techniques de culture en bioréacteur	25
<b>Chapitre 3. Biomolécules</b>	
1. Biomasse	27
2. Acides aminés	28
3. Acides organiques et alcools	30
4. Vitamines	34
5. Antibiotiques	35
6. Antiseptiques	37
7. Polysaccharides	41
8. Toxines	42
9. Enzymes	43
10. Hormones	45
11. Médiateurs chimiques	47
<b>References</b>	49

**Modules : la production des biomolécules par les cellules procaryotes et eucaryotes.**

**Master1 : spécialité de biotechnologie et pathologie moléculaire**

**Introduction**

Les biomolécules sont des molécules organiques naturellement présentes dans les organismes vivants. Elles constituent les composants structurels et fonctionnels de base des cellules vivantes. Les biomolécules peuvent être classées en petites molécules (lipides, phospholipides, glucides, sucres, vitamines et hormones), en monomères (acides aminés, nucléotides, monosaccharides) et en polymères (peptides, oligopeptides, polypeptides, protéines, acides nucléiques oligosaccharides, polysaccharides et lignine). Certaines des biomolécules importantes jouent un rôle dans le stockage de l'énergie, le métabolisme, les molécules précurseurs, les éléments constitutifs, les messagers et les catalyseurs. Les sources renouvelables importantes de biomolécules précieuses sont obtenues à partir de plantes, de microbes et d'algues. Elles sont utilisées dans différents domaines comme la santé, l'alimentation, la chimie ...etc. Les voies métaboliques pour la synthèse de ces biomolécules sont également très complexes. C'est pourquoi les biomolécules telles que les protéines, les enzymes, les métabolites secondaires, les sucres, etc., sont produites en quantité suffisante grâce à la production hétérologue ou à l'ingénierie des voies biologiques existantes dans les bactéries, les levures et certaines espèces végétales. Les micro-organismes sont préférés pour la production des plusieurs types des molécules en raison de leur facilité d'ingénierie, de leur temps de génération court et de leur capacité à se développer à partir d'une source de carbone peu coûteuse.

## **Chapitre 1: Microorganismes producteurs des biomolécules**

La cellule est une entité cloisonnée par une membrane contenant un ensemble de molécules

vivantes. Il existe deux types d'organismes :

- ✓ **Les procaryotes** : êtres unicellulaires dépourvus de noyau ;
- ✓ **Les eucaryotes**: sont de taille plus grande et possèdent un noyau bordé d'une membrane.

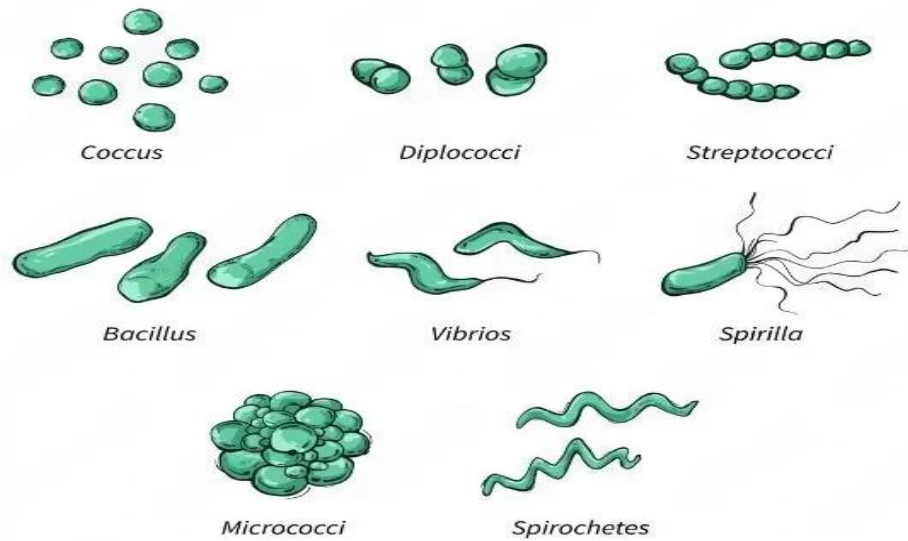
Micro-organismes ou microbes sont des organismes invisibles à l'œil nu, qui ne peuvent être observés qu'à l'aide d'un microscope. Ils sont divisés en trois classes ; les procaryotes, les eucaryotes et non cellulaires (virus). trois types de micro-organismes sont utilisés pour la production. Il s'agit des bactéries, des levures et des champignons (fungi) filamenteux.

### **1. Systèmes cellulaires procaryotes (Bactéries)**

Les procaryotes sont généralement des micro-organismes unicellulaires, à l'exception d'une majorité de cyanobactéries (micro-organismes pluricellulaires). Ils se subdivisent en deux domaines, les eubactéries (Eubacteria) et les archées (archaea). Ces dernières se distinguent des eubactéries par certaines caractéristiques. Les deux domaines ont la particularité de se reproduire par scissiparité (absence de mitose et de méiose).

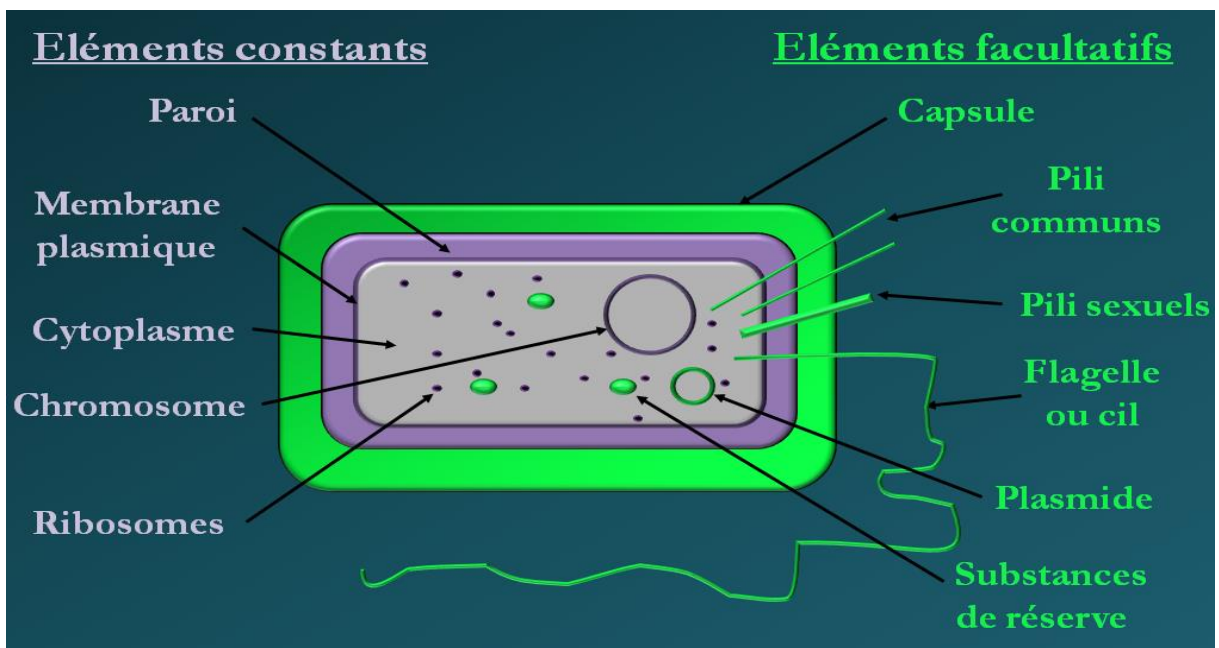
#### **Définition**

Une bactérie est un micro-organisme unicellulaire procaryote, elle n'a pas un véritable noyau mais le matériel génétique baigne directement dans le cytoplasme. Les bactéries ont des formes variées (bâtonnet, en filament, arrondie) (**Figure 1**).



**Figure 1.** Formes des bactéries : bâtonnet (b), filament (c) et arrondie (d).

Les bactéries possèdent à la fois des éléments essentiels et facultatifs et sont caractérisées par l'absence d'enveloppe nucléaire, de système endomembranaire (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, etc.) et de mitochondries (**Figure 2**).



**Figure 2.** Structure de la cellule bactérienne composant (éléments constants et éléments facultatifs).

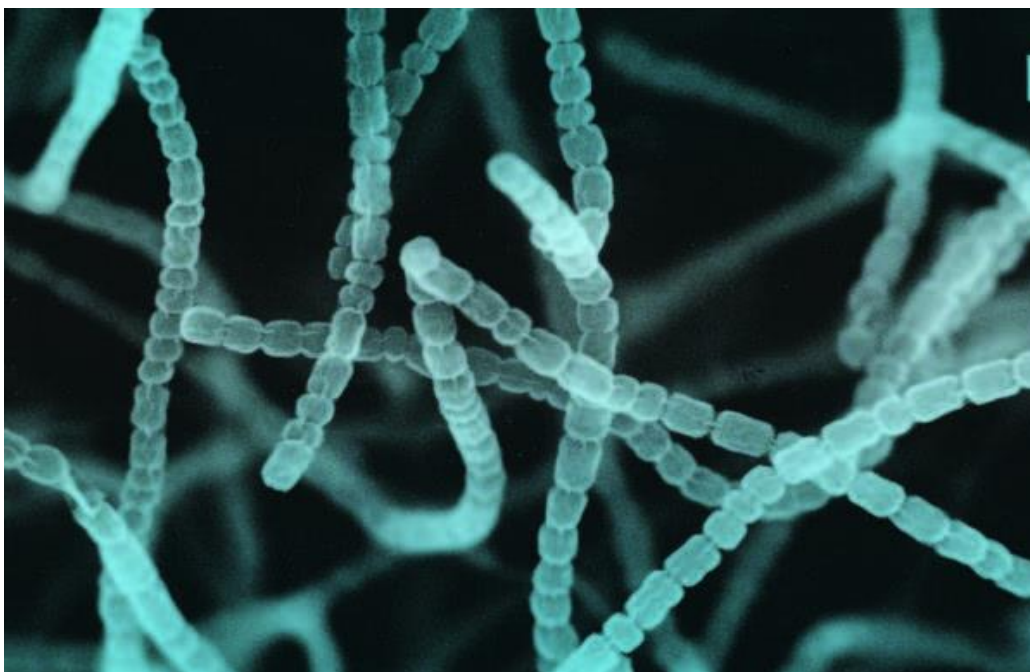
La bactérie *Escherichia coli* est largement utilisée dans la production parce que leur matériel génétique est connu. Il est également facile à implanter dans le fermenteur (les

conditions de croissances sont connues). De plus l'expression de molécules est élevée à l'aide de ces bactéries (plusieurs grammes / L de protéine produites).

Autres bactéries sont utilisées comme *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*. Elles sont caractérisées par un fort potentiel de sécrétion mais elles sont génétiquement males connues et les niveaux de la production sont inférieurs.

### **Actinomycètes**

Les actinomycètes (Actinobacteria) sont des bactéries Gram-positives qui se développent dans divers environnements et ont une forme filamenteuse semblable à celle des champignons. Les actinomycètes se distinguent morphologiquement en formant une couche d'hyphes qui portent des chaînes de spores (**Figure 3**).



**Figure 3.** Morphologie des bactéries actinomycètes

Certaines espèces d'actinomycètes sont connues pour leur capacité à sécréter des produits secondaires ayant des propriétés biologiques telles que des antimicrobiens, des antiparasitaires, des antioxydants et des anticancers.

**Streptomyces**; en tant qu'actinomycète, est connu pour produire un certain nombre de métabolites secondaires bioactifs, notamment des agents antitumoraux ; des antibiotiques,

des antifongiques, des antiviraux, des médicaments antihypertenseurs et des immunosuppresseurs. Afin de rivaliser avec d'autres micro-organismes, y compris ceux du même genre, les espèces de *Streptomyces* produisent plusieurs métabolites secondaires.

Ces bactéries se trouvent dans deux habitats très distincts:

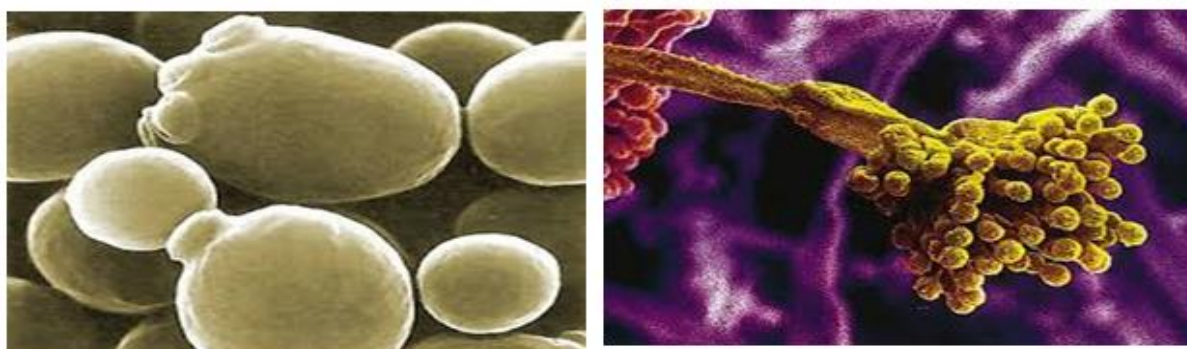
➤ **Les actinobactéries libres:**

Ils sont principalement présentes dans le sol. Parmi les acteurs majeurs de la vie du sol et du cycle du carbone, elles jouent un rôle essentiel en participant à la décomposition des matières organiques, notamment de la cellulose et de la chitine.. Il est possible que ces bactéries se regroupent en filaments qui génèrent des cystes (fructifications, des endospores) afin de faire face à un environnement défavorable (par exemple, en présence de myxomycètes).

➤ **Les actinobactéries symbiotes** de plante, de champignons et d'animaux sont également présentes. Les actinobactéries endophytes (qui vivent à l'intérieur des plantes) jouent un rôle essentiel dans la protection de ces plantes et leur croissance optimale.

## 2. Systèmes eucaryotes (Les champignons microscopiques).

Ce sont des organismes uni ou pluri cellulaires eucaryotes. Ils se trouvent partout où il existe une source alimentaire. Il y a deux types de champignons: Levures (organismes unicellulaires) et les moisissures (organismes pluricellulaires) (**Figure 4**).



**Figure 4.** La forme d'une levure (a) et moisissure (b).

### 2. 1. Levures

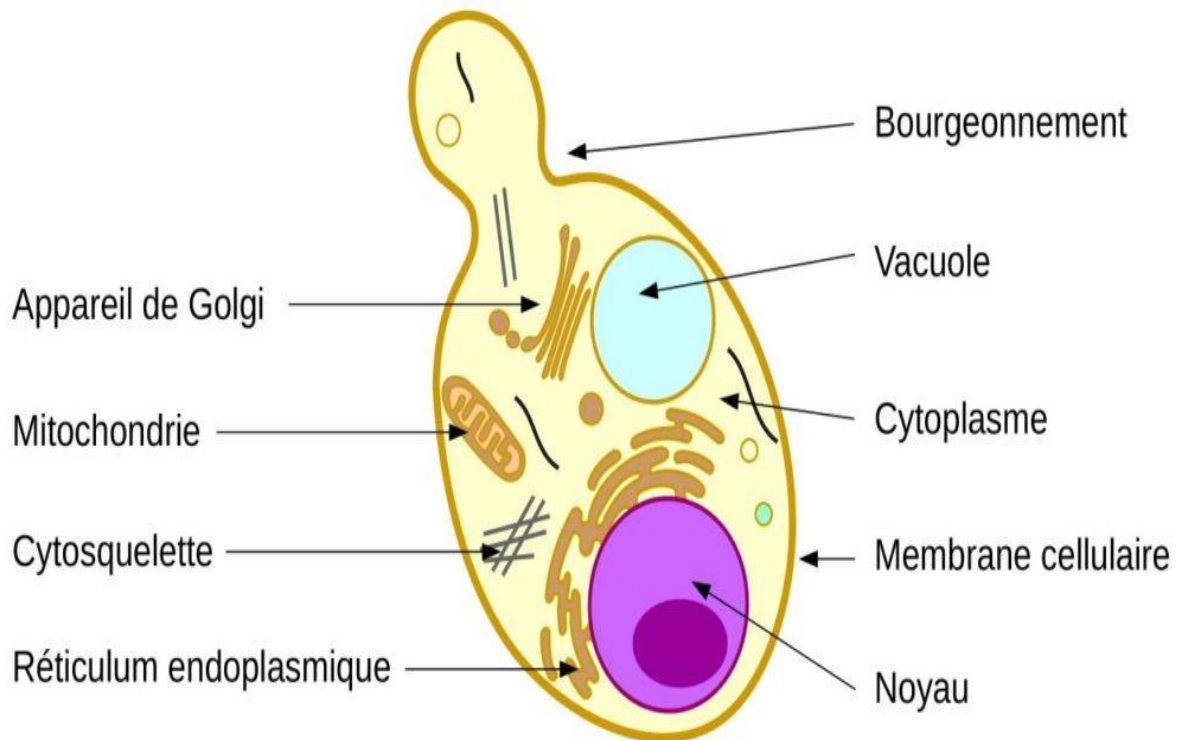
Les levures sont des organismes unicellulaires eucaryotes (ayant un noyau). Elles font partie de la famille des mycètes, également connues sous le nom de champignons. Elles

peuvent être sphériques, allongées, cylindriques ou ovoïdes (caractéristique de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*), mais il y a des formes particulières.

Les levures se caractérisent par:

- Une taille comprise entre 6 et 8  $\mu\text{m}$ . Certaines levures sont toutefois capables de former des structures filamenteuses (pseudomycélium) dans certaines conditions.
- une paroi rigide responsable de leurs formes, constituée principalement de: polysaccharides (80% dont principalement la chitine, polymère de N-acétyl glucosamine) et de protéines (10 à 20%).
- La membrane plasmique est composée de stérols (riche en ergostérol et zymostérol), elle a une structure classique des membranes biologiques.
- Le cytoplasme, de pH égal à 5, contient de nombreuses enzymes, des réserves (glycogène) et des organites intracellulaires caractéristiques des cellules eucaryotes (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries, vacuoles et ribosomes) (**Figure 5**).
- les ribosomes qui synthétisent les protéines,
- les mitochondries, qui assurent la production d'énergie à partir des sucres nécessaires à la croissance de la cellule. Elles sont également le siège de l'activité respiratoire en aérobiose (vie dans un milieu oxygéné).
- une large vacuole, qui est riche en enzymes solubles mais qui est également le lieu de stockage des substances de réserve suivantes : le **glycogène**, pour le stockage de l'énergie, et le **tréhalose**, un sucre dégradé très lentement lorsque les réserves de glycogène sont épuisées. Le stockage du tréhalose est très important car il va permettre à la levure de survivre lorsqu'elle est dans un environnement défavorable (séchage, surgélation).
- Le noyau contient 16 chromosomes chez *Saccharomyces cerevisiae*. Des plasmides sont présents chez la plupart des levures.



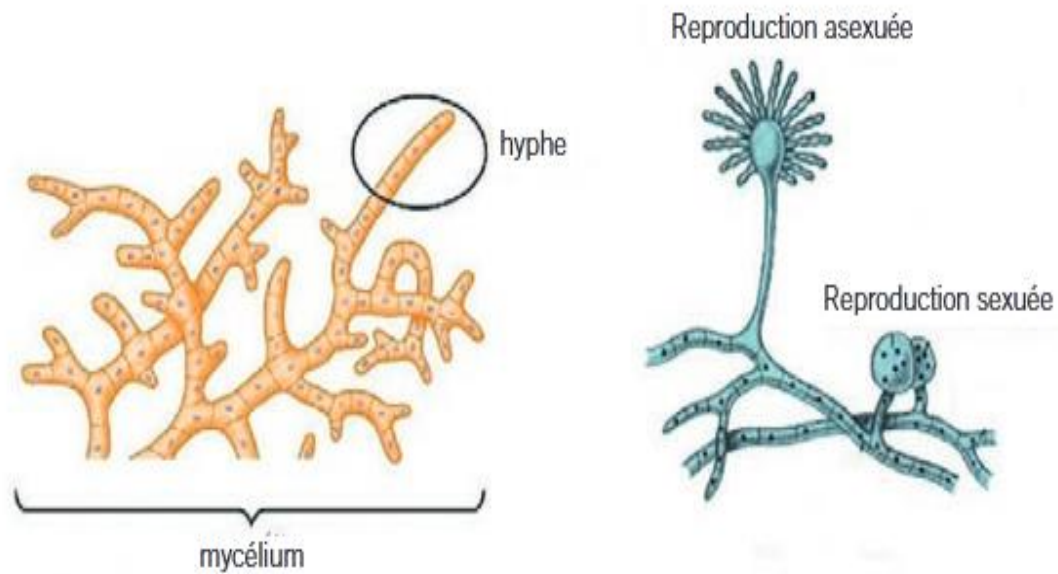


**Figure 5.** Ultra-structure d'une levure.

*S. cerevisiae* a été la première levure utilisée dans la production de biomolécules, protéines recombinantes et plusieurs produits biopharmaceutiques. Il existe plusieurs caractéristiques intrinsèques, comme la stabilité du système d'expression et la facilité de la culture. Les protéines à *S. cerevisiae* représente déjà un processus industriel bien établi, assurant des titres de production allant jusqu'à centaines de mg / l. En alternative à *S. cerevisiae*, les levures *P. pastoris* et *Kluyveromyces lactis* peuvent être utilisées pour la production.

## 2. 2. Moisissures

Les moisissures sont microorganismes hétérotrophes pluricellulaires sous forme d'un amas de filaments ramifiés, appelés hyphes. L'ensemble des hyphes constituent le mycélium ou thalle, visible à l'œil nu (les champignons sont aussi appelés thallophytes) (**Figure 6**). L'hyphe a un diamètre moyen de 5  $\mu\text{m}$ , il constitue la structure de base du mycélium, et se compose d'une paroi rigide composée de chitine associée à des protéines, des lipides, de polyphosphates et des ions inorganiques.



**Figure 6.** Structure du mycélium des moisissures.

### 2.2.1. Caractéristiques des moisissures

-Les moisissures sont immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique. Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores.

-Les moisissures sont aérobies, en général, acidophiles (pH compris entre 3 et 7) ou mésophiles (température optimale 20-30°C). Cependant, certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température ( $T^{\circ} < 15^{\circ}\text{C}$  ou même parfois  $< 0^{\circ}\text{C}$ , comme *Cladosporium herbarium*, *Thamnidium elegans*).

- Elles ont, en générale, un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes ( $a_w = 0.65$ ).

- Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique, etc...) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes).

### **3. Avantages et inconvénients d'utilisation des micro-organismes**

#### **3.1. Avantages**

L'utilisation de micro-organismes pour produire des biomolécules pour les raisons suivantes:

- Extrême rapidité de croissance des cellules microbiennes (50 fois plus rapide que la production bovine).
- Le fait qu'elle ne nécessite pas de terres cultivables de grands espaces.
- L'absence de contraintes saisonnières, cette production étant possible toute l'année sans interruption.
- La modification génétique des micro-organismes.
- Elle demande peu d'espace et peu d'eau, un contenu protéique élevé et génère peu de résidus.
- Les substances microbiennes sont très importantes dans l'alimentation humaine et animale car elles sont équilibrées en acides aminés indispensables.
- La récupération et la valorisation de sous produits des industries agroalimentaires à des fins alimentaires peuvent constituer une alternative intéressante. Il s'agit de la création de biomasse sous forme de protéines d'organismes unicellulaires 'P.O.U'.
- Les molécules des microorganismes sont fabriquées pour les domaines thérapeutiques.

#### **3.2. Les inconvénients**

Bien qu'il existe des points positifs pour les micro-organismes, mais il y a quelques points négatifs..

- Les microorganismes peuvent produire des toxines ou autres métabolites nuisibles.
- Les protéines produites possèdent des propriétés physiologiques qui peuvent ne pas convenir à la consommation directe par les humains.

### **4. Choix des microorganismes**

Une fois isolés, les microorganismes obtenus font l'objet d'une sélection en fonction de leur capacité biologique et technologique.

- Non pathogènes et ne produisent pas de métabolites indésirables comme les toxines.
- Facile à manipuler génétiquement.

- le rendement est élevé.
- Croitre sur des substrats bon marché (les déchets d'industrie agroalimentaire).
- Ne possèdent pas d'exigence spécifique vis-à-vis des facteurs de croissances.
- Stable génétiquement, surtout après leur conservation par congélation ou lyophilisation.
- Bonne résistance aux variations dans les conditions d'opération.
- Facilité pour la récolte.

## **5. 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 (**Figure 7**).

### **5.1. En pharmacie**

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.

### **5.2. En 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.

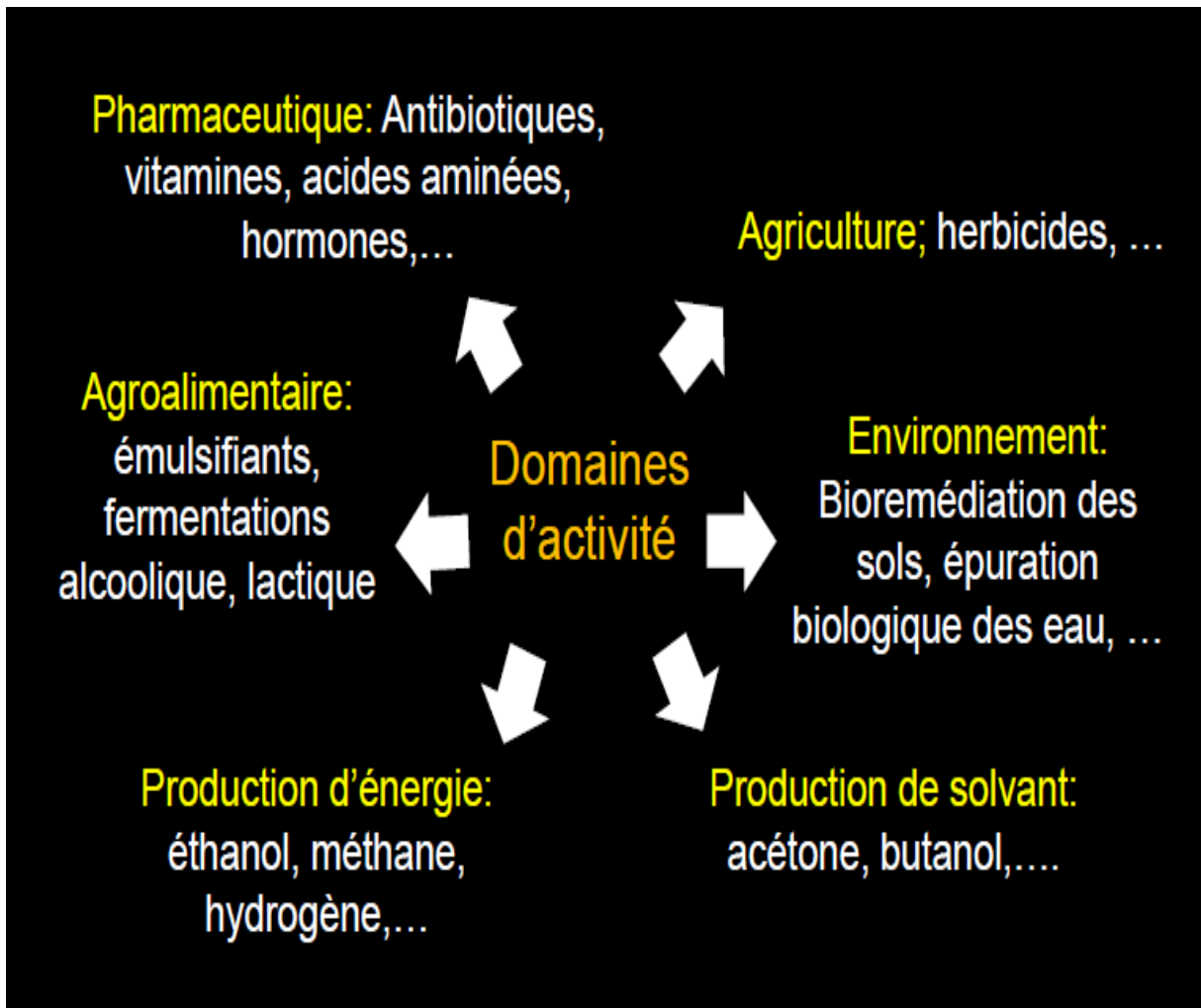
### **5.3. La chimie**

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...

### **5.4. Energie 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. La figure 7 résume les différents domaines d'application des microorganismes.



**Figure 7.** Différents domaines d'application des microorganismes.

## Chapitre 2. Bioréaction et paramètres de croissance

### 1. Milieux de culture

#### 1.1. Définition

Les milieux de culture sont des milieux de croissance conçus pour répondre aux besoins nutritionnels de certains microbes pour les processus de reproduction et de croissance. Les exigences pour un bon milieu de culture sont qu'il puisse fournir suffisamment de nutriments aux microbes, qu'il doit y avoir de l'espace pour l'oxygène ou d'autres gaz en fonction des besoins des microbes et qu'il ait l'humidité appropriée.

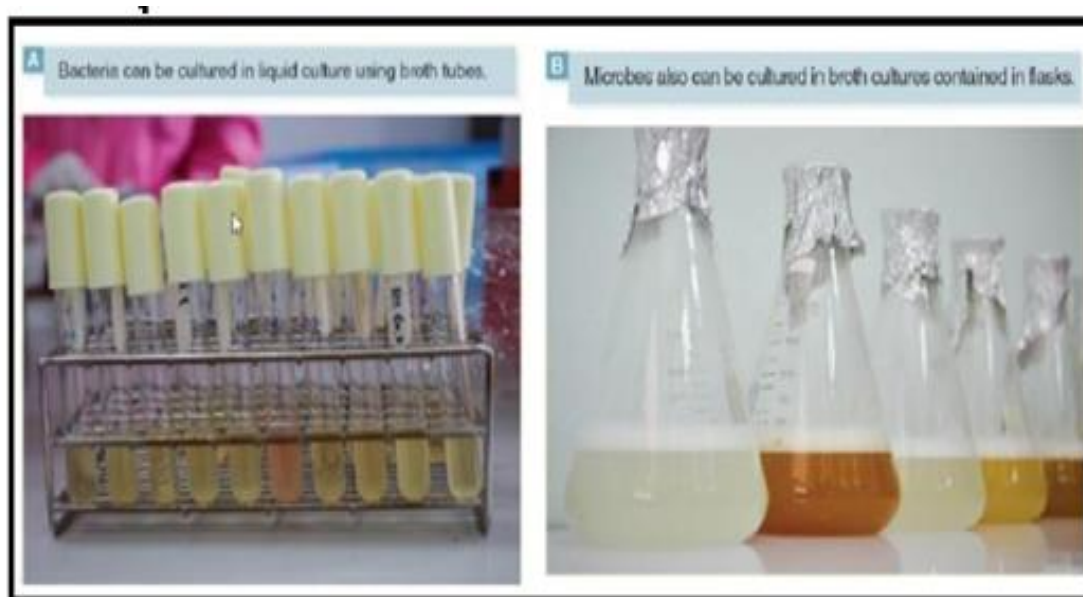
#### 1.2. Types des milieux de culture

Il existe différentes classifications des milieux de culture :

##### 1.2.1. Selon la forme

### 1.2.1.1. Milieu liquide

Le milieu liquide le plus utilisé est le bouillon. Tous les composants nécessaires aux milieux de croissance ont été dissous dans de l'eau, par exemple : eau peptonée, bouillon nutritif, bouillon tryptique soja et bouillon glucidique au rouge phénol. Le processus de culture bactérienne avec des milieux de culture est réalisé dans des tubes à essai ou des flacons (**Figure 8**).



**Figure 8.** Utilisation des milieux liquides pour la culture microbienne.

### 1.2.1.1. Milieux solides

Les milieux solides sont initialement des milieux liquides auxquels on ajoute un agent solidifiant tel que l'agar-agar. L'agar est un polysaccharide de paroi cellulaire dérivé d'algues rouges. Comme la gélatine, l'agar fond lorsqu'il est chauffé et durcit lorsqu'il est refroidi en dessous de 40 °C. Après stérilisation du milieu nutritif en gélose, la solution sera versée sur une plaque de culture et laissée refroidir et durcir (**Figure 9**). Les milieux solides sont par exemple les milieux à base de carotte, de pomme de terre, d'agar-agar nutritif, d'agar-agar sanguin, d'agar-agar McConkey et d'agar-agar chocolat. Après inoculation, les spécimens sur milieu gélosé se développeront sous forme de colonies (bactéries et levures) ou de filaments (champignons). Les milieux solides permettent à l'utilisateur de voir les différences entre les espèces bactériennes à travers les colonies

résultantes. Cependant, la faiblesse des milieux solides est que l'accès aux nutriments est plus limité.



**Figure 9.** Milieux solides pour la croissance microbienne.

### 1.2.2. Selon la composition du milieu

#### 1.2.2. 1. Milieu complexe

Dans un milieu complexe, la composition chimique du milieu n'est pas connue avec certitude. Ce type de milieu contient souvent des réactifs biologiques tels que l'extrait de levure et la peptone, le bouillon tryptique soja et la gélose au sang. Les milieux complexes fournissent généralement une grande variété de facteurs de croissance qui aident à la culture d'espèces bactériennes inconnues et de bactéries exigeantes.

#### 1.2.2. 2. Milieu synthétique

Dans un milieu défini, la composition chimique du milieu est connue avec certitude. Ce type de milieu se compose généralement de substances chimiques pures et est souvent utilisé pour étudier les besoins nutritionnels minimaux d'un micro-organisme.

### 1.2.3. Selon le rôle (utilisation)

#### 1.2.3.1. Milieu de base

Cela signifie que ce milieu peut être approprié pour divers types de micro-organismes, à la fois des bactéries et des champignons, par exemple la Nutrient Agar (NA).



### **1.2.3.2. Milieu sélectif**

Le milieu sélectif est conçu pour inhiber la croissance de certaines espèces bactériennes et favoriser la croissance d'autres espèces bactériennes ciblées par l'ajout de substances telles que des antibiotiques, des sels biliaires et la régulation du pH. Par exemple, un milieu complexe contenant du sel (NaCl) pour sélectionner la croissance de *Staphylococcus aureus*. Un autre milieu sélectif, par exemple, est la gélose MacConkey qui sélectionne la croissance des bactéries Gram-négatives en inhibant la croissance des bactéries Gram-positives. En outre, il existe également un milieu sélectif pour la gélose Xylose Lysine Désoxycholate (XLD) qui sert à l'isolement des espèces de *Salmonella* à partir d'échantillons cliniques et d'aliments.

### **1.2.3.3. Milieu différentiel**

Le principe du milieu différentiel est de modifier le milieu nutritif de base par l'ajout d'un ou plusieurs produits chimiques qui permettent aux observateurs de distinguer des espèces similaires en fonction de l'apparence de leur colonie ou des changements de croissance visibles. Le milieu différentiel contient certains produits chimiques pour montrer les différences physiologiques ou biochimiques entre les organismes.

### **1.2.3.4. Milieu enrichi**

Bien que de nombreux micro-organismes se développent bien dans un milieu complexe standard, certains organismes nécessitent un milieu enrichi, qui contient des facteurs de croissance supplémentaires pour favoriser la croissance et la reproduction cellulaires. Des exemples de milieu enrichi sont la gélose au sang contenant des nutriments standard plus 5 % de globules rouges de mouton utilisés pour la croissance de *Salmonella enterica*, la gélose au chocolat pour la croissance de la bactérie responsable de la gonorrhée, *Neisseria gonorrhoeae*, qui nécessite de la poudre d'hémoglobine comme partie du milieu de croissance.

### **1.2.3.5. Les milieux de culture industriels**

Les bactéries, levures et moisissures peuvent être cultivées en milieu de culture continu dans de grands bioréacteurs où les conditions optimales de croissance sont maintenues. Les substrats employés comprennent la mélasse, l'amidon hydrolyse, des résidus cellulosiques (bois hydrolyse, tige de canne à sucre, drêche de brasserie, déchets des dattes), des résidus d'industries alimentaires (lactosérum, pelures de fruits ou de légumes, panouilles de

maïs...), des résidus de l'industrie papetière, du méthanol, des sous-produits pétroliers (paraffine, alcanes, kérosène, gaz-oil, éthanol...), des gaz de combustion (méthane, hydrogène, gaz carbonique). À chaque type de substrat disponible, correspondent des micro-organismes particuliers qui pourront l'utiliser. Par exemple, dans les résidus riches en cellulose, on doit cultiver des micro-organismes cellulolitiques comme *Cellulomonas* ou *Trichoderma viride* ; dans les farines riches en amidon, on emploie des levures *Saccharomyces*. Après leur multiplication, les cellules sont lavées, concentrées, séchées et stérilisées.

### 1.3. Composition du milieu de culture

Les nutriments sont des substances chimiques obtenues de l'environnement et utilisées pour les activités cellulaires. Les nutriments essentiels des microbes comprennent : i) des macronutriments essentiels, tels que l'oxygène, l'hydrogène, le carbone, le nitrogène, le phosphore et le soufre, qui jouent un rôle essentiel dans la croissance des cellules, leurs besoins en énergie, leur structure, leur survie et la formation d'organiques. Environ 95 % du poids sec des cellules dans les microorganismes est dû à ces six éléments : ii) micronutriments, nécessaires en plus faibles quantités, tels que le potassium, le magnésium, le calcium, le sodium, l'iode, le manganèse, le cobalt, le cuivre, le molybdène et le zinc. Microorganismes sont très différents en ce qui concerne les formes chimiques dans lesquelles ces éléments sont utilisés comme nutriments.

#### 1.3.1. Besoins essentiels

##### a. Énergie

En fonction de leur source d'énergie, les organismes sont désignés comme suit:

- ✓ **Phototrophes** : Les organismes qui peuvent utiliser la lumière comme source d'énergie sont appelés phototrophes. Ces bactéries obtiennent de l'énergie à partir de la lumière.
- ✓ **Chimiotrophes** : Ces bactéries obtiennent de l'énergie à partir de composés chimiques. Elles ne peuvent pas effectuer la photosynthèse.

En fonction de leur source d'électrons, les organismes sont désignés comme suit :

- ✓ **Lithotrophes** : Certains organismes peuvent utiliser des composés inorganiques réduits comme donneurs d'électrons et sont appelés lithotrophes.

Ils peuvent être chimio-lithotrophes et photo-lithotrophes.

- ✓ **Organotrophes** : Certains organismes peuvent utiliser des composés organiques comme donneurs d'électrons et sont appelés organotrophes. Certains peuvent être chimio-organotrophes et photo-organotrophes.

#### **b. Source de carbone**

Tous les organismes ont besoin de carbone pour synthétiser les composants cellulaires. Tous les organismes ont besoin d'au moins une petite quantité de CO<sub>2</sub>. Cependant, certains peuvent utiliser le CO<sub>2</sub> comme source principale ou même unique de carbone ; ces organismes sont appelés autotrophes. D'autres ont besoin de composés organiques comme source de carbone et sont connus sous le nom d'hétérotrophes.

#### **c. Source d'azote**

La synthèse des protéines nécessite des substances azotées. Ces substances peuvent être organique (groupements amines des composés organiques) ou inorganique (ammoniac, sels d'ammonium, nitrites, nitrates).

#### **d. Éléments minéraux**

- Le soufre et le phosphore sont particulièrement importants. Le soufre est présent dans certains acides aminés (groupement thiol) et il est incorporé sous forme de sulfate ou de composés soufrés organiques.

- Le phosphore fait partie des acides nucléiques, de nombreuses coenzymes et de l'ATP. Il est incorporé sous forme de phosphate inorganique.

- Le sodium, le potassium, le magnésium et le chlore jouent un rôle dans l'équilibre physico chimique de la cellule.

- le fer, le manganèse, le molybdène, le calcium, le vanadium ou le cobalt sont des oligoéléments nécessaires à des concentrations très faibles.

#### **e. Besoins spécifiques (facteurs de croissance)**

Un facteur de croissance est un élément indispensable à la croissance de microorganisme. Il doit être présent dans l'environnement. Les microorganismes capables de croître en présence d'eau, d'une source d'énergie, d'une source de carbone, d'une source d'azote et d'éléments minéraux sont qualifiées de prototrophes (sans facteurs de croissance).

• Les microorganismes nécessitant, en plus, un ou plusieurs facteurs de croissance qu'elles sont incapables de synthétiser sont dites auxotrophes.

**Tableau 1.** Facteurs de croissance et leurs concentrations dans les milieux de culture.

Facteurs de croissance	Besoins quantitatifs
bases puriques ou pyrimidiques	10 µg/ml
acides gras	10 µg/ml
acides aminés	10 µg/ml
vitamines (coenzymes, précurseurs de coenzymes, groupements prosthétiques de diverses enzymes)	1 µg/m

#### 1.4. Conditions de croissance (facteurs physico-chimique)

On appelle facteurs physiques, les facteurs qui relèvent de l'environnement. Ces facteurs peuvent favoriser, empêcher ou inhiber la nutrition et la croissance microbienne. L'Eau, la température, le pH, l'oxygène et pression osmotique sont les facteurs physicochimiques les plus importantes.

##### a) Eau:

L'eau est essentielle pour toutes les formes de vie. L'activité de l'eau correspond à la disponibilité biologique de l'eau pour les micro-organismes. Chaque micro-organisme (bactérie, levure, moisissure...) possède une valeur d'activité de l'eau ( $a_w$  : activity water) minimale en dessous de laquelle il n'est plus possible de se développer (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Quelques valeurs d'activité d'eau ( $a_w$ ) des microorganismes.

Activité d'eau ( $a_w$ )	Microorganismes
$a_w=0,91...0,95$	nombreuses bactéries
$a_w = 0,88$	nombreuses levures
$a_w = 0,75$	Bactéries halophiles
$a_w = 0,70$	Levures osmiophiles

## b) Température

Elle a un effet sur la multiplication et le métabolisme microbien. Les différentes espèces ont une température différentes: Minimale : à laquelle ils peuvent se développer; optimale : c'est la meilleure à laquelle ils peuvent se développer ; Maximale : au-delà de laquelle ils ne peuvent développer.

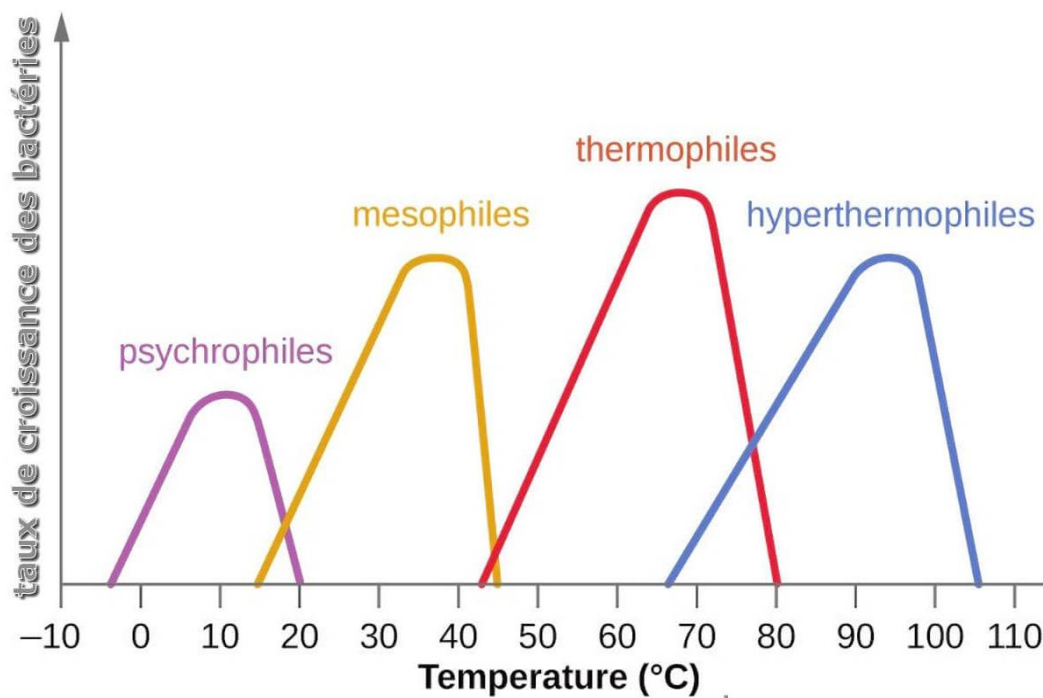
Et Selon leur température optimale, les microorganismes sont dits (**Figure 10**):

\*psychrophiles : entre 0 et 15° , (optimum = 10°C) (Pseudomonas, Aeromonas, )

\*mésophiles : entre 20 et 40 ° (majorité des bactéries) (optimum : 30-37°C).

\*thermophiles: entre 55 et 65 ° , Bacillus et Clostridium.

\*thermophiles extrêmes : optimum situé vers 70°C.



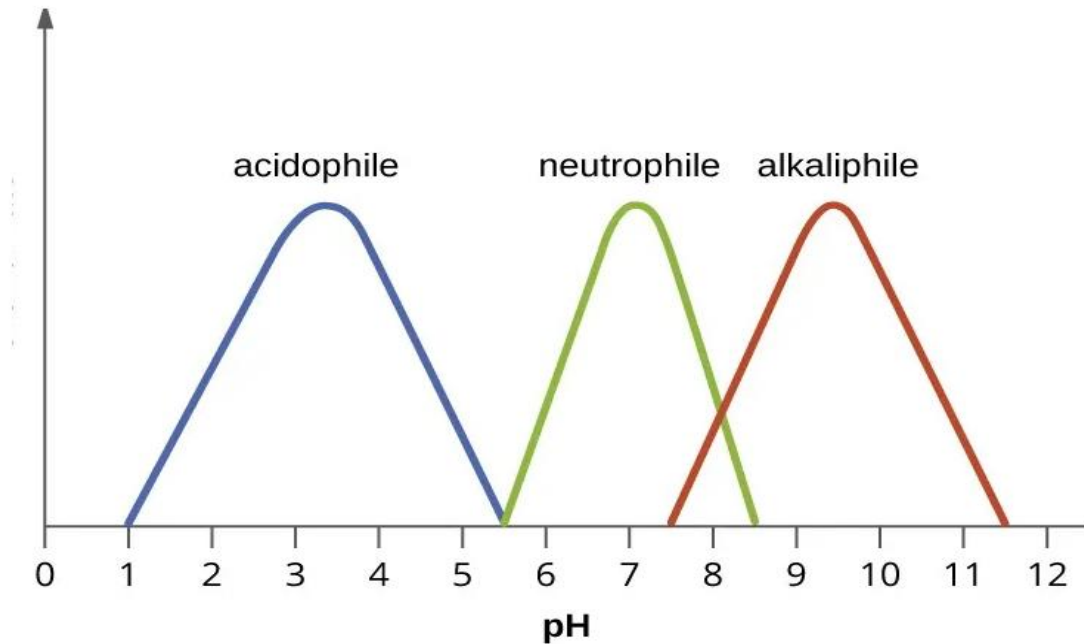
**Figure 10.** Types de microorganismes selon la température.

## c. pH

Le pH (concentration en ion hydrogène [H<sup>+</sup>]) de l'environnement varie entre 0,5 (sols acides) et 10,5 (eaux alcalines des lacs). Il a une influence sur l'équilibre ionique du

milieu, les réactions métaboliques et l'activité enzymatique. Les milieux de culture doivent avoir un pH favorable à la croissance de l'espèce recherchée.

Selon leur pH optimale de croissance on distingue des microorganismes : Acidophiles (1–5.5), neutrophiles (5,5 – 8,5) et basophiles (alcaliphiles) (8,5 à 11,5) (**Figure 11**).

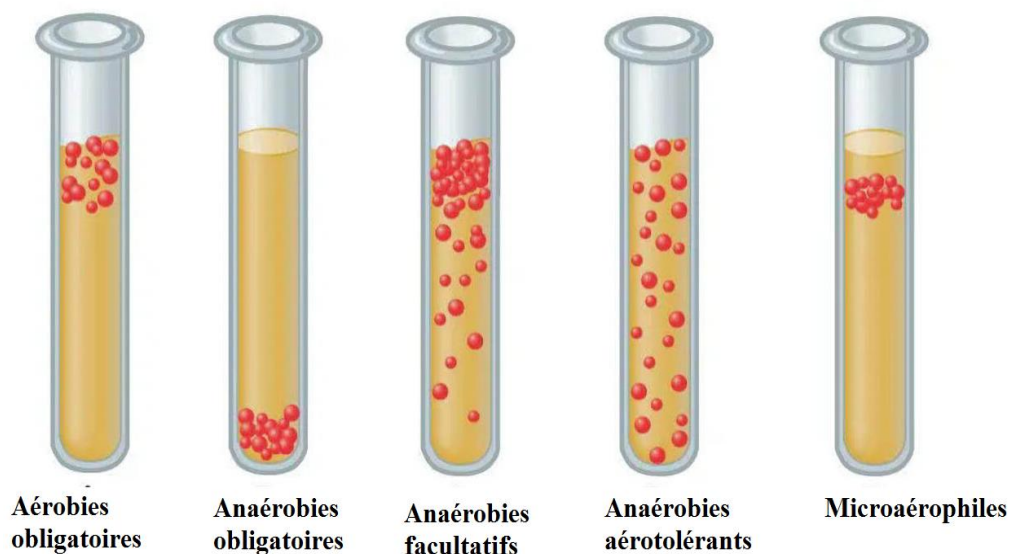


**Figure 11.** Effet du Ph su la croissance des microorganismes.

#### d. Oxygène

En fonction de leur exigence en oxygène, on distingue 5 types respiratoires de bactéries (**Figure 12**):

- Aérobie stricts : exigent l'oxygène libre pour leur croissance
- Aéro-anaérobies (anaérobies facultatives) : capables de croitre avec ou sans oxygène libre.
- Anaérobies stricts : ne peuvent pas se multiplier en présence d'oxygène libre
- Micro-aérophiles : ne se multiplient qu'en présence d'une faible concentration d'oxygène.
- Anaérobie-aérotolérant: se devloppe en absence d'oxygene mais la presence leur presence n'a pas un effet sur la croissance.



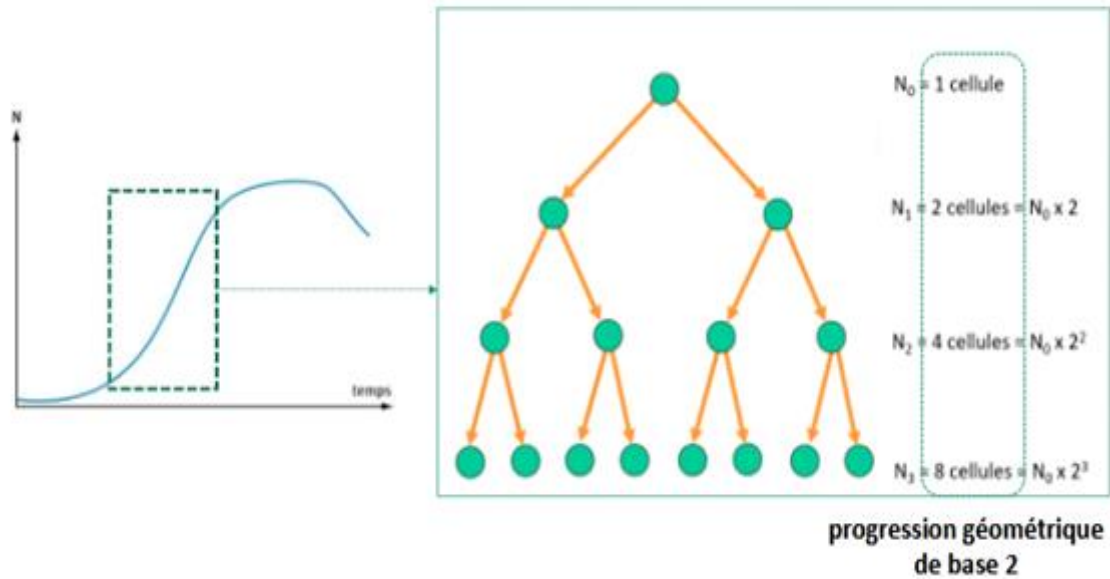
**Figure 12.** Effet d'oxygène sur la croissance microbienne.

## 2. Paramètre de croissance

Ces paramètres sont également connus sous le nom de constantes de croissance.

Ce sont les éléments suivants : le temps de génération ( $G$ ), le temps de générations ( $n$ ) et le taux de croissance ( $\mu$ ).

Une bactérie, dans un environnement favorable, peut se reproduire sans fin, par division binaire (voir figure 6). La progression géométrique de la croissance est d'ordre 2 : 1, 2, 4, 8 ou  $2^0, 2^1, 2^2, 2^3, \dots, 2^n$  ( $n$  = nombre de générations). La division cellulaire répond une progression exponentielle à temps régulier (**Figure 13**).



**Figure 13.** Croissance selon une progression géométrique de base 2 ou croissance exponentielle

### 2.1. Test de croissance

**Nombre des cellules  $N_n$ :** Au bout de  $n$  divisions, on obtient un nombre théorique de bactéries à partir d'une population initiale (nombre de bactéries initial)  $N_0$ .  $N = 2^n N_0$ . (Nombre de cellules divisées au cours du temps ( $t$ )).

**Le temps de génération ( $G$ )** désigne le temps requis pour doubler le nombre de cellules (le temps qui sépare deux divisions successives):  $G = t / n$  (2) (l'unité du temps est l'heure, la minute). Chaque espèce a son propre temps de génération qui varie en fonction des conditions environnementales. ( $G$ ) s'élève à 20 minutes pour *Escherichia coli*. Le taux de croissance ( $\mu$ ) représente la rapidité avec laquelle les bactéries se multiplient : il correspond au nombre de divisions réalisées par unité de temps.

**Le taux de croissance ( $\mu$ )** exprime la vitesse de multiplication des microorganismes : c'est le nombre de divisions effectuées par unité de temps (son unité est  $\text{temps}^{-1}$  :  $\text{H}^{-1}$ ,  $\text{min}^{-1}$ ).

$$\mu = n / t \Rightarrow n = \mu t$$



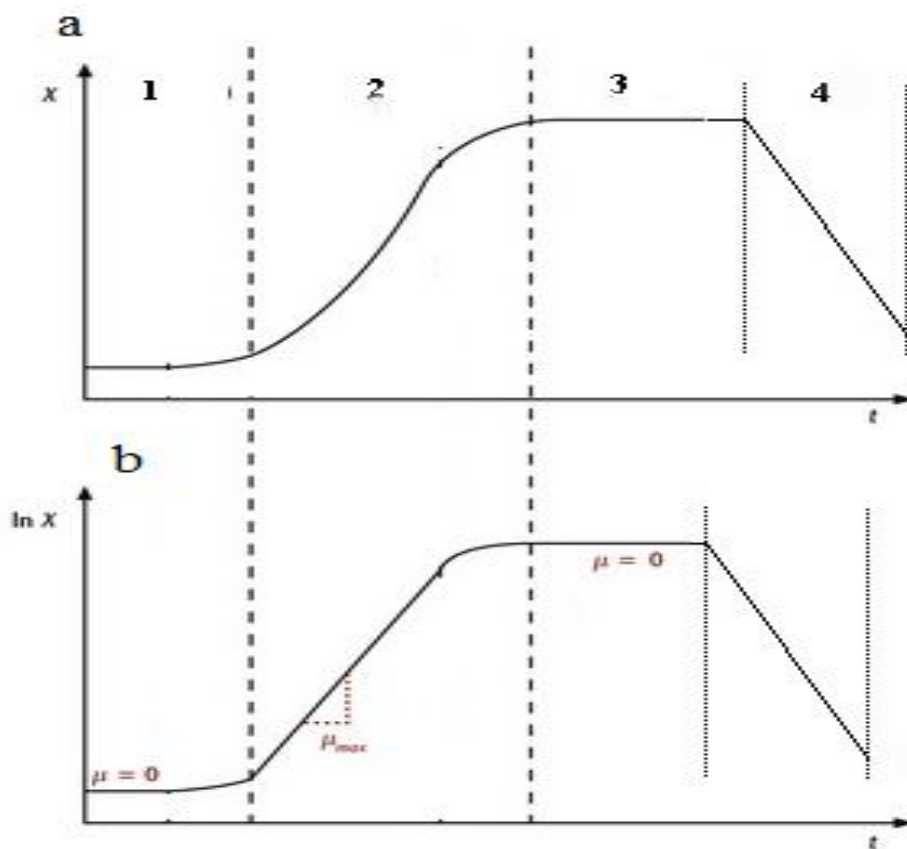
Il s'agit d'une fonction exponentielle. La simplification par transformation logarithmique donne :  $\log N = \mu t \log 2 + \log N_0$ . Qui correspond aussi à :  $\log N = n \log 2 + \log N_0$  donc :  $n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$

Graphiquement,  $\mu$  représente la pente de la droite de la phase exponentielle :

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{(t_2 - t_1)}$$

## 2.2. Phases de croissance

La croissance microbienne se caractérise par différentes phases (**Figure 14**).



**Figure 14.** La courbe de croissance microbienne. a) biomasse sèche ( $X$ ) en fonction du temps ( $t$ ). b) logarithme naturel ( $\ln X$ ) en fonction du temps ( $t$ ). 1 : Phase de latence. 2 : Phase de croissance exponentielle. 3: Phase stationnaire. 4: Phase du déclin.

### Phase de latence

La phase de latence est une période d'adaptation au cours de laquelle les bactéries s'adaptent à leurs nouvelles conditions. La durée de la phase de latence peut varier considérablement, en fonction de la différence entre les conditions de vie des bactéries et celles de leur environnement d'origine, ainsi que de l'état des cellules bactériennes elles-

mêmes. Les cellules endommagées auront une longue période de latence, car elles doivent se réparer avant de pouvoir se reproduire.

### **Phase exponentielle ou logarithmique**

Une fois que les cellules ont accumulé tout ce dont elles ont besoin pour leur croissance, elles passent à la division cellulaire. La phase exponentielle ou logarithmique de croissance est marquée par des doublements prévisibles de la population, où 1 cellule devient 2 cellules, devient 4, devient 8, etc. Les conditions optimales pour les cellules entraîneront une croissance très rapide (et une pente plus raide sur la courbe de croissance). Les cellules en phase exponentielle de croissance sont les plus saines et les plus uniformes, ce qui explique pourquoi la plupart des expériences utilisent des cellules de cette phase ( $\mu = \mu_{\max}$ ).

### **Phase stationnaire**

Le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ ). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

### **Phase de déclin**

Il y a accumulation de métabolites toxiques et le taux de croissance est négatif ( $\mu < 0$ ). Tous les nutriments sont épuisés. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique).

## **3. Type des bioréacteurs (fermenteurs)**

### **3.1. Définition**

Un bioréacteur est un récipient dans lequel une réaction ou un changement biologique a lieu. Les systèmes biologiques impliqués comprennent des enzymes, des micro-organismes, des cellules animales, des cellules végétales et des tissus. Le bioréacteur est un endroit où un environnement externe optimal est fourni pour répondre aux besoins du système de réaction biologique afin d'obtenir un rendement élevé du bioprocessus.

### **3.2. Types de bioréacteurs**

#### **a. Modèles de laboratoire**

Ils vont de 0,1 à 15 litres. Les modèles employés pour les tests en vue de l'industrialisation (appelés "pilotes") vont de 20 à 1 000 litres.

### b. Modèles industrielles

Ils sont destinés à la production industrielle peuvent dépasser les 1 000 m<sup>3</sup> (cas de la production d'éthanol).

### c. Modèles jetables

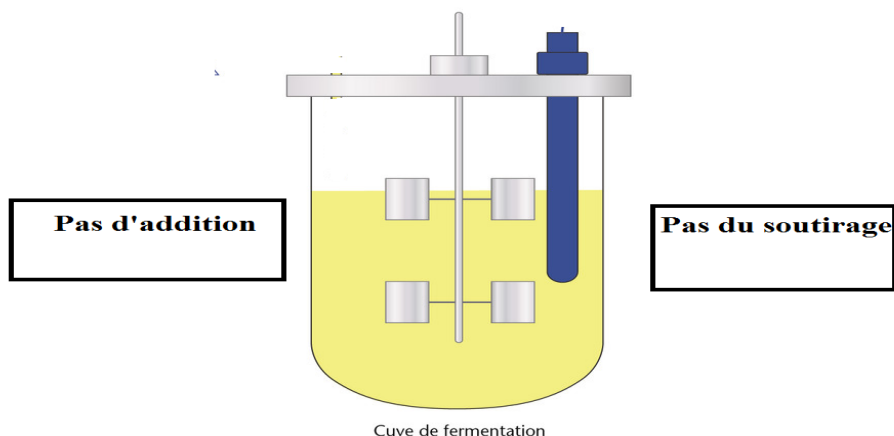
Ils existent sur le marché depuis 1995, utilisés principalement pour des volumes allant du millilitre à quelques centaines de litres.

### 3.3. Techniques de culture en bioréacteur

On distingue trois types de procédés de fermentation: le procédé batch ou fermentation discontinue; le procédé fed-batch ou fermentation discontinue alimentée; le procédé de culture continue .

#### Procédé discontinu (batch)

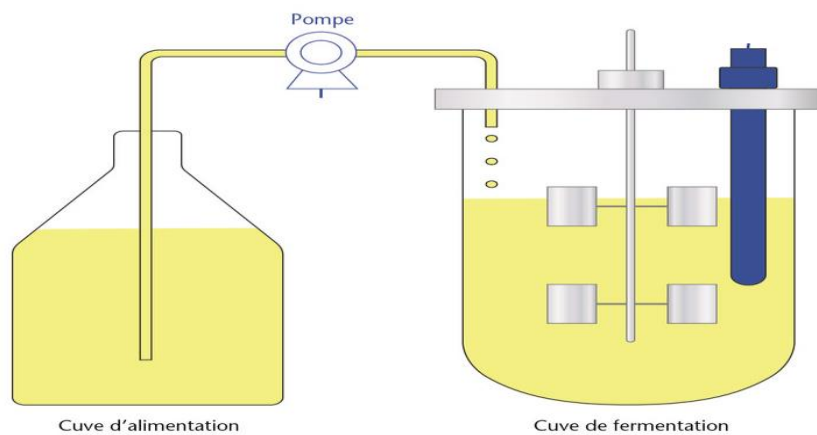
Le procédé est réalisé dans un système clos dans lequel un même volume de milieu non renouvelé est utilisé pour la croissance des micro-organismes ; la quantité de nutriments est donc limitée. il est recommandé d'utiliser un produit antimousse. La quantité de biomasse augmente en fonction de la courbe de croissance microbienne. Parallèlement, le microorganisme consomme le substrat et le produit recherché se manifeste, ce qui entraîne une augmentation de sa concentration (P). À la fin de la culture, le fermenteur est vidé et le produit souhaité est extrait (**Figure 15**).



**Figure 15.** Technique en culture discontinue (Batch).

### Procédé discontinu alimenté (Fed-batch)

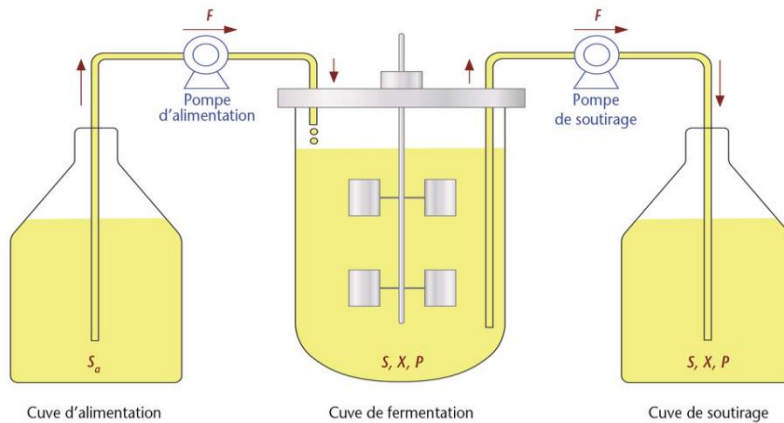
Dans ce cas, la fermentation débute dans un petit volume de milieu de culture (pied de cuve), où l'inoculum estensemencé. Lorsque la concentration de l'inoculum ajoutée est élevée, la fermentation commence plus rapidement et lorsque le microorganisme est en phase de croissance exponentielle, on ajoute un milieu de culture stérile dans la cuve. La régulation du débit d'alimentation garantit une concentration constante de substrat dans la cuve, correspondant ainsi à une étape de la phase logarithmique de croissance cellulaire. Une fois que la cuve est pleine, l'alimentation est coupée, ce qui entraîne une évolution de la culture en suivant la courbe de croissance discontinue (**Figure 16**).



**Figure 16.** Culture continue dans un fermenteur.

### Procédé continu (renouvelé)

Fermentation en mode discontinu commence en système fermé pour permettre à la biomasse de se développer jusqu'à ce qu'elle produise de manière maximale, c'est-à-dire à la fin de la phase de croissance exponentielle, lorsque la biomasse est très élevée et que les taux de croissance et de production sont maximales. Après avoir atteint ce point de croissance, l'alimentation commence en milieu frais et le milieu usé est soutiré à un débit permettant de maintenir les concentrations constantes dans le fermenteur. Il n'y a pas d'accumulation de produits dans la culture, car ils sont évacués vers la cuve de soutirage d'où ils pourront être récupérés (**Figure 17**).



**Figure 17.** Culture continue dans un fermenteur

### Chapitre 3. Biomolécules

#### 1. Biomasse

Le mot "biomasse" fait référence au matériau organique cellulaire des organismes cultivés (animaux, végétaux ou microbes). La biomasse microbienne est également connue sous le nom de "single cell protein" (SCP) ou "Protéines d'organismes unicellulaires". la biomasse microbienne peut être utilisée comme source du bioéthanol, protéines, de vitamines, d'antibiotiques, de vaccins, d'additifs alimentaires.

Le processus de production de biomasse-aliment se concentre principalement sur la production de protéines provenant d'organismes unicellulaires, principalement des levures, mais aussi des bactéries, des moisissures ou des algues. Quand on produit de la biomasse, les protéines ne sont que rarement extraites et purifiées, ce qui entraîne une concentration d'environ 50%.

#### Exemples

- Production de levure diététique
- Production de levains pour les industries de fermentations.
- Production d'agents biologiques pour bioconversions (cellules utilisées libres ou immobilisées, comme catalyseur).
- Production pour des applications particulières comme la lutte biologique (action insecticide).

## 2. Acides aminés

Les acides aminés fabriqués dans la cellule servent, pour la plupart d'entre eux, à la synthèse de protéines, car la cellule possède de nombreux systèmes de régulation. Les acides aminés « essentiels » sont les plus intéressants du point de vue industriel. Les acides aminés peuvent être synthétisés de diverses manières: par voie chimique ; enzymatique ; des extraction à partir d'une source riche ou microbienne en culture.

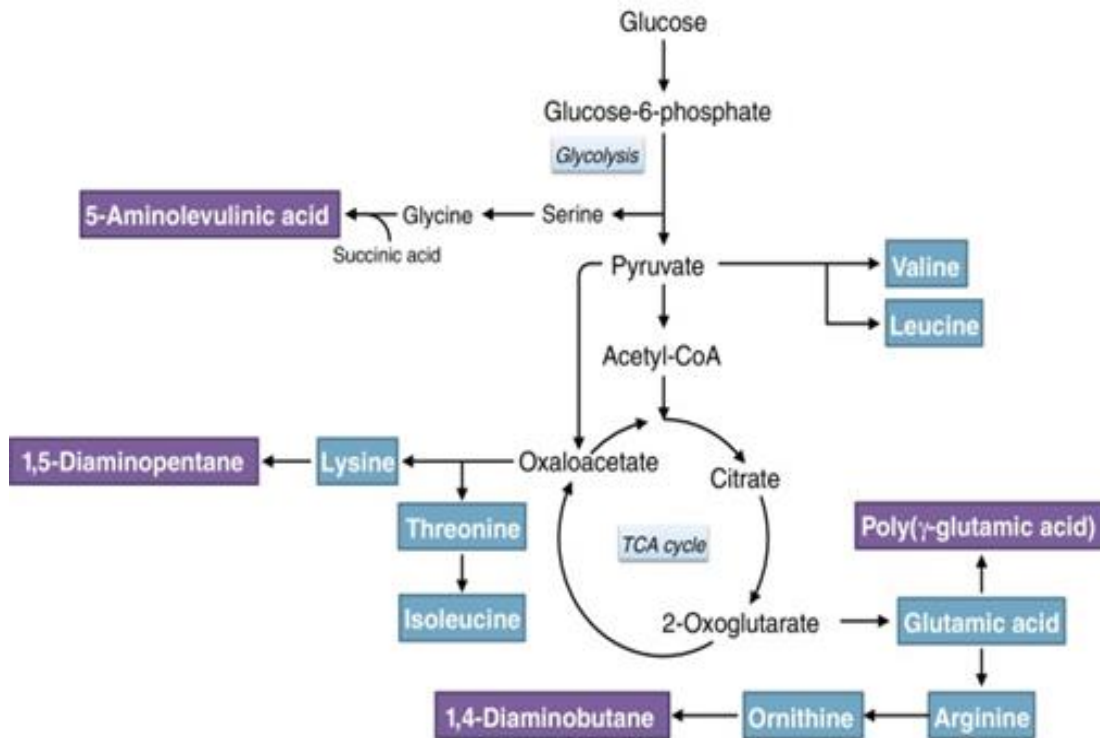
### 2.1. importance des acide aminés

Dans l'industrie agroalimentaire, les acides aminés sont employés dans différentes fonctions:

- ✓ Agents de saveur dans l'alimentation humaine : le glutamate monosodique est utilisé comme exhausteur de saveur de type "goût de bouillon".
- ✓ agents édulcorants (pouvoir "de goût sucré") dans la nutrition humaine : l'aspartame est un dipeptide synthétisé par la condensation des acides aminés : aspartique et phénylalanine.
- ✓ En nutrition humaine et animale, les agents de complémentation sont utilisés pour améliorer la valeur nutritive des produits végétaux, en particulier pour les acides aminés essentiels tels que la lysine et la méthionine, qui sont souvent insuffisants chez les végétaux cultivés.

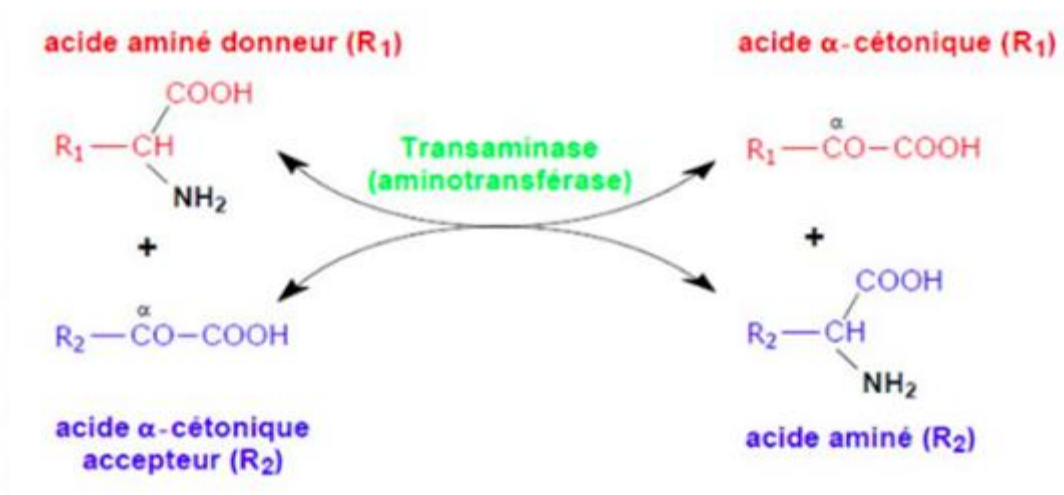
### 2.2. Voies métaboliques

Pour qu'un microorganisme puisse synthétiser un acide aminé, il faut des intermédiaires pour former la chaîne hydrocarbonée et d'autres pour la fonction amine. Les microorganismes produisent des acides aminés en utilisant des produits intermédiaires du métabolisme glucidique (produits de la chaîne hydrocarbonée) tels que l'érythrose-phosphate, un produit du cycle des pentoses, des produits de la glycolyse (trioses-P : phosphoénolpyruvate, phosphoglycérate ; pyruvate, acétyl CoA) et des produits du cycle de Krebs (oxaloacétate,  $\alpha$ -cétoglutarate) (**Figure18**).



**Figure 18.** Voies métaboliques microbienne pour la synthèse des acides aminés.

Le groupement amine est obtenu par transamination d'un autre acide aminé selon la réaction suivante:

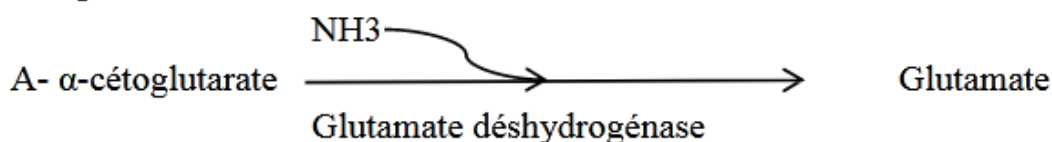


Il est possible d'utiliser L'azote inorganique pour fournir le groupement amine comme les nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et les nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) sous forme d'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), d'autres formes

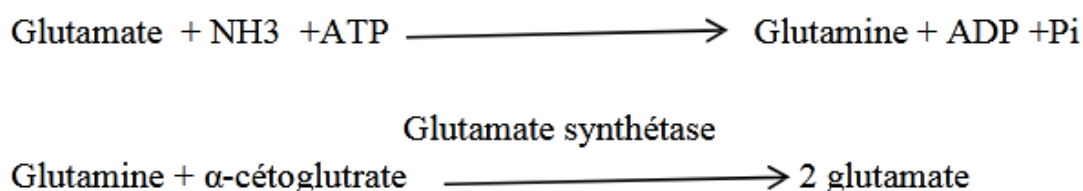
peuvent être intégrées, y compris la forme moléculaire  $N_2$  (Amination). Les microorganismes utilisant l'azote moléculaire ( $N_2$ ) sont très rares (Azotobacter, Achromobacter, Klebsiella, Bacillus, Enterobacter, Actinomyces, certains Clostridium, bactéries photosynthétiques, Cyanophycées...), dont certains sont symbiotiques (Rhizobium, Frankia).

Les réactions suivantes montrent l'opération d'addition de groupement amine :

**-En présence d'une forte concentration**



**B- En présence d'une faible concentration**



### 2.3. Microorganismes producteurs

Les bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*) ainsi que des souches génétiquement modifiées de l'espèce bactérienne *Escherichia coli* sont les microorganismes les plus souvent utilisés.

## 3. Production des acides organiques et alcools

### 3.1. Définition

Un acide organique est un composé organique présentant des propriétés acides, c'est-à-dire capable de libérer un cation (ion chargé positivement)  $H^+$ , ou  $H_3O^+$  en milieu aqueux.

Beaucoup d'acides organiques, produits industriellement à l'aide de microorganismes (bactéries, champignons), proviennent soit de la dégradation anaérobie des sucres, soit de leur oxydation incomplète. Les acides carboxyliques sont les acides organiques les plus fréquents: acides lactique, citrique et acétique.

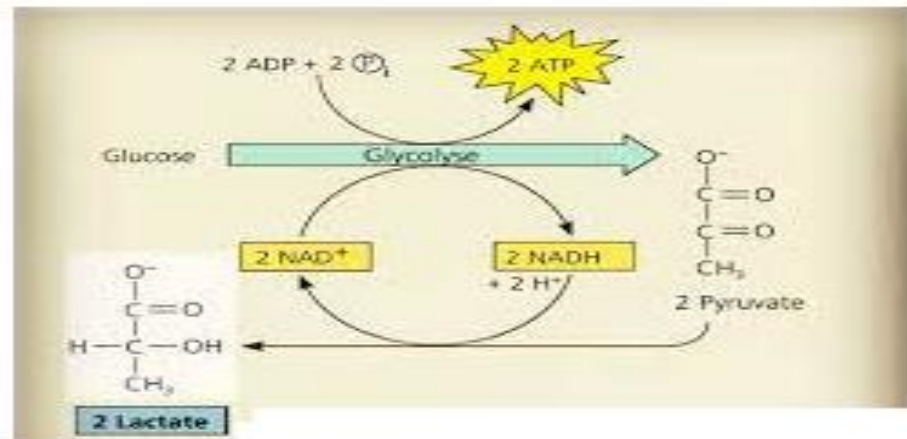
### 3.2. Voie métabolique



La synthèse des acides organiques débute par la glycolyse du glucose et la synthèse du pyruvate. La fermentation est un processus qui transforme le pyruvate en acide organique.

### 3.2.1. Fermentation homolactique

Au cours de laquelle une molécule de glucose est convertie en deux molécules d'acide lactique. Il y a fermentation homolactique quand la quantité d'acide lactique est très supérieure à celle des autres produits formés (de l'ordre de > 90% des sucres fermentés). Contrairement, la fermentation hétérolactique (représente entre 25 et 90% d'acide lactique) (**Figure 19**).



**Figure 19.** Voie métabolique de fermentation lactique chez les microorganismes.

### 3.2.2. Fermentation hétérolactique

La fermentation hétérolactique donne du lactate, de l'éthanol et du  $\text{CO}_2$ . La fermentation lactique est hétérolactique quand sous l'action de bactéries hétérofermentaires on obtient de l'acide lactique et d'autres produits, éthanol, acide éthanoïque, dioxyde de carbone (**Figure 20**).

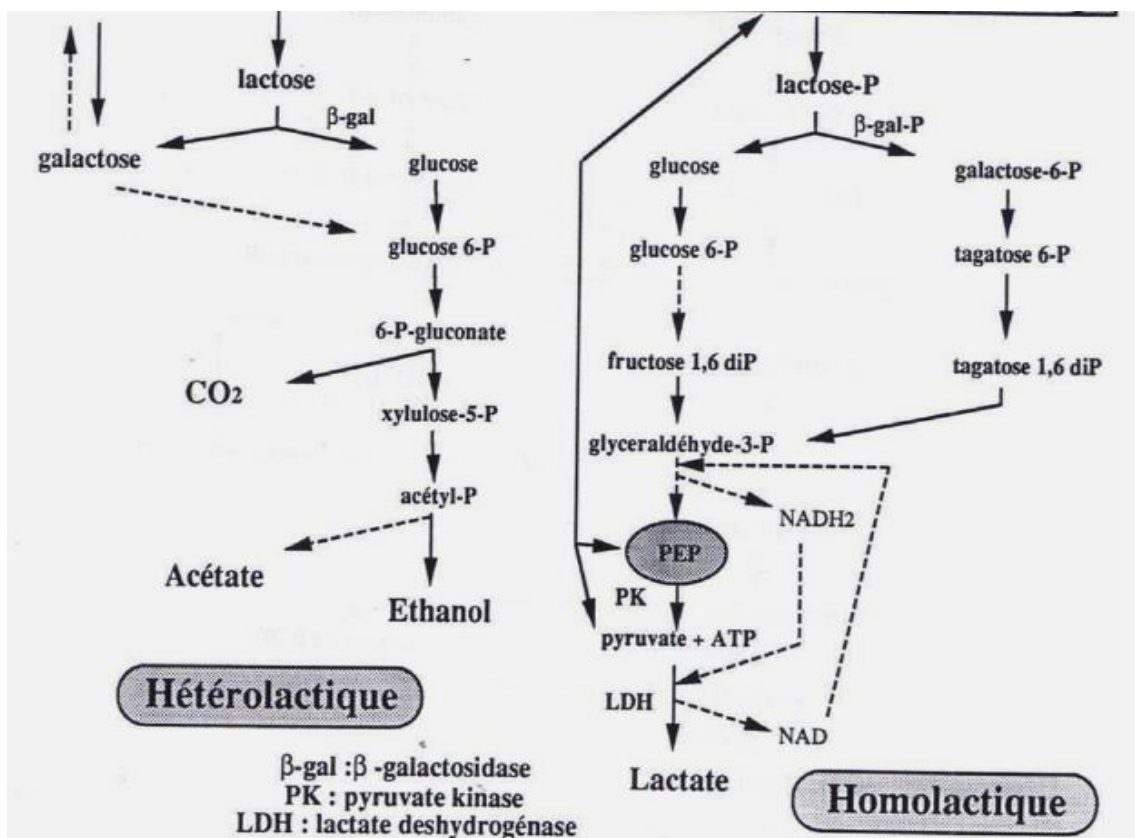


Figure 20. Production des acides organiques par fermentation acide.

### 3.2.3. Microorganisme producteurs des acides organiques

Il est possible de produire des différents acides organiques par plusieurs types microorganismes (Tableau 3).

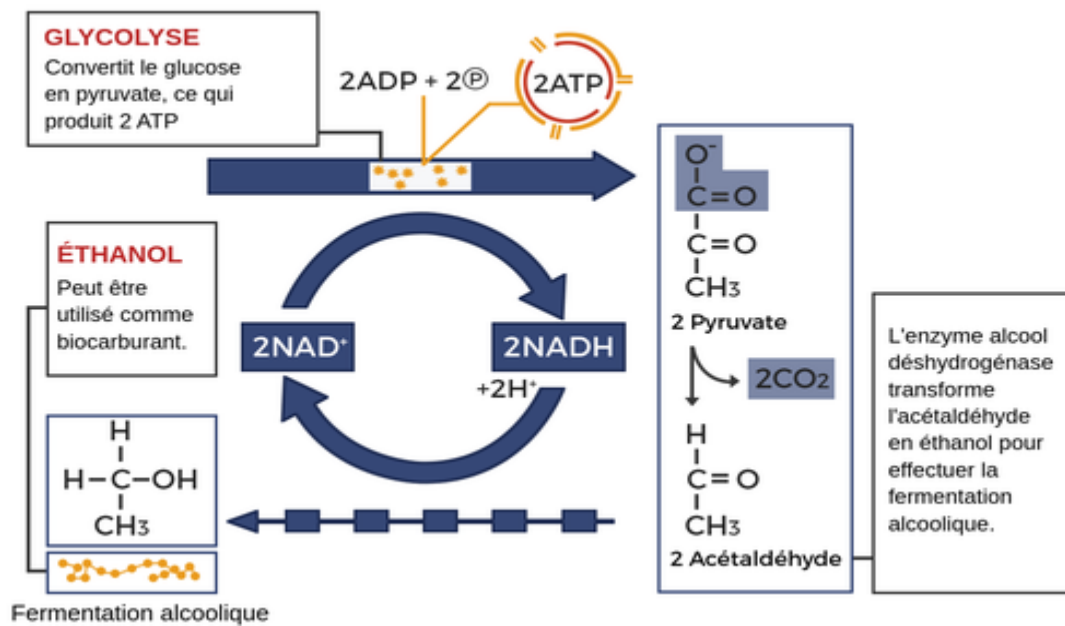
**Tableau 3.** Microorganismes producteurs des acides organiques.

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...

### 3.2.4. Fermentation alcoolique

Dans la fermentation alcoolique, la levure transforme le pyruvate en éthanol (alcool éthylique), ce qui libère du dioxyde de carbone. La transformation du pyruvate s'effectue en deux étapes (**Figure 21**):

- Libération du dioxyde de carbone du pyruvate, qui est transformé en acétaldéhyde, un composé à deux carbones.
- Réduction de l'acétaldéhyde par le NADH en éthanol.



**Figure 21.** Voie de fermentation alcoolique chez les levures.

#### 4. Production des vitamines

Les vitamines sont des micronutriments essentiels qui doivent être présents en quantité faibles chez les mammifères. Du fait qu'elles ne soient pas toutes synthétisées par le corps, ces derniers doivent l'obtenir par les plantes et les microorganismes. Les vitamines se divisent en deux groupes : les hydrosolubles (les vitamines B et la vitamine C) et les liposolubles (les vitamines A, D, E et K).

##### 4.1. Microorganismes producteurs

Plusieurs vitamines sont produites par les micro-organismes. La vitamine B12 peut être obtenue à partir de cultures de *Propionibacterium shermanii* et de *Pseudomonas denitrificans*.

La riboflavine (B2) est produite par les moisissures *Ashbya gossypii* et *Eremothecium ashbyi*. L'ergostérol (précurseur de la vitamine D) et l'acide ascorbique (vitamine C) sont d'autres exemples où des micro-organismes interviennent dans la production. On extrait également de certaines levures (*Saccharomyces*, *Candida*...), un complexe multivitaminique servant de supplément alimentaire.

##### 4.2. Vitamines synthétisées par les microorganismes

Les micro-organismes produisent des vitamines par biosynthèse. Les microorganismes prototrophes ont la capacité de produire tous les éléments nécessaires à leur croissance,

notamment toutes les vitamines nécessaires ; certains en produisent des quantités intéressantes dans l'environnement. Le métabolisme peut être perturbé et la plupart des vitamines ou provitamines peuvent être préparées par des microorganismes (tableau) : pantoténate, pyridoxine, biotine, thiamine, acide folique, acide lipoïque, nicotinamide, riboflavine, cyanocobalamine, précurseurs des vitamines A, C, D, vitamine K, coenzyme Q, inositol... L'intérêt industriel de certaines de ces productions est important, telles que la vitamine B2 ou la riboflavine, et surtout la vitamine B12 ou la cyanocobalamine, dont la seule origine est microbienne. De plus, le  $\beta$ -carotène, que l'on considère comme le précurseur de la vitamine A, est fréquemment fabriqué in vitro.

### **4.3. Exemple du milieu de culture pour la production de la vitamine B12**

Le milieu de culture utilisé pour la production industrielle de vitamine b12 par la bactérie *Propionibacterium freudenreichii* est composé de :

- une source de carbone (glucose, mélasse de betterave, glycérol).
- une source d'azote (hydrolysats de caséine, tryptone, corn steep liquor,...).
- une source de cobalt (COCl<sub>2</sub>).
- un précurseur 5',6-diméthylbenzimidazol.

La culture est maintenue à 30 °C avec un pH de 6.8, pendant 168 h. Les échantillons de culture sont centrifugés à 12000 rpm pendant 10 min à 4 °C et remis en suspension. La vitamine est ensuite extraite par choc thermique pendant 15 min dans un tampon phosphate 0.1 M contenant 0.01% de cyanure de potassium à pH 6. Dans ces conditions, la vitamine B12 est libérée. Un concentré de cette vitamine est préparé après filtration et séchage.

## **5. Production des antibiotiques**

Un antibiotique est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique. Un antibiotique peut être à la fois bactéricide et bactériostatique, selon sa dose.

### **5.1. Classification des antibiotiques**

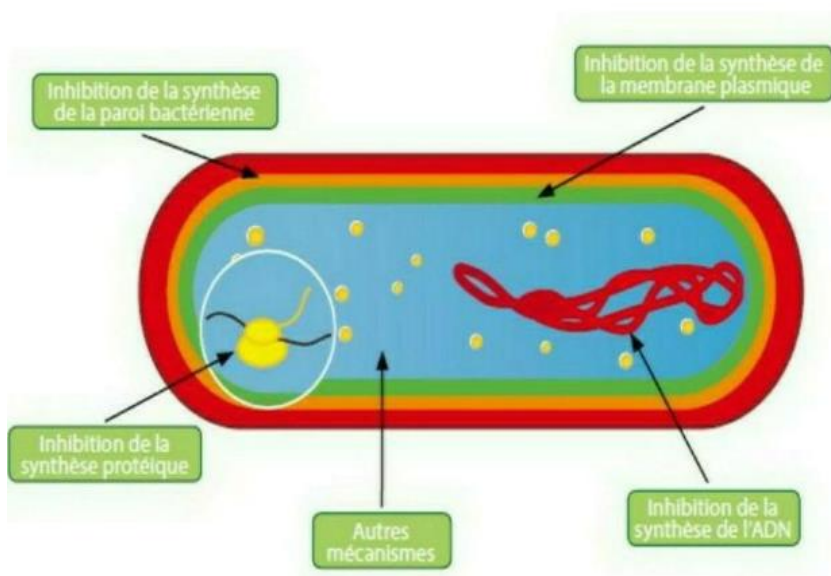
La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- Origine : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)

- Mode d'action : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques
- Spectre d'activité : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)
- Nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse. La classification selon la nature chimique permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$  lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.).

## 5.2. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur des cibles extérieures de la cellule ( paroi ) et ne sont actifs que sur les germes qui sont en croissance. Les antibiotiques bloquent la synthèse du peptidoglycane, la cellule s'allonge sans faire de paroi et ainsi explose sous l'effet de la pression osmotique interne. Les bétalactamines agissent suivant ce mode d'action. la fixation de l'antibiotique va désorganiser la structure et son fonctionnement de membranes et les rendre perméable , ce qui aboutit à la mort rapide de la bactérie. En inhibant la synthèse des protéines, les antibiotique agissent en se fixant sur la sous unité 30S, ce qu' ils entraînent des erreurs de lecture et inhibent l'élongation de la chaîne peptidique. L'inhibition de la réplication de l'ADN soit par inhibition de la transcription / ARN polymérase , ou par diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques est réalisé en presence des antibiotique (**Figure 22**).



**Figure 22.** Mode d'action des antibiotiques

### 5.3. Classes chimiques des antibiotiques

On peut classer Les antibiotiques selon leurs structures chimiques (**Figure 23**).

#### Céphalosporines

Il s'agit d'antibiotiques de type bêta-lactame dont la structure est étroitement liée à celle des pénicillines. Les céphalosporines sont divisées en première, deuxième, troisième, quatrième et cinquième générations, chaque génération ayant un spectre d'activité plus large que la précédente. Les céphalosporines interfèrent avec les parois cellulaires des bactéries en perturbant la synthèse de la couche de peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne.

Les exemples incluent la céfazoline (1ère génération), la céfoxitine (2ème génération), la ceftriaxone (3ème génération), le céfépime (4ème génération) et la ceftaroline (5ème génération..).

#### Aminoglycosides

Ces antibiotiques sont fabriqués à partir de diverses espèces de Streptomyces. Les aminoglycosides agissent en inhibant la synthèse de protéines bactériennes essentielles à la croissance de la bactérie. Leur site d'action est le tube digestif et ils sont donc efficaces pour combattre les infections entériques. La spectinomycine, la streptomycine, la gentamicine, la kanamycine et la néomycine sont des exemples d'aminoglycosides

#### Glycopeptides

Ces antibiotiques agissent en interférant avec la production de protéines et la formation des cellules bactériennes. Ils perturbent la liaison transversale du peptidoglycane. La vancomycine et la teicoplanine sont des exemples de glycopeptides .

#### Macrolides

Ils peuvent être préparés à partir de bactéries Streptomyces. Les macrolides de l'espèce Streptomycine sont bactériostatiques et agissent en interférant dans la production de la protéine bactérienne de liaison 50S. Les macrolides sont efficaces contre Mycoplasma, la pneumonie, Haemophilus influenza et Orhitho bacterium. L'azithromycine, la clarithromycine et l'érythromycine en sont des exemples de cette classe.

#### Sulfonamides

Ils sont principalement produits par synthèse chimique et sont bactériostatiques contre un large spectre de pathogènes. Les sulfamides inhibent la synthèse de l'ADN et de l'ARN.

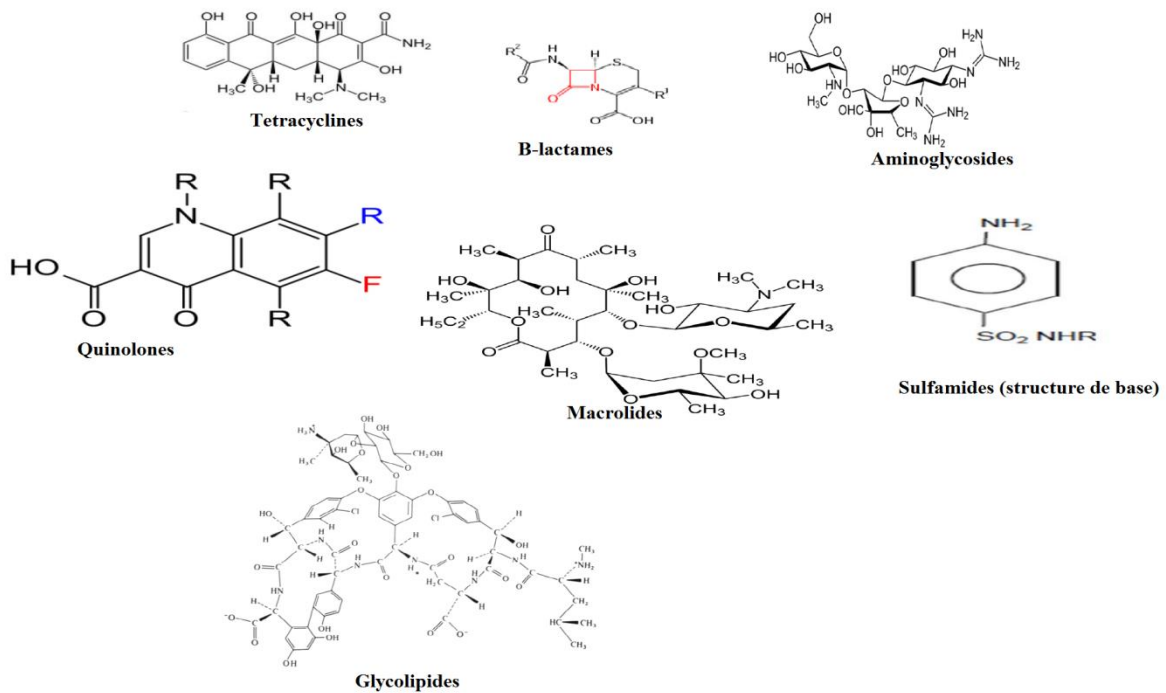
L'ADN et l'ARN sont essentiels à la réplication et à la croissance des cellules. Les sulfamides sont efficaces contre les espèces de staphylocoques, de streptocoques, de salmonelles et d'E. coli. Le triméthoprime et le sulfaméthizole sont des exemples de sulfamides.

### Fluoroquinolones

Ce sont des antibiotiques de synthèse qui ont un effet bactéricide à large spectre. Les fluoroquinolones sont également divisées en première, deuxième, troisième et quatrième générations, chaque génération ayant un spectre d'activité plus large que la précédente. Elles empêchent les bactéries de se multiplier en les empêchant de fabriquer de l'ADN. Les fluoroquinolones sont par exemple l'acide nalidixique (première génération), la ciprofloxacine (deuxième génération), la gatifloxacine (troisième génération) et la moxifloxacine (quatrième génération).

### Tétracyclines

La plupart d'entre elles sont dérivées d'espèces de Streptomyces et ont des effets bactériostatiques à large spectre. Elles empêchent les bactéries de se multiplier en bloquant l'ARNt, tandis que le système immunitaire de l'animal hôte traite l'infection initiale. Les tétracyclines sont efficaces contre les mycoplasmes, les clostridium et certains protozoaires.





**Figure 23.** Classes chimiques des antibiotiques.

#### 5.4. Microorganismes producteurs

Le genre *Streptomyces* est connu comme étant le producteur du plus grand nombre d'antibiotiques, soit 80 % des antibiotiques sécrétés par les actinomycètes. **Le tableau 4** donne quelques exemples sur les microorganismes utilisés pour la production des antibiotique.

**Tableau.4.** exemples des antibiotiques produits par les microorganismes .

Microorganism	Antibiotic
<b>Bacteria</b>	
<i>Streptomyces</i> various species	Amphotericin B
	Chloramphenicol
	Erythromycin
	Kanamycin
	Neomycin
	Nystatin
	Rifampin
	Streptomycin
	Tetracyclines
Vancomycin	
<i>Micromonospora</i> various species	Gentamicin
<i>Bacillus</i> various species	Bacitracin
	Polymyxins
<b>Fungi</b>	
<i>Penicillium</i> various species	Griseofulvin
	Penicillin
<i>Cephalosporium</i> various species	Cephalosporins

#### 6. Antiseptiques

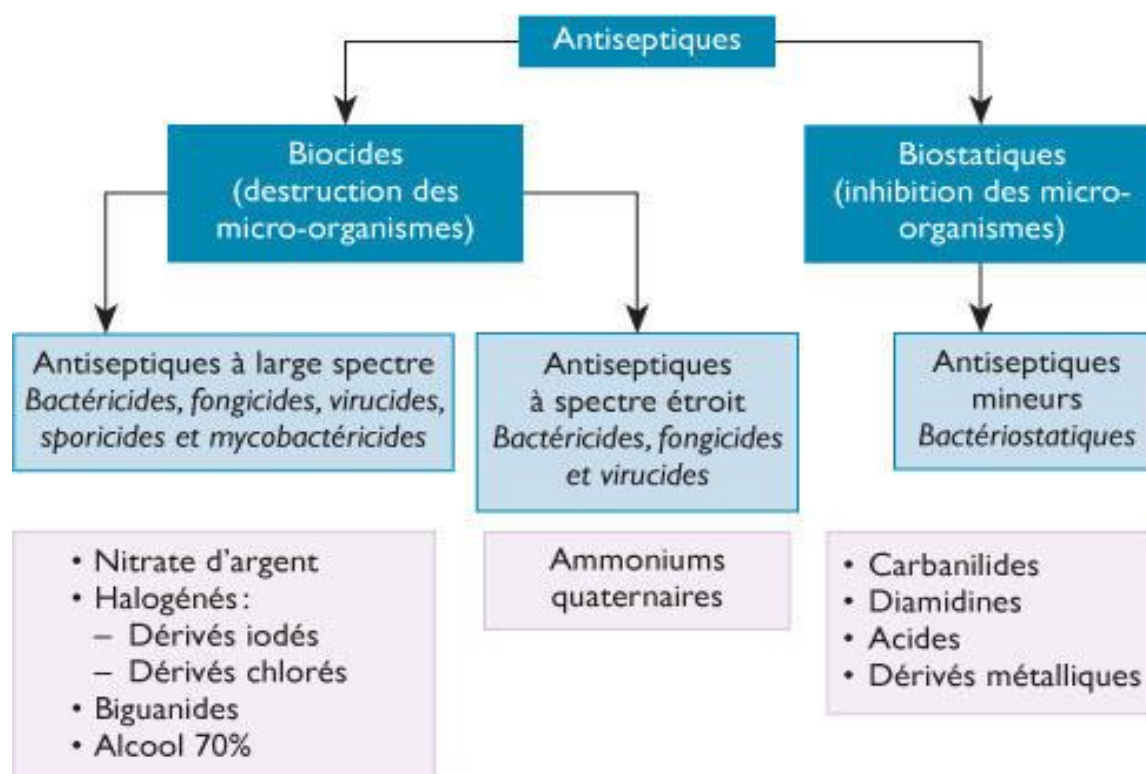
Les antiseptiques sont des substances antimicrobiennes appliquées localement sur la peau pour prévenir ou ralentir la croissance des micro-organismes, tels que les bactéries, les champignons et les virus, qui causent des infections et des maladies.

Il existe deux catégories générales d'antiseptiques : les produits de friction et les produits de lavage. On les trouve dans les produits pharmaceutiques tels que les crèmes, les pommades,

les gels, les gargarismes et d'autres produits tels que les savons et les désinfectants pour les mains. Ils sont essentiels pour contrôler et prévenir la propagation des infections dans les hôpitaux et les autres établissements de soins de santé.

### Types des antiseptiques

L'alcool isopropylique (isopropanol) et l'alcool éthylique (éthanol) et sont les alcools les plus largement utilisés. Ils peuvent être utilisés à des concentrations allant de 30-90% en solution aqueuse; l'efficacité de ces produits est obtenue avec l'éthanol à 70% ou isopropanol à 50%. La **figure 24** représente les classes des antiseptiques.



**Figure 24.** Classes des antiseptiques.

### Microorganisme producteur

L'isopropanol est largement utilisé comme biocarburant, additif de carburant, alcool à friction et intermédiaire dans divers domaines. Un *Corynebacterium glutamicum* modifié génétiquement surproduit de l'isopropanol par des quantités élevées.

## 7. Polysaccharides

Les polysaccharides bactériens sont biosynthétisés naturellement par de nombreuses bactéries. Ils sont sécrétés soit sous forme d'une capsule fixée à la cellule, soit sous la forme d'une gangue visqueuse en solution. Ce dernier cas est le plus intéressant car la récupération du polysaccharide en est facilitée.

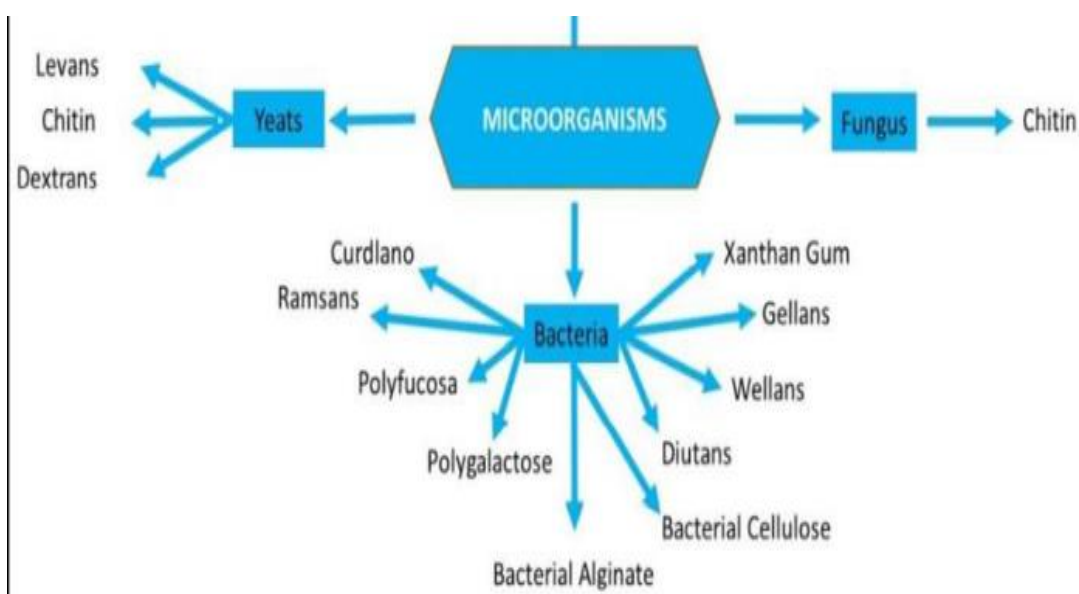
### Exemples des polysaccharides et leurs utilisations

-Il a trouvé que les dextrans sont utilisés pour la première fois dans le support chromatographique et dans le plasma sanguin pour moduler l'écoulement du sang.

-Dans les produits laitiers, les dextrans sont utilisés comme additifs alimentaires et agissent comme texturants en augmentant la viscosité et comme stabilisateurs.

-Les polysaccharides bactériens sont antigéniques et quelques-uns sont utilisés comme vaccins.

-La gomme xanthane a été utilisée dans un grand nombre d'applications, en tant qu'agent de suspension, un stabilisateur d'émulsion, un amplificateur de mousse ou un améliorant du volume de la pâte, mais il est également utilisé comme adhésif et pour l'inhibition de la formation de cristaux de glace, tant dans les industries alimentaires que non alimentaires (**Figure 25**).



**Figure 25.** Production des polysaccharides chez les microorganismes

*Propionibacterium acidipropionici* a produit 10 à 17 g.l<sup>-1</sup> d'un exopolysaccharide sur un milieu à base de lactosérum déprotéiné dans les conditions optimales où 60 g.l<sup>-1</sup> de lactose, 0.25 g.l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl et 6.0 g.l<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O étaient ajoutés au milieu ajusté à pH 7.0, incubé à 25°C, 60 à 100 heures. Les principaux constituants du polymère identifiés ont été le glucose, le galactose, un 5-méthylpentose et l'acide uronique dans une proportion de 8 à 10%. La masse moléculaire de l'exopolysaccharide était inférieure à 5800 daltons.

## 8 Toxines

Les toxines sont des substances produites par des micro-organismes, principalement des bactéries (bactériotoxines) et des champignons microscopiques (mycotoxines).

### 8.1. Endotoxines

L'endotoxine est associée dans la paroi de bactéries à Gram négatif et libérée lors de la lyse de ces bactéries. De nature lipopolysaccharidique, les endotoxines sont présentes au niveau de la membrane externe de la plupart des bactéries à Gram négatif et des cyanobactéries. Lors de la lyse de la bactérie, l'endotoxine est libérée. Les différentes endotoxines présentent des modes d'action très similaires. La structure du complexe lipopolysaccharidique (LPS) comporte notamment le lipide A, une diphosphoglucosamine liée à des acides gras, qui est l'élément responsable de l'activité toxique. Les LPS jouent un rôle important dans l'activation du système immunitaire. Leur action est le résultat de la sécrétion de médiateurs par les cellules de l'organisme infecté. Les principales sont l'entérotoxine cholérique (*Vibrio cholerae*) et l'endotoxine typhoïdienne (*Salmonella*). Certains produits peuvent jouer un grand rôle dans la lutte biologique (insecticide).

### 8.2. Exotoxines

L'exotoxine ont une nature protéique, très actives mais thermolabiles, excrétées généralement pendant la croissance et rencontrées essentiellement chez des bactéries à Gram positif. Les principales sont la toxine diphtérique (*Corynebacterium diphtheriae*), les entérotoxines staphylococciques (*Staphylococcus aureus*), la toxine tétanique (*Clostridium tetani*), les toxines botuliniques (*Clostridium botulinum*), les toxines de *Clostridium perfringens*. Elles sont utilisées comme source d'antigènes mais surtout comme source d'anatoxines (vaccins).

Le **tableau 5** résume les différences entre les endotoxines et exotoxine.

**Tableau 5.** Différences entre les endotoxines et exotoxine.

	<b>Toxines protéiques (exotoxines)</b>	<b>Toxines LPS (endotoxines)</b>
<b>Nature</b>	Protéique	Molécules lipidiques et saccharidiques
<b>Solubilité dans un milieu aqueux</b>	Soluble	Non soluble
<b>Résistance à la chaleur</b>	Thermolabiles, elles sont détruites entre 60°C et 80°C	Thermostables
<b>Pouvoir toxique</b>	<b>Très élevé.</b> Ces substances sont toxiques à des doses très faibles (environ quelques µg/kg) Ce sont les substances connues les plus létales.	<b>Faible.</b> Il faut une concentration élevée de toxine pour être pathogène (environ quelques mg/kg).
<b>Immunogénicité</b>	Fortement immunogènes Stimule la production d'anticorps neutralisants, <b>antitoxines</b> Sont neutralisées par le formaldéhyde pour produire des <b>anatoxines</b> , Fabrication de <b>vaccin</b>	<b>Faiblement immunogènes.</b> Fabrication de vaccin difficile.
<b>Exemple</b>	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>

### 8.3. Mycotoxines

Diverses moisissures excrètent aussi des substances toxiques :

**Alcaloïdes:** ces substances sont produites par *Claviceps purpurea* et sont dotées de propriétés pharmacologiques et ont un intérêt médical.

**Aflatoxines** et autres **mycotoxines** : les aflatoxines dérivées de la coumarine sont produites par *Aspergillus flavus*. De nombreuses autres moisissures produisent des mycotoxines. L'intérêt de la production de ces mycotoxines est faible.

### 9. Enzymes

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa). Elles catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses, par rapport à la réaction en leur absence. En effet, les enzymes sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés

métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires.

### **9.1. Classe des enzymes**

la classification des enzymes est basée sur des critères de spécificité. Une enzyme possède un numéro de code, précédé des lettres E.C. (Enzyme commission) et comportant 4 chiffres séparés par des points. L'enzyme s'écrit de manière générale sous la forme : E.C. X1.X2.X3.X4.

X1 : Varie de 1 à 6 et indique les 6 types de réactions catalysées par les enzymes (classe)

1. Oxydoréductase (Réaction oxydation – réduction)
2. Transférase (Transfert des groupements fonctionnels)
3. Hydrolase (Réaction hydrolytique)
4. Lyase (Réaction d'élimination pour former des liaisons doubles)
5. Isomérase (isomérisation)
6. Ligase (Union de molécules couplée à l'hydrolyse de l'ATP).

### **9.2. Utilisation des enzymes**

On utilise des enzymes dans différentes industries, telles que la préparation de la pâte, la fabrication de bière, les détergents, les produits fermentés, les médicaments. Nous présentons une série de procédés illustrant l'utilisation des enzymes :

- Les enzymes jouent de nombreux rôles importants et essentiels dans les industries pharmaceutiques et diagnostiques. On les utilise fréquemment comme des médicaments traitants dans des problèmes de santé liés à la carence en enzymes et à des troubles digestifs, ainsi que dans des procédures diagnostiques telles que l'ELISA et les kits de test de diabète.
- Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie. Elles représentent environ 25 à 33% du marché mondial des enzymes. En effet, les amylases possèdent une gamme étendue d'applications tels que les industries de la saccharification d'amidon, le textile, les aliments, le boulangerie, le brassage et la distillation

### **9.3. Microorganismes producteurs**

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont les végétaux, les animaux et les microorganismes. Ces derniers constituent la principale source d'enzymes industrielles: 50% proviennent des champignons et des levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétale ou animale. L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler (**Tableau 6**).

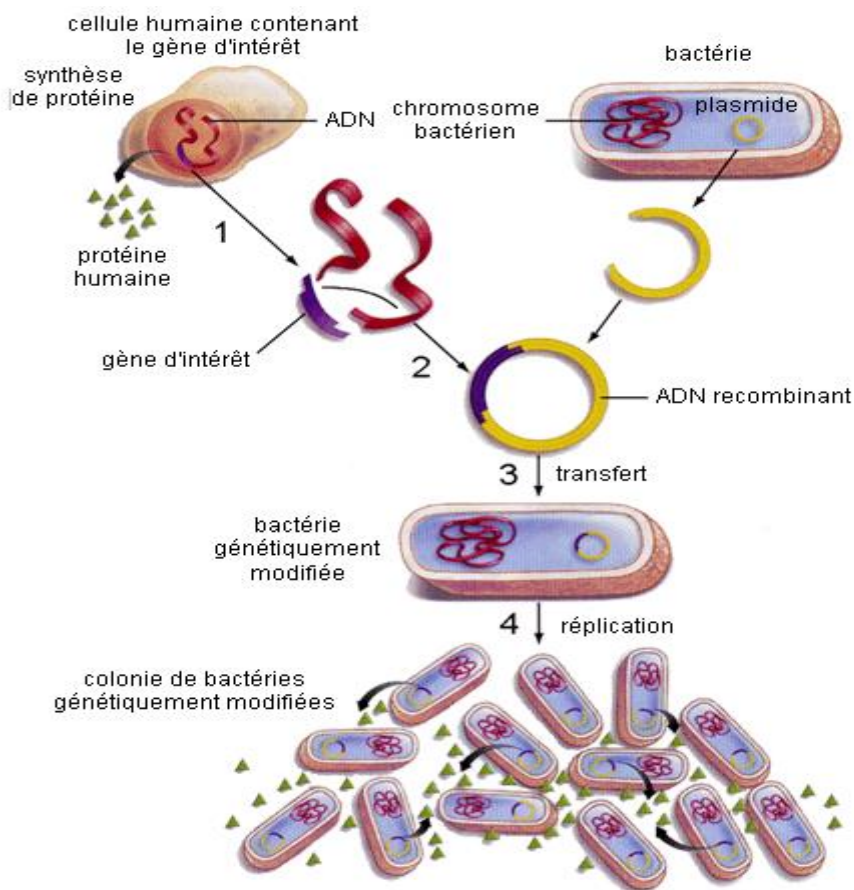
**Tableau 6.** Microorganismes producteurs des enzymes.

<b>Enzymes</b>	<b>Micro-organismes producteurs</b>
<b>Invertase</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> ; <i>Aspergillus usamii</i>
<b>Lipase</b>	<i>Mucor javanicus</i> ; <i>Lucor mihei</i> <i>Rhizopus arrhizus</i> ; <i>Aspergillus effusus</i>
<b>Pectinestérase, Pectine lyase, Polygalacturonase</b>	<i>Aspergillus usamii</i> ; <i>Aspergillus wentii</i> <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Penicillium funiculosum</i>
<b>Alpha amylase</b>	<i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Aspergillus oryzae</i>
<b>Glucose isomérase</b>	<i>Streptomyces albus</i> <i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>Bacillus coagulans</i>
<b>Lactase</b>	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>

## 10. hormones

Les bactéries sont conçues pour produire des hormones humaines grâce à un procédé appelé technologie de l'ADN recombinant ou génie génétique. La technologie de l'ADN recombinant implique la manipulation de l'ADN pour créer de nouvelles combinaisons de gènes, qui peuvent ensuite être insérées dans des organismes tels que des bactéries. Ce procédé est utilisé pour concevoir des bactéries afin de produire des hormones humaines. La première étape de ce procédé consiste à isoler le gène qui code pour l'hormone souhaitée de l'ADN humain. Cela se fait souvent à l'aide d'enzymes appelées endonucléases de restriction, qui peuvent couper l'ADN au niveau de séquences spécifiques. Une fois le gène isolé, il est inséré dans un petit morceau circulaire d'ADN appelé plasmide, que l'on trouve naturellement dans les bactéries. Cela se fait à l'aide

d'une autre enzyme, l'ADN ligase, qui peut réunir de morceaux d'ADN. Le plasmide, qui contient désormais le gène humain, est ensuite introduit dans une cellule bactérienne dans un processus appelé transformation. Les bactéries peuvent alors se répliquer, produisant de nombreuses copies du plasmide et du gène humain qu'il contient. Au fur et à mesure que les bactéries se développent et se divisent, elles produisent également l'hormone humaine, qui peut ensuite être récoltée et purifiée pour être utilisée en médecine. Ce procédé a été utilisé pour produire diverses hormones humaines dans des bactéries, notamment l'insuline, l'hormone de croissance et l'érythropoïétine. Par exemple, avant le développement de la technologie de l'ADN recombinant, l'insuline était extraite du pancréas de porcs et de vaches, un procédé coûteux qui pouvait provoquer des réactions allergiques chez certains patients. Aujourd'hui, grâce au génie génétique, les bactéries peuvent produire de l'insuline humaine identique à celle produite par le corps humain, ce qui la rend plus sûre et plus efficace pour les patients diabétiques (**Figure 26**).



**Figure 26.** Etapes de production des hormones par transduction génétique.



Les bactéries *d'E. coli* est utilisées pour la production de l'insuline, hormone de croissance, interferon, interleukine-2...etc

*S. cerivisiae* est utilisé pour la production d'antigène de surface de virus de l'hépatite B, nsuline, hirudine. On peut utiliser d'autres bactéries comme bacillus subtilis et streptomyces.

## 11. Médiateurs chimiques

Lors de l'introduction d'un pathogène dans l'organisme, des cellules de l'immunité innée résidentes des tissus (macrophages, cellules dendritiques et mastocytes) produisent des médiateurs chimiques qui déclenchent et stimulent la réaction inflammatoire. Ce sont ces médiateurs qui sont responsables des manifestations caractéristiques de l'inflammation: augmentation de la perméabilité vasculaire, vasodilatation, fièvre et douleur. Il existe un grand nombre de médiateurs solubles impliqués dans les réactions inflammatoires, dont des médiateurs "emblématiques" retenus ci-dessous:

**Tableau 7.** Nature, origine et rôle des médiateurs chimiques

Nom	Nature et origine	Rôle
<b>Histamine</b>	Amine stockée dans les granules des mastocytes	Molécule vasoactive.
<b>Prostaglandines</b>	Médiateurs lipidiques néoformés à la suite de l'activation des mastocytes.	Impliqués dans la vasodilatation. Augmentent la sensibilité aux stimuli douloureux et la température de référence dans l'hypothalamus.
<b>Cytokines proinflammatoires (TNF, IL1 et IL6)</b>	Médiateurs libérés par les mastocytes et les macrophages.	Augmentent le recrutement et la production des cellules et molécules de l'immunité.

### 11.1. Microorganisme producteur

Depuis longtemps, le microbiote est soupçonné d'être à l'origine de l'activation des phénomènes inflammatoires. C'est maintenant établi, une bactérie, *Faecalibacterium prausnitzii*, colonise l'intestin des individus sains, mais est très peu présente, voire absente, dans l'épithélium intestinal des patients. Les patients qui ont été opérés ont un risque accru d'avoir une inflammation de l'intestin dès lors que leur concentration en *Faecalibacterium*

*prausnitzii* est faible. La bactérie possède des propriétés anti-inflammatoires in vitro : elle bloque la production de cytokines inflammatoires par les cellules du système immunitaire et stimule la production de cytokines anti-inflammatoires. En outre, elle réduit les symptômes dans un modèle expérimental de souris souffrant de la maladie de Crohn. Un probiotique – un micro-organisme vivant ayant des effets positifs sur la santé de celui qui le consomme – ou les molécules anti-inflammatoires que *Faecalibacterium prausnitzii* synthétise pourraient être utilisées dans le traitement des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques intestinales.

## Références

1. Atmanto, Y. K. A. A., Paramita, K., & Handayani, I. (2022). Culture media. *International Research Journal of Modernization in Engineering Technology and Science*, 4(4), 2213-2225.
2. Ahmad, N. H., Mustafa, S., & Che Man, Y. B. (2015). Microbial polysaccharides and their modification approaches: a review. *International Journal of Food Properties*, 18(2), 332-347.
3. Dowling, A., O'Dwyer, J., & Adley, C. (2017). Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs*, 1, 536-545.
4. Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. (2019). Microbial enzymes—an overview. *Advances in enzyme technology*, 1-40.
5. Leveau J-Y and Bouix M. (1993) Microbiologie industrielle: Les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition Technique et documentation. 612 pages.
6. Madigan M and Martinko J. (2007). Brock Biologie des micro-organismes. 11<sup>e</sup> édition. Edition Pearson Education. France. 1047 pages.
7. Mayo, A. W., & Noike, T. (1996). Effects of temperature and pH on the growth of heterotrophic bacteria in waste stabilization ponds. *Water Research*, 30(2), 447-455.
8. Gilbert, P., Hodgson, A. E., & Brown, M. R. (2018). Influence of the environment on the properties of microorganisms grown in association with surfaces. In *Microbiological quality assurance* (pp. 61-82). CRC Press.
9. Suman, G., Nupur, M., Anuradha, S., & Pradeep, B. (2015). Single cell protein production: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(9), 251-262.
10. Prescott L-M, Harley J-P, Klein D. Microbiologie. 2<sup>e</sup>me edition. Deboeck. 1133 pages.
11. Hayat, S. M., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant protein expression in Escherichia coli (E. coli): what we need to know. *Current pharmaceutical design*, 24(6), 718-725.
12. Averianova, L. A., Balabanova, L. A., Son, O. M., Podvolotskaya, A. B., & Tekutyeva, L. A. (2020). Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: an overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 570828.

13. Survase, S. A., Bajaj, I. B., & Singhal, R. S. (2006). Biotechnological production of vitamins. *Food Technology & Biotechnology*, 44(3).
14. Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of biotechnology*, 104(1-3), 155-172.
15. Fang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B 12: a review and future perspectives. *Microbial cell factories*, 16, 1-14.
16. Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016). Morphological identification of actinobacteria. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, 59-86.
17. Zakhartsev, M., & Reuss, M. (2018). Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. *FEMS yeast research*, 18(6), foy052.
18. van Teeseling, M. C., de Pedro, M. A., & Cava, F. (2017). Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Frontiers in microbiology*, 8, 1264.
19. Fagerbakke, K. M., Heldal, M., & Norland, S. (1996). Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 10(1), 15-27.
20. Panda, S. K., Sahu, L., Behera, S. K., & Ray, R. C. (2019). Research and production of organic acids and industrial potential. *Bioprocessing for biomolecules production*, 195-209.
21. Hirasawa, T., & Shimizu, H. (2016). Recent advances in amino acid production by microbial cells. *Current opinion in biotechnology*, 42, 133-146.
22. Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369-378.
23. Ko, Y. J., Cha, J., Jeong, W. Y., Lee, M. E., Cho, B. H., Nisha, B., ... & Han, S. O. (2022). Bio-isopropanol production in *Corynebacterium glutamicum*: Metabolic redesign of synthetic bypasses and two-stage fermentation with gas stripping. *Bioresource technology*, 354, 127171.