

Extraction, séparation et purification des métabolites

Le produit recherché est souvent présent à faible concentration dans un milieu aqueux qui renferme à la fois des substances dissoutes et en suspension. Parfois, il se trouve à l'intérieur des cellules qu'il faut faire éclater. Le milieu contient au départ des substances de bas poids moléculaire (PM) (sels minéraux, oses) et des produits complexes de haut PM (farine de soja). En fin de culture, la teneur en substances nutritives est faible tandis que les produits de fermentation s'accumulent. En outre, il y'a une grande quantité de cellules microbiennes.

1) Préparation du matériel biologique

- Métabolite extracellulaire : séparation des cellules de la solution.
- Métabolite intracellulaire : complètement ou partiellement endocellulaire (AT B).

Pour augmenter la perméabilité des cellules, on peut modifier le pH (acidification) ou ajouter des solvants (chloroforme).

La libération des métabolites endocellulaires peut se faire par plusieurs méthodes : enzymes détruisant la paroi, choc osmotique, choc thermique, ultrason, alternance congélation / décongélation, désintégration mécanique avec des billes de verre animées d'une grande vitesse, broyage du mycélium congelé à -30°C.

2) Élimination des insolubles

Cette étape consiste en la séparation des métabolites extracellulaires des cellules et des métabolites intracellulaires des fragments cellulaires. C'est une étape difficile vu :

- La taille faible des bactéries
- La légère différence de densité entre les cellules et le milieu de culture.

A l'échelle industrielle :

- Centrifugation → (gravitation).
- Filtration → (action mécanique)
- Flocculation → (gravitation)
- Flottation → (action de surface)

2.1. Centrifugation

Elle permet de recueillir ou d'éliminer les microorganismes unicellulaires, bactérie ou levure. Les divers types de centrifugeuses utilisées en fonction des dimensions de cellules que l'on veut récupérer :

| Types de cellule | Dimension (μ) | Types de centrifugeuse |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Virus et phages | 0,01-0,1 | Ultracentrifugeuse |
| Bactéries | 0,3-3,0 | Centrifugeuse normale |
| Levures | 4,0 -7,0 | Centrifugeuse normale |
| Champignons filamenteux | 10,0-15,0 | Centrifugeuse normale |

Les bactéries, dont la taille est plus petite que les levures, nécessite une centrifugation 25 fois plus importante pour être séparées : d'où un handicap économique important en vue de leur utilisation comme protéines alimentaires.

2.2. Filtration

Elle sert à séparer un mycélium du moût qui le contient.

❖ **Filtration-presses** : servent à filtrer de petits volumes pour éliminer tout précipité formé au cours de la purification.

Le taux de filtration est fonction de point la superficie du filtre, de la pression, viscosité et de la résistance sédiment (gâteaux).

- Pour un liquide clair, le débit de la filtration est constant et le volume du filtrat augmente linéairement avec le temps.

- Pour la filtration de suspension, l'augmentation de l'épaisseur du sédiment diminue le débit de filtration.

Remarque :

La compressibilité du matériel biologique peut causer certaines difficultés. La résistance du sédiment (gâteaux) dépend de la pression appliquée. Au delà d'une certaine limite, le gâteau risque de s'effondre et un blocage total du filtre peut survenir.

❖ **Filtre à vide à tambour qui rotatifs** : méthode de choix, car le matériel biologique est facilement compressible. Ils sont utilisés dans la filtration en continu de larges volumes.

Les actinomycètes, par suite de la finesse de leurs filaments, posent un sérieux problème. Il est nécessaire d'ajouter un adjuvant de filtration (cellulose, animale, perlite.....) qui se fixe sur les toiles filtrantes, retenant le sédiment, tandis que le liquide filtré est aspiré à l'intérieur du tambour par le vide. Une lame fixe (couteau) décolle automatiquement l'excès du sédiment.

2.3. Flocculation

Centrifugation : la taille petite des cellules et la légère différence de densité entre les cellules et le milieu de culture → sédimentation faible.

*Cours Microbiologie industrielle/ MI TAA /
Extraction, séparation et purification des métabolites*

Filtration : nature compressible du microorganisme = facteur limitant = perméabilité du sédiment → filtration trop longue.

Le principe de la floculation repose sur la neutralisation des charges électriques présentes à la surface des cellules aboutissant à leur sédimentation.

Les agents floculant utilisés : sulfate d'alumine (1-2%), CaCl₂ (0,1-0,5%).

Un agent floculant doit :

- Réagir rapidement avec les cellules.
- Etre non toxique.
- Ne pas agir sur les constituants cellulaires.
- Etre bon marché et agir à faible dose.

Les bactéries peuvent flocculer avec des poly-électrolytes synthétiques (polyacrylamide) sans neutralisation de charges. Il y a absorption du polymère sur les cellules et une liaison des polymères hydrophiles sont également utilisés pour la floculation des cellules (gélatine, CMC, alginates).

2.4. Flottation

La séparation se fait dans un liquide contenant des particules solides en suspension (cellules bactériennes). Les cellules se fixent sur les bulles d'un gaz qui se forme dans la suspension. La flottation de particules adhérentes aux bulles permet de les éliminer sous forme de mousse.

3) Extraction par les solvants

Les solvants utilisés sont les cétones, éthers et les alcools.

Exp. extraction des dextrans produits par *Leuconostoc mesenteroides* à partir de glucose.

A la fin de la fermentation, un volume égal de méthanol est ajouté au moût. Les dextrans se précipitent, tandis que les protéines, le fructose et les autres constituants restent dans le surnageant.

Les produits qui se trouvent dans le moût en solution aqueuse vont se diviser entre les deux phases aqueuse et solvant selon un coefficient de partage K : $K = C_s / C_e$

❖ Exp. Pénicilline. :

- forme sodique : soluble dans l'eau
- forme acide : soluble dans les solvants

Pour l'extraire → inversion de pH

Le solvant utilisé est l'acétate d'amyle à pH 2

Le moût filtré est mélangé avec du solvant → agitation

La pénicilline passe dans le solvant sous la forme acide, on modifie alors le pH en mélangeant le solvant avec 5% du tampon sodique à pH 8. Le pénicillinate de NA passe dans la solution aqueuse ou il est beaucoup plus concentré que dans le moût et débarrassé de beaucoup d'impuretés.

4) Concentration

Ultrafiltration sur membrane peut avoir de nombreuses applications :

- Concentration des macromolécules (protéine)
- Élimination de substances de faibles PM.

Habituellement, elle est utilisée pour la concentration du produit recherché ou pour séparer un mélange de solutés constitué de grande et de petites molécules. C'est une technique onéreuse (pression haute) car les membranes ont une durée de vie de 6 mois à 2 ans.

- Lyophilisation.

- Précipitation : sels, solvants.

Certain ATB peuvent être précipité directement dans le moût clarifié après filtration ; formation de complexe insoluble ATB sels d'ammonium quaternaire.

5) PURIFICATION

A / chromatographie d'exclusion moléculaire

Elle sépare les molécules en fonction de leur taille selon qu'elles pénètrent ou non dans les mailles d'un gel. Les molécules dont la taille est grande a celle des plus pores du gel migrent dans la phase aqueuse entourant les grains du gel et quittent les premières le lit du gel (elles sont exclues). Les molécules plus petites pénètrent dans le gel ou elles séjournent plus ou moins longtemps selon leur masse moléculaire (+ grand → +petit).

Gels utilisés : polymères linéaires (dextrane, agarose, Sephadex).

B/ chromatographie échangeuse d'ions

Elle sépare les molécules en fonction de leurs charges.

Les échangeuses d'ions sont des substances hautement polymérisées (ion énorme, insoluble, chargé sur le quel viennent se fixer des ions de petites tailles de signe opposé).

= échangeurs cationiques (fixent les anions)

{ Résines, cellulosique : DEAE⁺, QEAE⁺ }

= échangeurs anionique (fixent les cations) (CM⁻).

Il s'agit de fixer le composé à séparer (solution) sur un adsorbant solide puis à l'éluer par un tampon dont l'une des propriétés change brutalement (pH, M).

Exp : le pH reste fixe et il y a addition de NaCl de 0,1M → 0,5M.