







Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/22755>

To cite this version:

Bouras, Noureddine  and Mokrane, Salim and Bouras, H.D. and Kemassi, A. and Brandam, Cédric  and Lebrihi, Ahmed  and Mathieu, Florence  and Sabaou, Nasseridine *Kinetic study of the growth of *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 in batch fermenter on a semi-synthetic medium in the presence of tiglic acid and methacrylic acid.* (2015) Revue « ELWAHAT » pour les Recherches et les Etudes, 8 (1). 19-35. ISSN 1112-7163

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

Etude cinétique de la croissance de *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 en fermenteur batch sur un milieu semi-synthétique en présence d'acide tiglique et d'acide méthacrylique

BOURAS N.^{1,2,3}, MOKRANE S.², BOURAS H.D.⁴, KEMASSI A.³,
BRANDAM C.¹, LEBRIHI A.¹, MATHIEU F.¹ et SABAOU N.²

- 1- Université de Toulouse, INPT-ENSAT, Laboratoire de Génie Chimique, UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), Département de Bioprocédés et Systèmes Microbiens, France;
- 2- Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie;
- 3- Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455, Ghardaïa 47000, Algérie;
- 4- Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse (LPBVB), le Normale Supérieure de Kouba, B.P. 92, 16 050 Vieux-Kouba, Alger, Algeria

Correspondance: noureddine_bouras@yahoo.fr

Résumé-

Ce travail s'est donné pour objectif l'étude cinétique de l'effet de certains nutriments (acide tiglique et acide méthacrylique) sur la croissance de *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 en fermenteur batch dans un milieu semi-synthétique.

Des fermentations contrôlées dans des fermenteurs en batch ont été effectuées en présence de l'acide tiglique et de l'acide méthacrylique, pris un à un, pour affiner les résultats obtenus en Erlenmeyers. D'après les résultats obtenus, la croissance de *S. algeriensis* dans les deux fermentations est très rapide pendant les premières heures de culture. Les cellules de la culture témoin subissent une lyse cellulaire assez marquée alors que les cellules en présence des acides organiques se maintiennent bien. Les acides organiques en tant que source de carbone permettent la conservation de l'intégrité des cellules. La formation de la biomasse est soumise à la régulation par les deux acides organiques ajoutés. Les résultats obtenus en fermenteurs ne sont pas exactement les mêmes que ceux obtenus en Erlenmeyers d'un point de vue qualitatif et quantitatif.

Mot clés: *Saccharothrix algeriensis*, fermentation, biomasse, acide tiglic, acide méthacrylique.

Kinetic study of the growth of *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 in batch fermenter on a semi-synthetic medium in the presence of tiglic acid and methacrylic acid

Abstract-

This work aimed to investigate the effect of some nutrients (tiglic acid and methacrylic acid) on the growth of *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 on chemically defined medium (semi-synthetic medium) by using controlled batch fermenters.

The controlled batch fermentations were conducted in the presence of tiglic and methacrylic acids. The growth rate of *S. algeriensis* in all fermentations was fast during the first 10 h of fermentation. The control culture showed a partially cell lysis in comparison to cultures with organic acids. This result showing that these organic acids could be used for biomass maintaining. The formation of biomass was influenced by the addition of organic acids. The experiment in the fermentor showed some differences with results obtained in Erlenmeyers.

1- Introduction

Les actinobactéries, microorganismes procaryotes, sont des bactéries à Gram positif qui tendent à former des filaments ramifiés lesquels peuvent être assez développés pour former un véritable mycélium. Le diamètre de ces filaments varie généralement entre 0,5 et 2 µm. Ils sont définis par un taux élevé en guanine et cytosine (supérieur à 55%), ce qui les sépare des autres procaryotes ayant un taux inférieur en G+C (Holt et al., 1994). Ce groupe englobe des genres très diversifiés dans leur morphologie. On retrouve la forme cocci (*Micrococcus*), ou une alternance "bacille-cocci" (*Arthrobacter*) mais la majorité tendent à former des filaments ramifiés, fragmentés (*Nocardia*, *Rhodococcus*), ou non (*Micromonospora*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, etc.) (Boudjella, 2007).

La production de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (principalement les antibiotiques) est actuellement une préoccupation importante à l'échelle mondiale du fait de la prolifération de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques actuellement disponibles. *Saccharothrix algeriensis* est une bactérie filamenteuse appartient au

groupe des actinobactéries. Celle-ci s'est avérée productrice de molécules de la classe des dithiopyrrolones et présente des activités antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses intéressantes (Lamari et al., 2002a,b; Minamiguchi et al., 2001; Oliva et al., 2001; Webster et al., 2000).

La production des métabolites secondaires peut être réalisée sous trois conditions. Premièrement, il est nécessaire d'avoir des usines cellulaires pour synthétiser la molécule, c'est-à-dire de la biomasse; deuxièmement, les précurseurs doivent être présents; et troisièmement, les enzymes capables de transformer ces précurseurs, doivent être aussi présentes et actives (Voelker et Altaba, 2001).

Les travaux antérieurs réalisés dans des Erlenmeyers ont montré que la production, par *Saccharothrix algeriensis*, des antibiotiques dithiopyrrolones (la thiolutine, la sénécioyl-pyrrothine, la tigloyl-pyrrothine, l'isobutyryl-pyrrothine et la butanoyl-pyrrothine) est influencée par la nature et la concentration de différents acides organiques ajoutés dans le milieu de culture (Bouras, 2005; Bouras et al., 2007, 2008). Ainsi, des concentrations de 2,5 mM d'acide tiglique et de 5 mM d'acide méthacrylique mènent à une meilleure production de la tigloyl-pyrrothine et de la butanoyl-pyrrothine, respectivement.

Afin d'affiner nos résultats dans des conditions mieux contrôlables, nous avons choisi deux acides organiques: l'acide tiglique (à 2,50 mM) et l'acide méthacrylique (à 5 mM). Ces acides organiques ont été testés pour la croissance de *S. algeriensis* sur le milieu semi synthétique de base (MSS) contenant 25 g/l de glucose.

2- Matériel et méthodes

2.1.- Microorganisme

Saccharothrix algeriensis DSM 44581 (NRRL B-24137) a été isolée à partir d'un échantillon de sol saharien de la palmeraie d'Adrar (oasis du Sud-Ouest algérien). Cette espèce d'actinobactérie est productrice d'antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones (Lamari et al., 2002a,b).

2.2.- Chromatographie liquide à haute performance

Système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) équipé d'un injecteur automatique Thermo Separation Products® Spectra

Series Autosampler AS100TM, avec une boucle d'injection de 20 μ L; une pompe Spectra System P1000XR (Thermo Separation Products); un détecteur réfractométrique différentiel Spectra Physics Refracto Monitor IV de Thermo Separation Products SP 8430TM; une colonne de résine cationique (garnissage résine cationique H⁺) Bio rad® Aminex HPX-87HTM de dimension 300 \times 7,8 mm utilisée à 40 °C, précédée d'une colonne de garde Bio rad (H⁺). Un logiciel, Borwin V 1,2 (t-SP V 1.21TM, PC A000®) qui permet de calculer la surface des pics détectés. Ce système HPLC est utilisé pour doser le glucose et les acides organiques.

2.3.- Fermentations en bioréacteur

Les cultures sont effectuées dans des fermenteurs de 2,5 l (le volume utile est fixé à 2 l), modèle: New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, N.J., U.S.A., Q 290100. Les fermenteurs sont inoculés à 5 % volume pré-culture/volume culture soit 100 ml de pré-culture dans 2 l de culture. Ce fermenteur est équipé d'un ensemble d'agitation pour assurer l'homogénéité du milieu de culture, comprenant un système dont la vitesse d'agitation est réglable par un moteur d'agitation (Magmator). Un mode de régulation de la température qui est assuré par un système qui dispose d'un capteur métallique permettant des acquisitions très précises. Ce système est relié à une sonde placée dans le milieu de culture ainsi qu'une bande chauffante autour du fermenteur et une circulation d'eau thermostatée dans un serpentin plongeant dans le bioréacteur. Un dispositif d'aération qui comporte un débitmètre massique à air (Bronkhorst Hi-tec, série F100/200). Un filtre à air stérilisable à l'entrée, un diffuseur d'air situé dans la partie inférieure de la cuve et un condenseur d'eau pour éviter la perte de milieu par évaporation. Une sonde de prélèvement (échantillonneur) plongeant dans le milieu de culture. Cette sonde est reliée à l'extérieur à une seringue pour effectuer des prélèvements stériles. Un équipement, de septa, permettant d'inoculer le fermenteur ou pour diverses alimentations; une sonde pH à immersion stérilisable (Ingold Infît, type 764.50 B/BH), reliée à un ensemble de régulation par acide (HCl, 2 N) ou par base (KOH, 2 N); une sonde de mesure de pO₂ à pression partielle pour mesurer l'oxygène dissous polarographique (sonde O₂ Ingold, Biolafitte, model 34-10-3003; Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) avec leur système de régulation. Le logiciel utilisé est: Bio Flo 110 Fermentor/Bioreactor, Bio-Command Plus, NBS Bio Command, version 3,3 plus (BioProcessing Software).

2.4.- Milieu de pré-culture et de culture

La composition du milieu de production a été élaborée au sein de notre laboratoire (Bouras et al., 2006a,b). Ce milieu chimiquement défini, dit MSS (Milieu Semi-Synthétique) est composé de (quantité pour 1000 ml eau distillée): D(+) Glucose anhydre: 25 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2 g (15,13 mM), NaCl: 2 g, KH_2PO_4 : 0,5 g, K_2HPO_4 : 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,2 g (0,81 mM), extrait de levure: 2 g, CaCO_3 : 5 g (le carbonate de calcium permet de tamponner le pH du milieu de culture). Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH (2N).

Pour les pré-cultures, la préparation des inocula est effectuée en fioles Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de MSS. Ces fioles sontensemencées avec un inoculum de spores provenant d'une culture de *S. algeriensis* âgée de 10 jours. Le milieu de culture est de la même composition que le milieu basal (MSS).

2.5.- Stérilisation des milieux de culture

Pour les pré-cultures, les fioles Erlenmeyer de 500 ou de 250 ml et contenant respectivement 100 ou 50 ml de milieu (soit 20% de leurs volumes totaux), sont stérilisées dans un autoclave pendant 20 min à 120 °C (sous 1 bar), alors que le fermenteur de 2,5 l contenant jusqu'à 2 l de milieu de culture est stérilisé pendant 25 min à 120 °C.

Le milieu semi-synthétique (MSS) est stérilisé en deux parties séparées afin d'éviter la réaction de Maillard (entre les sources de carbone et les sources d'azote) qui peut changer la composition du milieu de culture. Le glucose (solution A) est autoclavé séparément puis mélangé stérilement avec l'autre partie du milieu de culture (solution B contenant les sels et l'extrait de levure) seulement après stérilisation et juste avant l'inoculation.

De même les produits ajoutés au milieu MSS (l'acide tiglique et l'acide méthacrylique) sont autoclavés séparément et ajoutés au milieu de culture juste avant l'inoculation.

2.6.- Conditions de fermentation (cultures en fermenteur)

Les pré-cultures sont placées dans un incubateur thermostaté à 30°C, et à agitation orbitale fixée à 250 r.p.m (rotation par minute). Toutes les cultures liquides de fermentation discontinue (batch) sont réalisées dans un fermenteur (le volume utile est fixé à 2 l).

L'ensemencement est effectué à partir d'un inoculum en phase exponentielle de croissance (âgé de 36 à 48 h). Après 48 heures

d'incubation, une estimation du poids sec permet de fixer le volume de pré-culture nécessaire pour ensemercer le fermenteur de manière à avoir une biomasse initiale d'environ 0,2 g/l. Les conditions opératoires pour les cultures en fermenteur (batch) sont les suivantes: pH est maintenu à une valeur de $7 \pm 0,05$ au début de la fermentation, température d'incubation est maintenue à $30 \pm 0,1$ °C, débit d'air (l'aération initiale) est fixé à 1 v/v/m (volume d'air par volume de liquide par minute) soit 2000 ml d'air par minute, pourcentage d'oxygène dissous (pression partielle) est maintenu à $30 \pm 5\%$ de la saturation par modification de la vitesse d'agitation (réglable de 200 à 300 r.p.m). Afin de limiter la formation de mousse, un agent anti-mousse: le polyglycol P-2000 E est employé.

Des échantillons sont prélevés, dans des conditions aseptiques, tous les 4 h afin d'établir les cinétiques de fermentation. Un volume de 20 ml, destiné au dosage des substrats, est centrifugé ($10\,000 \times g$ pendant 10 min), puis stocké à -20 °C jusqu'à la fin de la fermentation. Le poids sec du mycélium est immédiatement mesuré. La durée d'une fermentation est de 5 jours (120 h).

2.7.- Mesure du poids sec

Elle consiste à peser la biomasse cellulaire contenue dans un volume de culture connu. Pour mesurer le poids sec, nous avons utilisé la méthode de Pfefferle et al. (2000) avec quelques modifications. Pour chaque échantillon, 20 ml de culture sont prélevés et mis dans des tubes préalablement dessiqués et tarés. Les tubes sont ensuite centrifugés à $16\,000 \times g$ pendant 10 min. Le culot est lavé trois fois par centrifugation en utilisant 1,5 ml de HCl (0,35 M) afin d'éliminer le CaCO_3 , et une dernière fois avec 1,5 ml d'eau distillée.

Par la suite, les cellules sont récupérées par centrifugation. Les tubes sont ensuite placés dans une étuve à 105 °C pendant 24 heures, puis pesés après refroidissement dans un dessiccateur. Le poids sec ainsi déterminé est ensuite rapporté au litre de volume de fermentation (exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture). Les pesées sont effectuées sur une balance analytique Sartorius.

2.7.1.- Mesure du pH

Lors de la centrifugation pour la mesure du poids sec, le surnageant obtenu est utilisé immédiatement pour enregistrer les variations de pH au cours du temps.

2.7.2.- Dosage du glucose et des acides organiques par HPLC

Les dosages chimiques ont été réalisés après les fermentations. Les échantillons prélevés en vue d'une analyse chromatographique ont été centrifugés ($10\,000 \times g$, à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et pendant 10 min) et le surnageant est directement congelé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans des tubes à essais en verre fermés. Au moment de l'analyse, l'échantillon a été décongelé à température ambiante, puis il a été convenablement dilué avec un dilueur automatique. Les concentrations en glucose, acide tiglique et acide méthacrylique ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), après filtration à l'aide d'une seringue et d'un filtre (Minisart Sartorius, $0,2\ \mu\text{m}$). La phase mobile est une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) à $5 \cdot 10^{-3}\ \text{mM}$ (dégazé à l'hélium) élué à un débit isocratique de $0,4\ \text{ml/min}$ par une pompe. Le temps d'acquisition est de 40 min.

La courbe d'étalonnage est réalisée avec 5 concentrations pour chaque composé. Nous avons utilisé les concentrations suivantes: 0, 2,5, 5, 15 et 25 g/l pour le glucose et 0, 0,25, 1,25 et 5 mM pour les acides organiques (tiglique et méthacrylique). Les surfaces des pics ont été traitées par ordinateur équipé du logiciel Borwin. Cette surface est corrélée à une valeur en concentration par l'intermédiaire d'une courbe de calibration pour le glucose et pour l'acide méthacrylique. Ainsi, les surnageants de nos échantillons sont dilués de manière à obtenir des concentrations inférieures ou égales à 25 g/l pour les sucres et à 4 g/l pour les acides organiques.

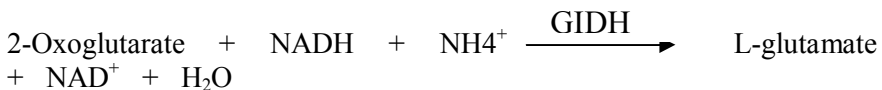
2.7.3.- Dosage du glucose par la méthode enzymatique YSI

Le glucose est dosé également par une méthode enzymatique (*Enzymatic Glucose Analyzer*) grâce à un appareil automatique YSI. L'appareil utilise une enzyme immobilisée (glucose-oxydase) sur une membrane, elle-même couplée à une sonde électrochimique. L'enzyme réagit avec le glucose et produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci est ensuite électro-chimiquement oxydé par une anode de platine. Cette réaction produit un signal électronique proportionnel à la concentration en glucose de la solution dosée. La réponse de l'appareil est linéaire entre 0,002 et 25 g/l de glucose, avec une erreur maximale tolérée de $\pm 5\%$ par rapport à une solution standard à 25 g/l de glucose.

2.7.4.- Dosage de l'azote ammoniacal

L'azote ammoniacal est dosé par une méthode enzymatique proposée en kit par Boehringer-Mannheim (kit Diagnostics Ammonia, Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis, UV-test, approx. 50 assays). Référence: R-Biopharm, K-Amia, AG, D-64293, E 1112732, Darmstadt Roche).

En présence de la glutamate déshydrogénase (GIDH) et du dinucléotide nicotinamide-adénine réduit (NADH), l'ammoniaque réagit avec 2-oxoglutarate pour donner le L-glutamate. Le NADH s'oxyde en NAD^+ .



La quantité de NADH oxydée dans la réaction ci-dessus est stoechiométrique à la quantité d'ammoniaque. La quantité de NADH est déterminée grâce à son absorbance à 334, à 340 ou à 365 nm.

L'appareil utilisé est le Mascot Plus, qui est composé de trois parties: le distributeur sur lequel sont placés les réactifs et les échantillons et qui assure la partie préparation (prélèvement des réactifs, des échantillons, pré dilutions, post-dilutions); le banc optique où sont transférés les prélèvements et où est assuré le suivi des réactifs et l'interface utilisateur par l'intermédiaire de laquelle sont programmés les paramètres de fonctionnement de l'analyseur.

Le consommable est le suivant: échantillons à une dilution adaptée et la solution standard d'ammoniac à concentration connue pour test, solution de mouillant, cuves PMMA (540 barrettes de 8 cuves), cuves polystyrènes (540 barrettes de 8 cuves), godets de 0,5 ml (1000), godets pour antisérum (25) et flacons réactifs complets (16) et essuyeurs (32). Le réactif R1 est composé de 1 ml de 2-oxoglutarate, 1 ml d'eau déionisée et 1 tablette du flacon 2 (flacon contenant des tablettes de NADH). Le réactif R2 est composé de 0,1 ml de GIDH et 0,9 ml d'eau déionisée.

Au cours du dosage et aussitôt qu'une analyse est terminée, le résultat s'affiche sur la partie droite de l'écran du synoptique de travail. Le numéro de la cuve de mesure utilisée, le numéro du godet et le nom du paramètre traité sont suivis du résultat calculé.

L'équation générale pour calculer la concentration est la suivante:

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \quad (\text{g / l})$$

V = volume finale [ml],

v = volume de l'échantillon (ml),

MW = poids moléculaire de la substance à tester (g/mol),

d = trajet de la lumière (cm),

ε = coefficient d'extinction de NADH: 6,3 ($1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) à 340 nm;

6,18 ($1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) à 334 nm et 3,4 ($1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) à 365 nm.

Pour l'ammonium, on a:

$$C = \frac{3,020 \times 17,03}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta A = \frac{0,514}{\varepsilon} \times \Delta A_{[\text{g ammoniac / l échantillon}]}$$

Si l'échantillon a été dilué sur la préparation, le résultat doit être multiplié par le facteur F de dilution. En analysant les échantillons solides et semi solides qui sont pesés pour la préparation témoin, le résultat doit être calculé à partir de la quantité pesée.

Pour L'azote ammoniacal:

$$\text{content ammonia} = \frac{C_{\text{ammonia}} \quad (\text{g / l sample})}{\text{weight sample} \quad (\text{g / l})} \times 100 \quad (\text{g / 100 g})$$

2.7.5.- Dosage de l'azote total

L'azote total est dosé par une méthode proposée en kit par Odyssey / Fisher (kit Odyssey DR / 2500, Test N Tube™ Vials, LR (10-150 mg/l N). Référence: kit 26722-45.

La méthode utilisée pour est la digestion par le persulfate. Le réacteur de type COD, *Analyzer and COD heating Reactor*, Hach. Company, USA. Spectrophotomètre (Spectro-Hach Odyssey), USA. Le réactif 1 est composé de 0,5 ml de l'échantillon (à une dilution adaptée) + le réactif (*Hydroxyde Reagent* composé d'*hydroxyde de sodium*) + un sachet de persulfate de potassium. Chauffer le réactif 1 pendant 30 minutes dans un réacteur COD, Hach (à une température de 105 °C), puis laisser refroidir à la température ambiante, et ajouter au réactif 1, un sachet de réactif A (métabisulfite de sodium) et mélanger pendant 2 minutes, par la suite ajouter au réactif 1, un sachet de réactif B (acide chromatropique, sel disodium, quartz blanc, urée et métabisulfite de sodium) et mélanger pendant 5 minutes. Un blanc (0,0 mg/l) est préparé dans les mêmes conditions, avec 0,5 ml d'eau déionisée présente dans le kit. Mettre 2 ml de réactif 1 dans le réactif C (acide sulfurique) et mélanger pendant 5

minutes. Effectuer la lecture à 410 nm dans un spectrophotomètre spectro-Hach, Touch (Hach Programs), Select Program (350N, Total TNT/ n° 395). Les résultats sont exprimés en mg d'azote total/l.

3.- RESULTATS

3.1.- Effet sur la croissance de *S. algeriensis*

D'après les résultats obtenus sur la figure 1, la croissance de *S. algeriensis* dans toutes les fermentations (en présence d'acide tiglique, d'acide méthacrylique et dans le milieu témoin) est très rapide pendant les dix premières heures de culture. La biomasse maximale obtenue est de 5,97 g/l pour le témoin, 8,90 g/l en présence d'acide tiglique et 8,80 g/l en présence d'acide méthacrylique. La phase stationnaire est observée globalement entre 24 et 52 h de fermentation. De plus, après 48 h de fermentation, la culture témoin subit une lyse cellulaire partielle. En revanche, en présence d'acide tiglique ou d'acide méthacrylique, la biomasse se maintient à un niveau élevé.

Les valeurs obtenues de la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{\max}) sont de 0,31, 0,31 et 0,32 h⁻¹, en présence d'acide tiglique, d'acide méthacrylique et dans le milieu le témoin, respectivement. D'après ces résultats, il semblerait qu'il n'y ait pas de différence significative concernant la croissance de *S. algeriensis* en présence des différents acides organiques. En outre, la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{\max}) est obtenue après 8 h de fermentation en présence d'acide méthacrylique et après 10 h en présence d'acide tiglique et dans le milieu témoin.

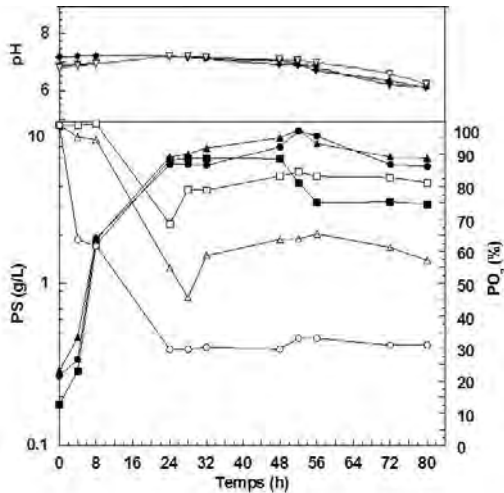


Figure 1. Cinétique de la variation de la biomasse (▲, ●, ■), P (O₂) (△, ○, □) et du pH (▼, ▽, ◆), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 l, en présence d'acide tiglique (2,5 mM), d'acide méthacrylique (5 mM), et dans le milieu témoin, respectivement.

3.2.- Effet sur le pH et le P(O₂)

En présence d'acide tiglique, d'acide méthacrylique et dans le milieu témoin, les résultats obtenus montrent que malgré une légère acidification observée après 52 h de fermentation, le pH évolue peu (une unité et demi) dans ce milieu fortement tamponné par le CaCO₃ (fig. 1). Par ailleurs, nous avons remarqué pour toutes les cultures, et dès les 24 premières heures suivant la mise en culture, que la PO₂ chute rapidement. Cette observation témoigne d'un métabolisme actif qui s'installe et qui se traduit par l'augmentation de la biomasse. En outre, chez le témoin et en présence d'acide tiglique, nous avons remarqué une légère augmentation de la PO₂ après 24 h de fermentation. Cette augmentation est probablement due à la lyse partielle des cellules. En présence d'acide méthacrylique, on observe qu'au fur et à mesure que la production de la biomasse se poursuit, le taux d'O₂ est maintenu à 30% (point de consigne).

3.3.- Effet sur la consommation des substrats

Nous constatons par ailleurs que les quantités d'azote total et minéral diminuent lentement dans le milieu de culture, en particulier pour l'azote minéral en présence de l'acide méthacrylique, et pour l'azote total et minéral en présence de l'acide tiglique (fig. 2).

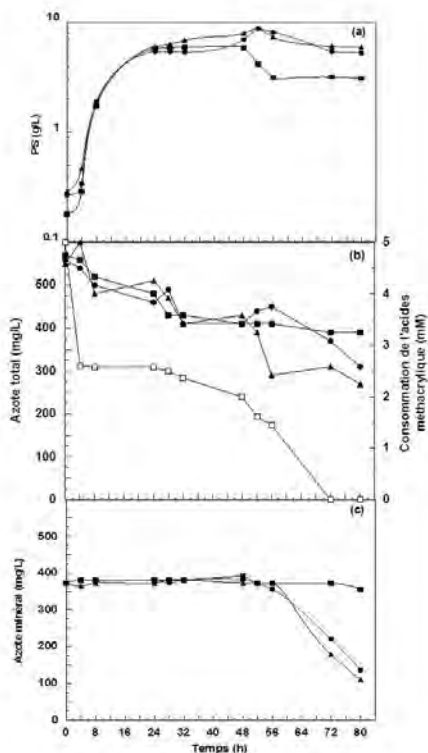


Figure 2. Cinétique de la variation de la biomasse (a) (▲, ●, ■), de l'azote total (b) (▲, ●, ■) et consommation de l'acide méthacrylique (b) (□) et de l'azote minéral (c) (▲, ●, ■), en différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 l, en présence d'acide tiglique (2,5 mM), d'acide méthacrylique (5 mM), et dans le témoin, respectivement.

En dehors de l'acide méthacrylique, aucun autre acide n'a pu être détecté par la méthode HPLC utilisée. Nous avons présenté alors uniquement la cinétique de consommation de l'acide méthacrylique et nous avons remarqué que sa concentration passe de 5 mM au début de la fermentation à 0 mM après 72 h de fermentation (fig. 2). L'éventuelle excrétion des acides organiques à courte chaîne comme l'acétate, le propionate ou le butyrate a été recherchée. Aucun de ces acides n'a été détecté.

L'assimilation du glucose a été vérifiée. Les résultats montrent que la concentration de glucose passe de 25 g/l au début de fermentation à 24,21 et à 23,38 g/l après 80 h de fermentation chez le témoin et en

présence de l'acide méthacrylique, respectivement. Par ailleurs, en présence de l'acide tiglique, nous avons constaté que la concentration du glucose est de 25 g/l, même après 80 h de fermentation.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas ou peu de consommation de glucose dans le milieu de culture, malgré l'enregistrement des valeurs de biomasse de l'ordre de 5,97 à 8,90 g/l entre 32 et 52 h. Afin de vérifier les résultats obtenus par HPLC nous avons quantifié le glucose par une autre méthode enzymatique (l'YSI). Les résultats acquis par cette méthode nous ont confirmé ceux obtenus par HPLC.

Ces résultats inattendus nous amènent à se poser certaines questions sur les moyens disponibles pour former la biomasse. Contrairement à ce qui a pu être attendu, nous avons pensé que l'extrait de levure et peut être même le CaCO_3 peuvent jouer un rôle dans la formation de la biomasse.

Dans la présente étude, six différentes fermentations en Erlenmeyers ont été menées dans différentes conditions de culture. Cette étude sera focalisée sur la mesure de la biomasse produite par *S. algeriensis* dans différentes conditions. Nous avons effectué des fermentations en absence et en présence de 25 g/l de glucose, en absence et en présence de 2 g/l d'extrait de levure et en absence et en présence de 5 g/l de CaCO_3 . Par ailleurs, nous avons effectué une fermentation en présence de 4 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ au lieu de 2 g/l dans le milieu de base (MSS). Cinq points de mesure de la biomasse sont effectués (à 0, à 48, à 96, 144 et à 216 h); les résultats sont présentés dans la figure 42.

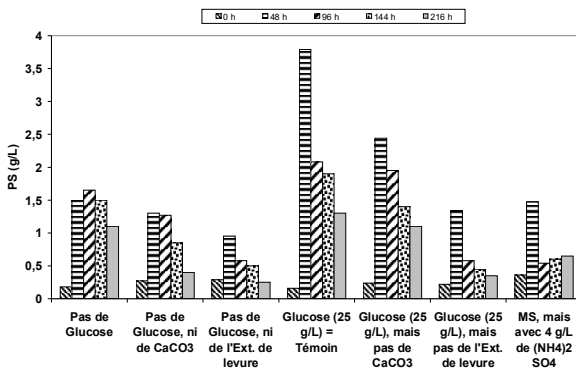


Figure 3. Effet du glucose, du CaCO_3 , de l'extrait de levure et du NH_4_2SO_4 , sur la biomasse de *S. algeriensis* obtenue après 0, 48, 96, 144 et 216 h de fermentation en Erlenmeyers.

Les résultats obtenus montrent que la biomasse maximale chez le témoin contenant 25 g/l est de 3,79 g/l. En revanche, l'élimination du glucose a fait diminuer la biomasse maximale de 3,79 à 1,65 g/l. De la même manière, l'élimination du CaCO₃ et de l'extrait de levure, a également fait abaisser la biomasse maximale à 2,44 et à 1,34 g/l, respectivement. Par ailleurs, la culture en absence du glucose a fourni une biomasse de 1,65 g/l. En revanche, l'élimination du CaCO₃ et de l'extrait de levure a diminué la biomasse à 1,30 et à 0,95 g/l, respectivement. En outre, la biomasse maximale obtenue en présence de 4 g/L de (NH₄)₂SO₄ (1,47 g/l) est moins élevée que celle obtenue en présence de 2 g/l de (NH₄)₂SO₄ (1,65 g/l). Nous avons constaté également que toutes les valeurs de la biomasse maximale ont été mesurées à 48 h, à l'exception de la fermentation effectuée sans glucose (mesurée à 96 h). Les résultats obtenus indiquent que le glucose n'est pas l'unique fournisseur de la biomasse mais que l'extrait de levure remplit aussi ce rôle.

4.- Discussion

Malgré des conditions de pré-culture standardisées, des différences de biomasse, de vitesses de croissance ont été observés. Ces différences pourraient être dues à la variabilité de l'état physiologique de l'inoculum lié à la préparation des pré-cultures et à la particularité de différenciation du genre *Saccharothrix*. Lors d'une culture de microorganisme, le fermenteur représente un lieu de transformations biochimiques complexes.

La formation de la biomasse et la biosynthèse des antibiotiques est soumise à la régulation par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate: induction et répression de la biosynthèse, rétro-inhibition et inactivation enzymatique (Martín and Demain, 1980). La question importante qui reste posée dans notre cas, concerne la formation d'une biomasse relativement considérable à partir d'une consommation minimale de glucose. La concentration de glucose a été vérifiée par deux méthodes différentes (l'HPLC et l'YSI). Nous avons essayé alors d'établir une corrélation entre la formation de la biomasse et la consommation d'autres sources comme l'extrait de levure et le CaCO₃. Nous pouvons donc conclure à ce niveau que le glucose n'est pas l'unique fournisseur de la biomasse chez *S. algeriensis* mais que le CaCO₃ (malgré que les actinobactéries sont des organismes chimioorganotrophes et non des chimio-litho-trophes) et l'extrait de levure remplissent aussi ce rôle.

L'assimilation de certains acides gras excrétés ou ajoutés dans le milieu de culture, modifie fortement la formation de la biomasse. Il est possible que le tiglate et le méthacrylate entraîne une modification de la composition de la membrane cytoplasmique et évite le déclin cellulaire. Il a été montré que l'addition d'un acide gras, comme le méthyloléate, modifie la composition lipidique membranaire chez *Streptomyces hygroscopicus* (David et al., 1992). Ces modifications membranaires entraîneraient des variations dans l'activité de certaines enzymes du métabolisme primaire et par la suite le métabolisme secondaire (Arima et al., 1973).

Les résultats obtenus en fermenteurs ne sont pas exactement les mêmes que ceux obtenus en Erlenmeyers d'un point de vue qualitatif et quantitatif. Egalement, le résultat obtenu indique qu'au cours de 48 h de fermentation, la biomasse est principalement formée à partir d'un substrat autre que le glucose. L'extrait de levure est principalement constitué de matière protéique. Hodgson (2000) ayant abondamment répertorié les cas de catabolisation des acides aminés par des actinomycètes, il serait probable que la phase initiale de croissance ait lieu sur un ou plusieurs substrats apportés par l'extrait de levure, par exemple les acides aminés (Strub, 2009).

Les résultats de Strub (2009) ont confirmé que sur le milieu semi-synthétique, les différents substrats sont consommés de manière séquentielle. Dans un premier temps, l'actinobactérie croît à partir des acides aminés libres amenés par l'extrait de levure. Une fois la majorité des acides aminés épuisés, l'actinobactérie se multiplie plus lentement. En effet, la concentration en biomasse évolue peu pendant la deuxième phase (Strub, 2009). Cette période s'apparenterait à une période de diauxie (Narang et Pilyuing 2006). Il s'agirait d'un temps d'adaptation du microorganisme à un nouveau substrat, le glucose, suite à l'épuisement des acides aminés (Strub, 2009).

Des études futures sur des mécanismes de régulation de la formation de la biomasse fourniront des informations importantes qui permettront de définir des milieux de culture et des conditions optimales de fermentation. Toutefois, ces propositions peuvent servir de base à d'autres études précises et quantitatives sur ce microorganisme.

5.- Références bibliographiques

- Arima K., Okasaki H., Ono H., Yamada K. and Beppu Y., 1973. Effect of exogenous fatty acids on the cellular fatty acid composition and

-
- neomycin formation in a mutant strain of *Streptomyces fradiae*. 2000. Agricultural and Biological Chemistry, 37: 2313-2318.
- Boudjella H., 2007. Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut national agronomique. El-Harrach. 209 p.
 - Bouras, N., 2005. Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse (Ph.D). Institut National Polytechnique, ENSAT-INP, Toulouse, 238 p.
 - Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A., 2006a. Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Journal of Applied Microbiology, 100: 390-397.
 - Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A., 2006b. Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Enzyme and Microbial Technology, 100: 1423-1429.
 - Bouras N., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2007. Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Process Biochemistry, 42: 925-935.
 - Bouras N., Merrouche R, Lamari L, Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2008. Precursor-directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Process Biochemistry, 43: 1244-1252.
 - David L., Loutheiller H., Bauchart O., Auboiron S. and Asselineau J., 1992. Effects of exogenous methyl oleate on the biosynthesis of nigericin, a polyether carboxylic antibiotic, by *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 56: 330-339.
 - Hogdson D. A., 2000- Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria. Advances in Microbial Physiology, 42, 47-238.
 - Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
 - Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Tillequin F., 2002. New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. Journal of Antibiotics, 55: 696-701.
 - Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E. And Tillequin F., 2002. New dithiopyrrolone antibiotics from
-

Saccharothrix sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *Journal of Antibiotics*, 55: 702-707.

- Martín J. F. and Demain A. L., 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 44: 230-251.

- Minamiguchi K., Kumagai H., Maduda T., Kawada M., Ishizuka M. And Takeuchi T., 2001. Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *International Journal of Cancer*. 93: 307-316.

- Narang A. And Pilyugin S. S., 2006. Bacterial gene regulation in diauxic and non-diauxic growth. *Journal of Theoretical Biology*, 244: 326-348.

- Oliva B., O'neill A., Wilson J. M., O'hanlon P. J. And Chopra I., 2001. Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 532-539.

- Pfefferle C., Theobald U., Gürtler H., Fiedler H-P., 2000. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of Biotechnology*, 80: 135-142.

- Webster J. M., Li J. and Chen G., 2000. Anticancer property of dithiolopyrrolones, U.S. Patent 6020360.

- Strub C. 2008. Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique. Toulouse .202. p.

- Voelker F. and Altaba S., 2001. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*, 147: 2447-2459.
