

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira- Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Appliquée

Option : Biotechnologie Microbienne

Thème

**Influence de la température sur la production de la
pénicilline V par *Penicillium chrysogenum***

Réalisé par :

M^{elle} : AOUCHICHE Lamia

M^{elle} : BAKOURI Ouissam

Encadré par :

Promoteur : M^r BOUKERROUI A.

Co-promoteur : M^r BELKACEMI A.

Soutenu devant le jury :

Président : M^{me} Idres N.

Examinatrice : M^{elle} Djinni I.

Promotion : 2012/2013



Remerciements :

En premier lieu nous tenons à remercier le bon Dieu de nous avoir donné la foi, le courage et la santé pour accomplir et réaliser ce modeste travail.

Nous adressons notre profonde reconnaissance à notre promoteur Mr Boukerroui pour ses conseils, sa disponibilité et son suivi tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous tenons également à remercier le personnel du complexe ANTIBIOTICAL de SAIDAL en particulier Mr Belkacemi, Mr Dergua, Ami Mohamed, AMI Rachid, Karima, Mama Fella et Khalti Lyama

Nous remercions sincèrement Mr Kecha de nous avoir fait l'honneur de présider notre jury, ainsi que M^{me} IDRES et M^{lle} Djinni pour avoir accepté d'examiner notre travail

*Enfin nous remercions également tous nos professeures qui nous ont enseigné tout au long de notre cycle d'étude
A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

Lamia et Ouissam



✚ *A mes très chers parents*

✚ *A mon frère Rahim*

✚ *A mes sœurs, mes beaux frères et mes nièces*

✚ *A tous ceux qui portent le nom BAKOURI*

✚ *A mon binôme Lamia et toute sa famille*

✚ *A toute la promotion Biotechnologie Microbienne
2012/2013*

✚ *A tous ceux que j'ai connus durant tous mon cursus d'étude,*

✚ *Vous les copins je ne vous oublierai jamais*

OUISSAM



Je dédie ce travail à

- + La mémoire de ma grand-mère*
- + Mes très chers parents*
- + Mes frères et sœurs*
- + Mes beaux frères, neveux et nièce*
- + Ouissam et sa famille*
- + Toute la promotion biotechnologie microbienne 2012/2013 .*
- + Tous ceux qui me sont chers.*

Lamia

Liste des abréviations, des symboles et des acronymes

6 APA :	Acide 6- aminopénicillanique
7 ACA :	Acide 7-aminocéphalosporanique
Act :	Activité
ACV :	δ - (L- aminoadipyl -L- cysteinyl -D- valine)
ACV S :	δ - (L- aminoadipyl -L- cysteinyl -D- valine) Synthase
C1G :	Céphalosporines de 1 ^{ère} génération
C2G :	Céphalosporines de 2 ^{ème} génération
C3G :	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération
CMP :	Culture Medium Penicillium
DO :	Densité optique
Ech :	Echantillon
EP:	Eau peptonée
FMP:	Fermentative Medium Penicillium
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
IAT :	Isopénicilline N acyl transférase
IPN:	Isopénicilline N
IPN S :	Isopénicilline N Synthase
L-α- AAA:	Acide L- α aminoadipique
<i>P.chrysogenum</i> :	<i>Penicillium chrysogenum</i>
PLP :	Protéine de liaison aux pénicillines
POAA :	Phenoxyacetic acid
PV 0 3/01/03:	Pénicilline V génération 03/ colonie 01/ année de conservation (référence de la souche mère)
PV 04/05/10:	Pénicilline V génération 04/ slant 05/ année de conservation (référence de la souche)
PV 05/01/13:	Pénicilline V génération 04/ colonie 01/ année de conservation (référence de la souche)
PV05/02/13 :	Pénicilline V génération 04/ colonie 02/ année de conservation (référence de la souche)
S1 :	Souche 1
S2 :	Souche 2
Slant :	tube à essai à grand format

Std :	Standard
t_R :	Temps de rétention
VMP :	Vegetative Medium Penicillium
β-lactamines :	bétalactamines
μV.s :	micro-volt. seconde

Liste des figures

Figure	Titre de la figure	Page
01	Structure du noyau β -lactame	4
02	Analogie structurale entre les β -lactamines (pénicilline) et le dipeptide D-Alanyl-D-Alanine	6
03	Structure chimique de la pénicilline	7
04	Structure de la pénicilline V	7
05	Les étapes de la biosynthèse de la pénicilline V	9
06	Schéma représentatif de la morphologie du <i>Penicillium chrysogenum</i>	11
07	Représentation schématique des régions hyphales du <i>Penicillium chrysogenum</i>	12
08	Schéma de principe du procédé fermentaire à l'échelle industrielle	14
09	conservation de la souche PV 04/05/10 sur un milieu gélosé incliné	16
10	Schéma représentatif d'un dispositif de chromatographie liquide à haute performance	21
11	Apparition des colonies typiques (a) et d'un tapis verdâtre (b) sur milieu "CMP" V après 14 jours d'incubation.	23
12	Evolution du pH des milieux fermentatifs pour S1.	25
13	Evolution du pH des milieux fermentatifs pour S2.	25
14	Evolution de la biomasse des milieux fermentatifs pour S1.	26
15	Evolution de la biomasse des milieux fermentatifs pour S2.	26
16	Evolution du titre de la péni V dans les milieux fermentatifs pour S1.	26
17	Evolution du titre de la péni V dans les milieux fermentatifs pour S2.	26
18	Evolution du titre de la péni V et de la [POAA] durant la fermentation à 27°C pour S1.	27
19	Evolution du titre de la péni V et de la [POAA] durant la fermentation à 27°C pour S2.	27
20	Evolution du titre de la péni V et de la [POAA] durant la fermentation à 29°C pour S1.	27
21	Evolution du titre de la péni V et de la [POAA] durant la fermentation à 29°C pour S2.	27

Liste des tableaux :

Tableau	Titre du tableau	Page
I	Classification des β -lactamines	5
II	Classification du <i>Penicillium chrysogenum</i>	11
III	pH et biomasse après 40 h de germination (test 23°C)	24
IV	pH et biomasse après 40 h de germination (test 25°C)	24
V	pH et biomasse après 40 h de germination (test 27°C)	24
VI	pH et biomasse après 40 h de germination (test 29°C)	25

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations, symboles et acronymes

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale.....	1
Présentation de l'entreprise SAIDAL.....	2

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. β-lactamines.....	4
1. Définition.....	4
2. Classification.....	4
3. Mode d'action.....	5
I.2. Pénicilline.....	6
1. Définition.....	6
2. Pénicilline V.....	7
3. Biosynthèse de la pénicilline V.....	8
II .1.Généralités sur le genre <i>Penicillium</i>.....	10
II.2. <i>Penicillium chrysogenum</i>.....	10
1. Morphologie.....	10
2. Habitat.....	11
3. Classification.....	11
4. Mécanisme de croissance.....	11

II.3. Techniques d'amélioration et performances.....	13
II.4. Techniques de conservation des souches.....	13
II.5. Mise en œuvre industrielle du <i>Penicillium chrysogenum</i>	14

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Souches productrices.....	15
I.2. Matériels analytiques.....	15
I.3. Milieux de cultures.....	15

II. Méthodes

II.1. Réactivation de la souche.....	15
II.2. Repiquage sur milieu gélosé incliné.....	16
II.3. Fermentation en batch dans des fioles agitées.....	17
II.3.1. Germination.....	17
II.3.2. Fermentation.....	18
II.4. Dosage de l'antibiotique (pénicilline).....	18
II.4.1. Dosage par la méthode colorimétrique.....	18
II.4.2. Dosage par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	19
II.4.2.1. Préparation des standards.....	21
II.4.2.2. Préparation des échantillons.....	21
II.4.2.3. Calcul des titres de la pénicilline V et du précurseur POAA.....	22

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Résultats

III.1.1. Réactivation de la souche.....	23
III.1.2. Repiquage sur milieu gélosé incliné	23
III.1.3. Fermentation en batch dans des fioles agitées.....	23
III.1.3.1. Germination.....	24
a) Test de fermentation à température 23°C	24
b) Test de fermentation à température 25°C	24
c) Test de fermentation à température 27°C	24
d) Test de fermentation à température 29°C	24
III.1.3.2. Fermentation.....	25
a) Evolution du pH.....	25
b) Estimation de la biomasse.....	26
c) Titre de la pénicilline V par spectrophotométrie.....	26
d) Titre de la pénicilline V par HPLC	27

III.2. Discussions

III.2.1. Réactivation et repiquage des souches conservées sur milieu gélosé.....	28
III.2.2. Evolution du pH.....	28
III.2.3. Estimation Biomasse.....	28
III.2.4. Titre de la pénicilline V par spectrophotométrie.....	30
III.2.5. Titre de la pénicilline V par HPLC.....	31

Conclusion..... 33

Références bibliographiques

Annexes

Introduction générale

Introduction

Depuis des milliers d'années, les êtres humains se servent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie (**Smaoui et al., 2010**).

Les microorganismes sont de remarquables agents de production et on leur doit la production de nombreuses molécules organiques obtenues par fermentation et utilisées pour leurs propriétés fonctionnelles dans des domaines extrêmement variés. Parmi ces molécules, on peut citer les antibiotiques qui sont des substances naturelles du métabolisme secondaire, ayant la propriété d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres microorganismes. Ces substances sont classées en diverses familles selon leurs structures chimiques et leurs modes d'actions (**Scriban 1999**).

Parmi les familles des antibiotiques, nous nous sommes intéressées à la famille des bêtalactamines, qui présentent un large spectre d'utilisation dans le domaine médical pour lutter contre les maladies infectieuses, le cas de la pénicilline issue par fermentation à grande échelle, est l'un des authentiques exemples.

La politique algérienne d'intégration technologique dans le domaine de la santé publique a été orientée vers l'installation d'unité de production des antibiotiques, en particulier la filiale ANTIBIOTICAL du groupe SAIDAL (Médéa), qui est spécialisée dans la production des antibiotiques pénicilliniques et non pénicilliniques.

Malgré les énormes efforts de SAIDAL consacrés à ce domaine d'application, des insuffisances dans la maîtrise du génie technologique de la fermentation, ce qui a engendré l'arrêt de la fermentation depuis plus de 8 ans.

Dans ce cadre, plusieurs travaux de recherche sont toujours en cours à l'échelle laboratoire afin d'optimiser la production de la pénicilline V par la souche *Penicillium chrysogenum* et garder cette dernière en activité permanente, en faisant varier les paramètres

influençant la productivité de la souche tel que les méthodes de conservation des souches productrices, les détails de la biosynthèse, ainsi que les aspects physico-chimiques (pH, température d'incubation et agitation) qui doivent être pris en compte dans l'exploitation industrielle.

La température est un facteur qui affecte profondément les *Penicillium*, comme tous les êtres vivants. En effet les microorganismes unicellulaires sont particulièrement sensibles à la variation de la température du milieu extérieur (**Prescott, 1995**) .

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique détaillée sur les bêtalactamines et les pénicillines.

La seconde partie du document traite les principes généraux des matériels et méthodes utilisés.

La troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

Enfin, on termine par une conclusion.

Présentation de l'entreprise

1. Présentation du groupe SAIDAL :

SAIDAL est une entreprise publique et économique dotée d'autonomie de gestion. c'est en 1989, qu'elle était choisie parmi les premières entreprises nationales, pour acquérir le statut de société par action avec un capital de 2.500.000.000 dinars Algériens , qui se présente par ses entités centrales de gestion , d'un centre de recherche et de développement, d'unité commerciale, d'une direction de Marketing et de l'information médicale et de quatre filiales de production (**Aouni et Bitouri, 2006**).

Sa mission principale est de développer, produire et commercialiser des produits pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire (**Aouni et Bitouri, 2006**).

Elle est représentée par les filiales suivantes : ANTIBIOTICAL, PHARMAL, BIOTIC et SOMIDIAL.

2. Présentation de la filiale ANTIBIOTICAL : (Aouni et Bitouri, 2006).

La filiale ANTIBIOTICAL se situe à environ une quinzaine de kilomètres au nord de Médéa, elle s'étend sur une superficie de 25 hectares dont plus de 19 hectares sont couverts. Elle est spécialisée dans la production des antibiotiques, pénicilliniques et non pénicilliniques, avec une capacité de production de 60 millions d'unités de vente, dotée des installations nécessaires à la fabrication des médicaments depuis l'obtention du principe actif jusqu'à sa mise en forme.

Cette filiale se compose d'une unité à la pointe de la biotechnologie pour la production des principes actifs pénicilliniques et non pénicilliniques par fermentation et semi-synthèse

La capacité de fermentation est de 1200 mètres cube pour une production de 750 tonnes de matières premières.

Ces unités répondent aux normes internationales les plus exigeantes grâce à une technologie et un savoir faire de haut niveau.

3. Organisation de la filiale ANTIBIOTICAL : (Aouni et Bitouri, 2006).

Voir l'organigramme en **annexe 1**

Synthèse bibliographique

I.1. β -lactamines

1. Définition

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, qui se caractérise par la présence constante du cycle β -lactame (**figure 1**) associé à des cycles et à des chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits. La grande variété de leurs modes d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent leur popularité et l'importance de leur utilisation, seules ou en associations, depuis plus de 60 ans (**Cavallo et al., 2004**).

Les β -lactamines, qu'elles soient naturelles ou synthétiques, agissent sur les bactéries en phase de croissance (**Archambaud, 2009**).

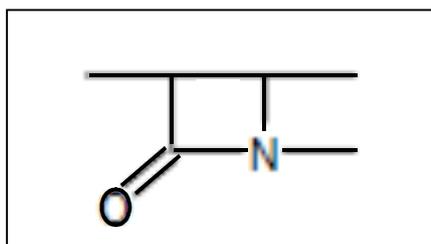


Fig 1. Structure du noyau β -lactame (**Cavallo et al., 2004**).

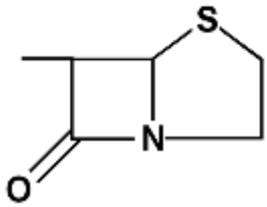
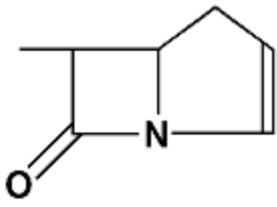
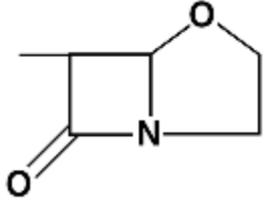
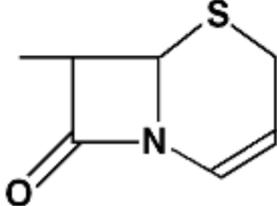
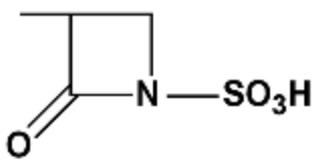
2. Classification

Les β -lactamines sont classées selon leur structure en trois groupes: les dérivés de l'acide 6-aminopénicillanique, les dérivés de l'acide 7-aminocéphalosporanique et les monobactames (**Cavallo et al., 2004**).

La structure du noyau de base, qui comporte toujours le cycle β -lactame, permet de répartir ces groupes en cinq familles (**Laurent, 2009 ; Mohammedi, 2010**).

Le tableau I indique les structures et les antibiotiques représentatifs pour chaque famille.

Tableau I : Classification des β -lactamines (Laurent, 2009 ; Mohammadi, 2010).

Groupes	Familles	Structures	Antibiotiques représentatifs
Dérivés de 6 APA	Pénames		Pénicillines
	Carbapénèmes		Imipénème Méropénème Ertapénème Faropenem
	Oxapénames ou acides clavulaniques		Acide clavulanique + amoxicilline (Augmentin) Acide clavulanique + ticarcilline (Claventin)
Dérivés de 7ACA	Céphèmes		Céphalosporines : C1G, C2G, C3G Oxacéphèmes Céfamycines
Monobactames	Monobactame		Aztréonam

3. Mode d'action

Toutes les β -lactamines ont le même mécanisme d'action, elles bloquent la synthèse du peptidoglycane, qui est le polymère majeur spécifique de la paroi bactérienne (Cavallo et al., 2004).

Les β -lactamines, dont la structure chimique présente des parentés structurales avec celle du dipeptide D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane de la paroi (figure 2), se fixent par liaisons covalentes à un résidu sérine d'enzymes à activité transpeptidasique, appelées protéines liant des pénicillines (PLP) formant un complexe β -lactamine-PLP, qui à son tour inactive les inhibiteurs des autolysines bactériennes. Ces dernières clivent les liaisons β (1-4)

du péptidoglycane dans la paroi bactérienne et entraînent la mort cellulaire (**Bibbal, 2008 ; Benyousef, 2012**).

Chez les bactéries à gram +, les β -lactamines atteignent les transpeptidases à travers la paroi du peptidoglycane déjà constituée ou en cours de constitution. En revanche, chez les bactéries à gram -, elles n'atteignent ces enzymes qu'après pénétration à travers les canaux porines de la membrane externe (**Faure, 2008**). **Annexe2**

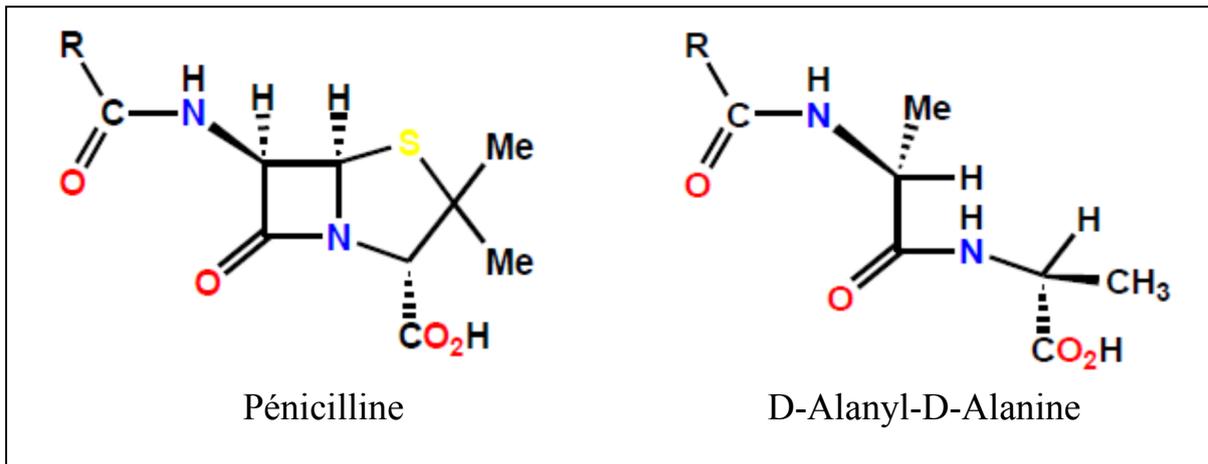


Fig2. Analogie structurale entre les β -lactamines (exemple de la pénicilline) et le dipeptide D-Alanyl-D-Alanine (**Benyousef, 2012**).

I.2. Pénicilline

1. Définition

Les pénicillines sont des substances antibactériennes à hétérocycle β -lactame associé à un cycle thiazolidine formant un cycle pénème (**figure 3**) (**Scriban R., 1999**).

Les pénicillines sont des molécules issues à partir d'une moisissure d'un champignon du genre *Penicillium*. Ce sont les premiers antibiotiques obtenus à l'échelle industrielle et leur utilisation pour traiter les infections a entraîné une véritable révolution médicale au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle (**Patrick, 2003**)

Elles ont comme formule chimique :



Cette dernière se divise en deux parties :

- $C_9H_{11}N_2O_3S$ qui est la formule de l'acide 6-aminopénicillanique que l'on nomme également pénicilline naturelle. C'est ce qui est obtenu lors de la fermentation du champignon.
- le radical R qui est rattaché à la formule, représente les différentes protéines que l'on peut greffer synthétiquement à la pénicilline naturelle (Martin et al., 2010).

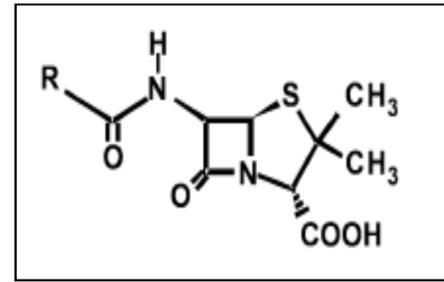


Fig 3. Structure chimique de la pénicilline (Martin et al., 2010)

Selon la nature du radical (R), on distingue plusieurs types de pénicillines : G, A, M, V... (Zitouni, 2010).

2. Pénicilline V

La phénoxy méthylpénicilline (pénicilline V), du groupe des pénicillines naturelles, du type des phénoxy pénicillines (figure 4). Une substance élaborée par certaines souches de *Penicilium notatum* ou par d'autres organismes apparentés (*Penicillium Chrysogenum*), dans un milieu de culture additionné d'un précurseur de chaîne latérale (acide phénoxyacétique), ou obtenu par tout autre moyen (acylation de l'acide 6-aminopénicillanique) (Hilder et al., 2002).

La pénicilline V ou phénoxy méthylpénicilline est administrable par voie orale (Fauchère et Avril, 2002).

La pénicilline V est active sur les bactéries à gram+ et les coques à gram -. (Cavallo et al., 2004).

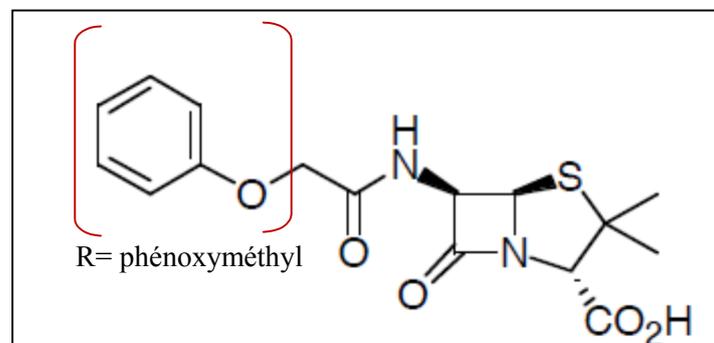


Fig 4. Structure chimique de la pénicilline V (Martin et al., 2010).

3. Biosynthèse de la pénicilline V

Toutes les pénicillines naturelles sont synthétisées par le même triacide aminé, L- α -aminoadipique, L-cystéine et L-valine. Chez les champignons, le L- α -AAA est dérivé de la voie spécifique des aminoadipates qui mène à la formation de la lysine. Il peut être aussi obtenu par le catabolisme de la lysine bien que la contribution de cette voie dans la synthèse de la pénicilline n'est pas encore clarifiée (**Brakhage, 1999 ; Martin et al., 2010**).

Dans la première réaction de la voie de biosynthèse des pénicillines, il y'a condensation des précurseurs (acides aminés) pour la formation du tripeptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cystéinyl-D-valine (ACV). Cette réaction est catalysée par une seule enzyme qui est la ACV synthase (**Brakhage, 1999 ; Martin et al., 2010**).

Dans la deuxième étape, il y'a transformation oxydative du tripeptide en une structure bicyclique formée d'un noyau β -lactame et d'un noyau thialozidinique qui est caractéristique aux pénicillines. Le composé résultant, l'isopénicilline N (IPN) possède une faible activité antibiotique, cette réaction est catalysée par l'isopénicilline N synthase (**Brakhage, 1999 ; Martin et al., 2010**).

Dans la troisième et la dernière étape de la biosynthèse de la pénicilline, la chaîne latérale hydrophile de L- α -AAA de l'IPN est échangée par un groupement acyle hydrophobe catalysée par l'acyle Coenzyme A : isopénicilline N acyle transférase (IAT) (**Brakhage, 1999 ; Martin et al., 2010**).

L'approvisionnement du milieu de culture avec l'acide phénoxyacétique ou l'acide phénylacétique, la synthèse peut être dirigée principalement vers la pénicilline V ou la pénicilline G respectivement (**Brakhage, 1999 ; Martin et al., 2010**).

La **figure 5** représente un schéma récapitulatif de la biosynthèse de la pénicilline V.

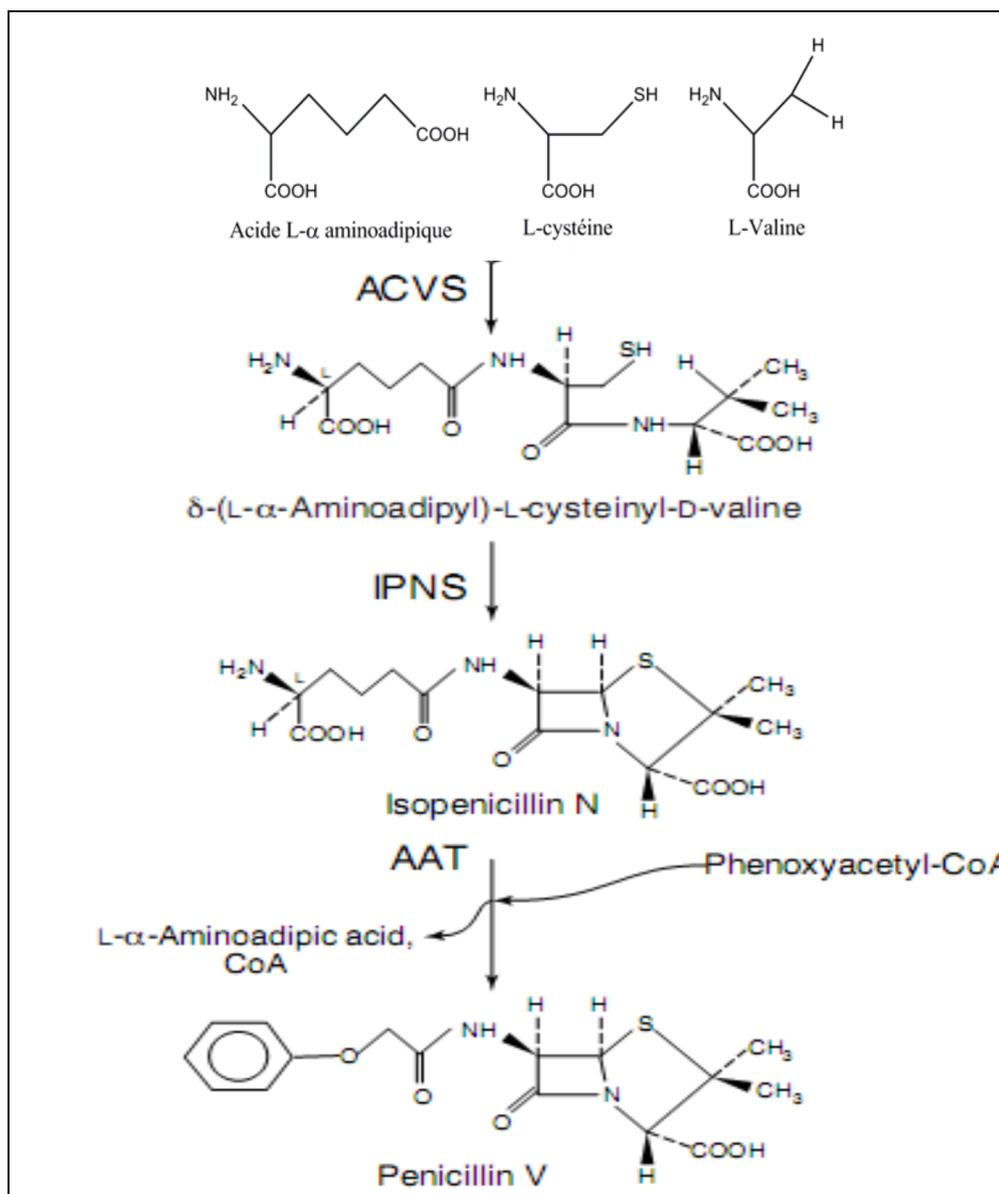


Fig 5. Les étapes de la biosynthèse de la pénicilline V

(Brakhage, 1999 ; Martin et *al.*, 2010).

II.1. Généralités sur le genre *Penicillium*

Le nom *Penicillium* est donné à un genre de champignons (moisissures), avec un thalle entièrement mycélien. Ils sont considérés comme des deutéromycètes ou fungi imparfaits. De manière inopinée, une reproduction sexuée avec formation de spores différentes (ascospores) est parfois découverte chez certaines espèces: ces *Penicillium* sont alors reclassés dans les genres *Talaromyces* ou *Eupenicillium*, suivant les caractères de la paroi ascocarpique. Il comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores, ainsi la vitesse de croissance du thalle du mycélium à différentes températures et sur différents milieux (Pitt, 1988).

De nombreuses espèces des *Penicillium* sont utilisées au niveau industriel pour la fabrication des fromages ou pour la production des différents métabolites d'intérêt, exemple de *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, qui sont utilisés pour l'obtention de différents antibiotiques (Botton et al., 1990).

II.2. *Penicillium chrysogenum*

1. Morphologie

Le *Penicillium chrysogenum* est un champignon filamenteux, avec un thalle à croissance rapide, vert-bleu ou vert-jaune, souvent surélevé au centre, sillonné radicalement, velouté ou un peu floconneux, avec une odeur aromatique (Botton et al., 1990). La figure 6 montre la morphologie du *Penicillium chrysogenum*.

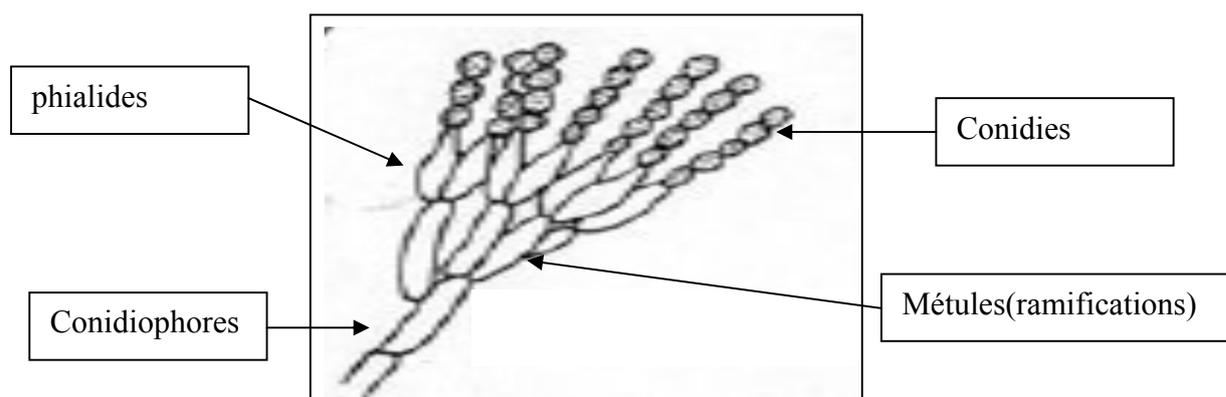


Fig 6. Schéma représentatif de la morphologie du *Penicillium chrysogenum* (Botton et al., 1990).

2. Habitat

Le *Penicillium chrysogenum* est une espèce ubiquiste, largement répandue : sol, céréales, textiles, peintures, matières végétales en décomposition, aliments etc. (Pitt et Hocking, 1999). Le premier isolement de la souche *Penicillium chrysogenum* était sur du melon moisi du marché de Péoria au Etats Unis.(Bouchet et al., 1999).

3. Classification taxonomique

Cette classification est basée sur des caractères purement morphologiques (Meyer et al., 1995).

Tableau II: Classification taxonomique du *Penicillium chrysogenum* (Meyer et al.,1995)

Phylum	Deuteromycotina (Deutéromycètes)
Classe	Hyphomycètes
Ordre	Moniliales
Famille	Moniliaceae
Genre	<i>Penicillium</i>
Espèce	<i>Penicillium Chrysogenum</i>

4. Mécanisme de croissance

Le *P. chrysogenum* présente des membranes dans ses hyphes. Ce sont des hyphes filamenteuses multicellulaires dont l'intégralité du cycle de croissance inclue des germinations de spores, la poussée des bouts de croissance des hyphes, la formation des branches ainsi que la formation et la différenciation des conidiophores (Yuet Ruan, 2006).

L'augmentation des hyphes influe seulement sur l'extension et le nombre des poussées de bouts de croissance. En établissant la structure morphologique du modèle dynamique du processus de fermentation de la pénicilline. Ces hyphes se divisent en cinq régions distinctes :

- La zone de croissance active A_0 ,
- La zone non-croissante A_1 , considérée comme zone de production de la pénicilline,
- La zone A_2 où il n'y a que les vacuoles qui ont pris le relais après l'arrêt du cycle de croissance,
- La région A_3 est celle de la dégénérescence où du métabolisme inactif,

➤ La région A₄ est celle de l'autolyse (Yu et Ruan, 2006).

La représentation schématique des cinq régions hyphales ci-dessus est montrée dans la figure 7.

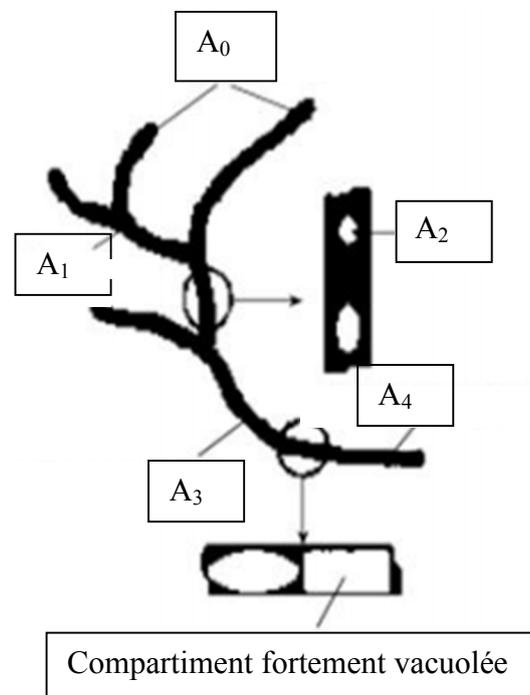


Fig 7. Représentation schématique des régions hyphales du *Penicillium chrysogenum* (Yu et Ruan, 2006).

II.3. Techniques d'amélioration et performance

Le *Penicillium chrysogenum* est obtenu à partir de l'amélioration du *Penicillium notatum* par des mutation-sélections donnant lieu à plusieurs "lignés principales" (Rouy, 1997).

Ces travaux d'amélioration n'ont visé au départ que l'augmentation de productivité des souches, celle que l'on détermine au laboratoire par des essais de production en fioles. Puis ont été pris en compte progressivement de nouveaux critères liés aux conditions réelles d'exploitation industrielles (Rouy, 1997).

Les industriels disposent aujourd'hui de souches adaptées aux opérations en fermenteurs de 100 à 200 m³ dans lesquels elles produisent jusqu'à 40g/l de pénicilline en

moins de 200h, avec d'excellents rendements sur substrat carboné et sur précurseur ; exemple de l'acide phénoxyacétique pour la pénicilline V (**Rouy, 1997**).

II.4. Techniques de conservation des souches

Il existe plusieurs techniques qui permettent de conserver les souches avec l'intégralité de leurs propriétés. Le principe consiste à maintenir les microorganismes en vie dans des conditions où l'activité biologique est réduite au minimum, de telle sorte qu'il n'y ait pas de mutations au cours d'une multiplication végétative (**kirsop et al., 1991**).

A cet aspect plusieurs techniques ont été appliquées :

- Gélose inclinée ;
- Conservation sous huile ;
- Conservation sur sol ;
- Conservation sur sillica-gel anhydre ;
- Congélation ;
- Lyophilisation (**kirsop et al., 1991**).

II.5. Mise en œuvre industrielle

Le *P. chrysogenum* est adapté pour la fermentation submergée, et est employé couramment dans la production industrielle de la pénicilline (**Yang, 2001**).

La fermentation est une étape d'un procédé industrielle, elle s'insère dans un ensemble d'opérations unitaires qui aboutiront à la valorisation de la biomasse et/ou à la valorisation des produits de bioconversion (**Nonus et al., 1997**).

La **figure 8** présente le principe de procédé fermentaire à l'échelle industrielle

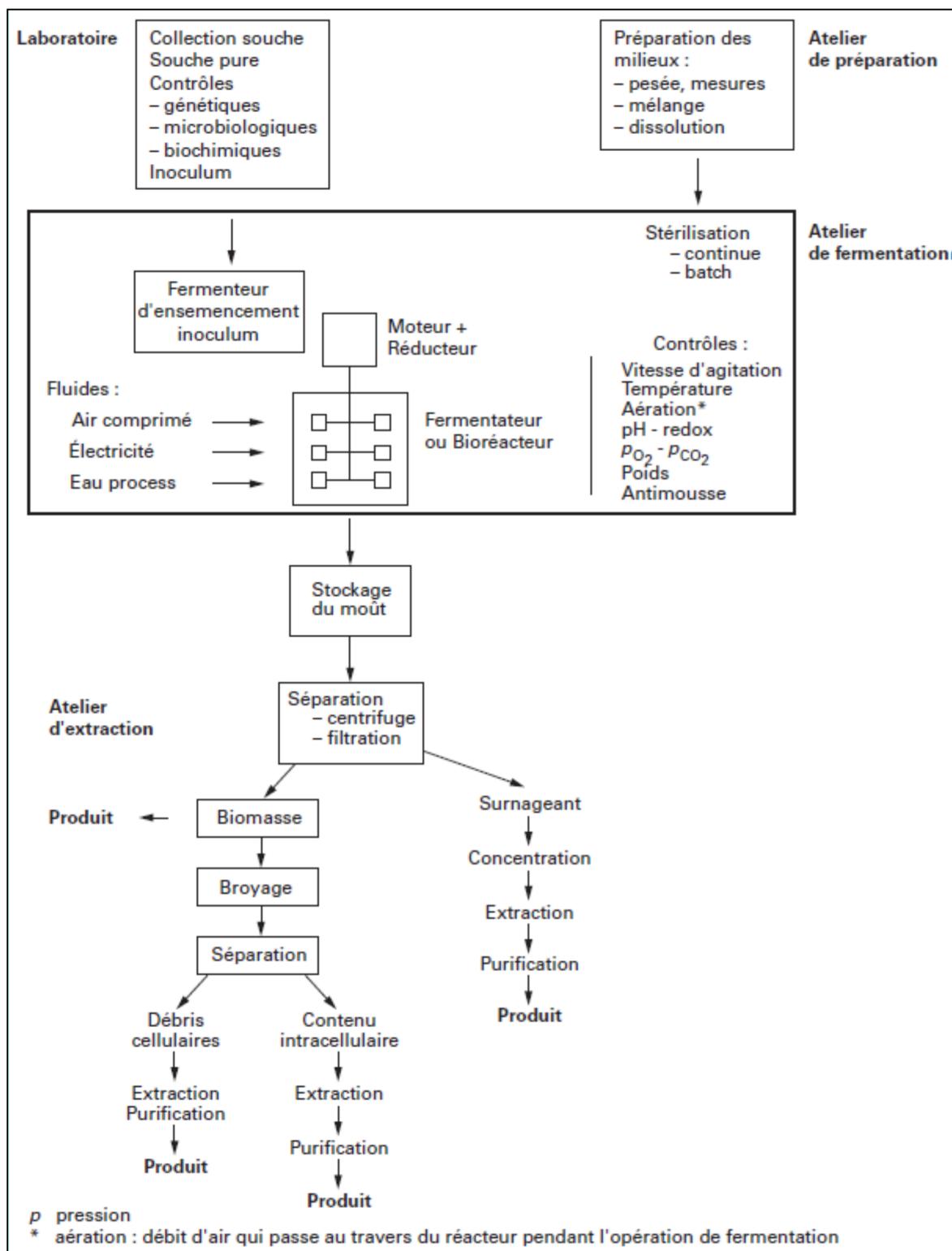


Fig 8. Schéma de principe du procédé fermentaire à l'échelle industrielle (Nonus et al., 1997).

Matériels et méthodes

I. Matériel

I.1. Souches productrices

Les souches productrices nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie industrielle du complexe ANTIBIOTICAL SAIDAL de Médéa, conservées sur une culture en milieu gélosé incliné dans un slant.

La souche mère est *P. chrysogenum* référenciée NPSQV1 LORDO 11,5 à été fournie sous forme lyophilisée en 2002, dans le cadre d'un partenariat entre SAIDAL et l'organisme italien (ALCHIM TECH). Cette dernière est réactivée le 04 mars 2003 et conservée sur quartz le 19 mars 2003.

I.2. Matériels analytiques

L'ensemble du matériel et réactifs utilisés durant ce travail sont présentés en **annexe 3**.

I.3. Milieux de cultures

Trois types de milieux de cultures sont utilisés :

- "CMP" V: Milieu solide pour la réactivation de la souche sur boîte de pétri, ainsi repiquage sur slant.
- "VMP"V: Milieu liquide pour la germination des spores dans des fioles agitées.
- "FPM"V : Milieu liquide pour la fermentation en batch dans des fioles agitées.

La composition et la préparation de chaque milieu de culture sont illustrées en **annexes 4**.

II. Méthodes (Selon le dossier technique du SAIDAL)

II.1. Réactivation de la souche

La souche PV 04/05/10 conservée sur gélose inclinée à 4°C, issue de la souche mère PV 03/01/03, est réactivée le 17 février 2013 sur des boîtes de pétri selon le protocole suivant :



Fig 9. Conservation de la souche PV 04/05/10 sur un milieu gélosé incliné

- Décongélation de la souche conservée sur milieu gélosé incliné sur slant à 4°C, dans un bain marie à une température de 37°C ou bien dans une chambre thermostatique à 25°C ;
- Obtention de la solution mère :
 - ✓ Effectuer un scraping à l'aide d'une pipette stérile ;
 - ✓ Ajouter 6 ml d'eau péptonée à 0,1%;
 - ✓ Mélanger bien la suspension ;
- Faire une série de dilution de 10^{-1} jusqu'à 10^{-10} ;
- Inoculation des boîtes de pétri contenant 25 ml du milieu "CMP" V séché au paravant à 37°C pendant 3 à 4 jours avec 0,2 ml de la dilution correspondante ;
- Incubation des boîtes de pétri à 25°C pendant 13 à 14 jours dans une chambre d'incubation avec une humidité contrôlée de $50 \pm 5\%$.

Il est nécessaire de renverser les boîtes de pétri après 24h d'incubation.

II.2. Repiquage sur milieu gélosé incliné

Après 14 jours d'incubation, deux colonies typiques sont choisies.

➤ Protocole à suivre

- Obtention de la suspension sporale :
 - ✓ Prélever une colonie typique à l'aide d'une anse stérile ;
 - ✓ Ecraser dans un tube Potter stérile contenant 2ml d'eau péptonée à 0,1%;
- Inoculation des slants contenant 50 ml du milieu "CMP" V, séché au paravant à 37°C pendant 3 à 4 jours avec 0,2 ml de la suspension sporale ;
- Incubation des slants à 25°C pendant 13 à 14 jours dans une chambre d'incubation avec une humidité contrôlée de $50 \pm 5\%$.

La colonie 01 donne naissance à une souche PV 05/01/13.

La colonie 02 donne naissance à une souche PV 05/02/13

II.3. Fermentation en batch dans des fioles agitées

La fermentation se déroule en deux étapes :

II.3.1. Germination

La germination est une étape permettant de faire germer les spores. De ce fait, on choisit pour chaque souche un slant où les spores sont réparties uniformément sur toute la surface (tapis verdâtre).

Cette étape a été réalisée selon le protocole suivant :

- Effectuer un scraping à l'aide d'une pipette stérile ;
- Ajouter 6 ml d'eau péptonée à 0,1 % ;
- Mélanger bien la suspension ;
- Inoculer les fioles d'Erlen Meyer de 500 ml préalablement préparées, contenant 35 ml du milieu "VMP "V à raison de 0,5ml de la suspension sporale par fiole ;
- Incuber les fioles dans la chambre thermostatique 25°C, 50± 5% d'humidité sous agitation rotative à 220 rpm pendant 40 h.

Après 40 h de germination :

- ✓ on mesure le pH du milieu, qui doit être compris entre 5,3 et 5,7 ;
- ✓ on mesure la sédimentation par centrifugation de 10ml de bouillon germinatif dans un tube conique gradué à 10, à une vitesse de 3000tr/min pendant 10 min.

Pour faire la lecture :

$$\text{Sédimentation (\%)} = \text{lecture} \cdot 10$$

NB : Le pourcentage de la sédimentation doit être compris entre 15% et 20%.

- ✓ on réalise des observations microscopiques pour confirmer l'absence de contamination à l'aide d'un microscope optique.

II .3.2. Fermentation

Les fioles d'Erlenmeyer de 500ml préalablement préparées, contenant chacune 35ml du milieu "FMP" V, sont inoculées avec 04 ml du milieu germinatif "VMP" V.

Cette étape a été réalisée selon le protocole suivant :

- Incuber les fioles dans des chambres thermostatiques à différentes températures testées (23°C, 25°C, 27°C et 29°C) sous agitation rotative à 220 rpm, à un taux d'humidité de $50 \pm 5\%$ pendant 09 jours ;
- A partir du 6^{ème} jour de la fermentation, on contrôle :
 - ✓ la sédimentation ;
 - ✓ le pH ;
 - ✓ l'absence de contamination par des observations microscopiques ;
 - ✓ la détermination de la productivité de chaque souche par mesure du titre de la pénicilline V par : spectrophotométrie et HPLC.

Pour chaque souche, quatre fioles ont été préparées.

II.4. Dosage de l'antibiotique (Pénicilline)

Le dosage de l'antibiotique a été opéré du 6^{ème} jusqu'au 9^{ème} jour de la fermentation, et ce pour évaluer la productivité des souches à partir du filtrat du bouillon fermentatif, selon deux méthodes distinctes :

II.4.1. Dosage par la méthode colorimétrique

Le principe de la méthode est l'absorption spécifique de la lumière par certaines molécules d'antibiotiques.

La méthode se base sur le fait que la pénicilline réagit rapidement avec l'hydroxylamine pour donner l'acide hydroxylamine qui forme une couleur pourpre avec l'ion ferrique dont la quantité peut être déterminée par colorimétrie.

L'inversion des réactifs est utilisée pour obtenir des valeurs « blanches » car la réaction de pénicilline avec l'hydroxylamine ne se vérifie pas dans le cas où la solution de pénicilline serait mélangée précédemment avec la solution ferrique.

➤ **protocole opératoire**

✓ **préparation de la courbe standard pour la détermination du Km**

Le km est un facteur de mesure de l'activité de l'antibiotique afin de déterminer le titre de ce dernier par spectrophotométrie. C'est une méthode appliquée uniquement au niveau de SAIDAL, et validée après plusieurs expériences.

Les préparations des solutions utilisées sont présentées en **annexe 6**.

- Peser avec exactitude en mg (pénicilline V standard) : 88,5 ; 59 ; 50,1 ; 38,3 ; 29,5 ; 11,8
- Dans des fioles de 10 ml, faire la dissolution des différentes pesées du standard de la pénicilline V en ajoutant quelque goutte de tampon phosphate (pH= 6), puis compléter le volume à 10 ml avec de l'eau distillée.
- Prendre des tubes à essai (6 pour les échantillons et 1 pour le blanc)
- Mettre dans chaque tube (6 tubes) 2,5 ml d'ED et 0,6 ml de la solution de la pénicilline V de la fiole correspondante.
- Mettre 3,1 ml d'ED pour le blanc.
- Mettre 2 ml de la solution alcaline (solution alcoolique) dans les 06 tubes ;
- Mettre 2 ml de l'alun de fer dans le blanc ;
- Agiter tous les tubes et laisser reposer pendant 5min ;
- Ajouter dans les 6 tubes 2ml de la solution alun de fer ;
- Ajouter dans le blanc 2 ml de la solution alcoolique ;
- Agiter tous les tubes et laisser reposer pendant 5min ;
- Faire l'étalonnage du spectrophotomètre avec le blanc afin d'avoir le zéro ;
- Faire la lecture de la Do à 480 nm ;
- Tracer la courbe des lectures (DO) des 6 solutions en fonction des concentrations correspondantes en UI/ml.

On devrait obtenir une droite passant par l'origine

NB : $1,6 \text{ UI} = 10^{-3} \text{ mg}$

$$Tg \alpha = Km$$

Les résultats des densités optiques (DO) du standard et la courbe de détermination du Km figurent en **annexe 7**.

✓ détermination des Do des échantillons

Pour mesurer les DO des échantillons des fermentations, le standard est remplacé par les filtrats des bouillons fermentatifs.

✓ Détermination du titre

Pour mesurer le titre de l'antibiotique :

$$\text{Titre (UI/ml)} = \text{DO} \cdot K_m$$

II.4.2. Dosage par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC est une technique d'analyse qualitative et quantitative de la chimie analytique dans laquelle l'échantillon contenant une ou plusieurs espèces est entraîné par un courant de phase mobile (liquide) le long d'une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, silice greffée, etc). Chaque espèce se déplace à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases.

Principe de la chromatographie

Il s'agit d'un fluide appelé phase mobile qui parcourt un tube appelé colonne ou phase stationnaire.

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne.

De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés.

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

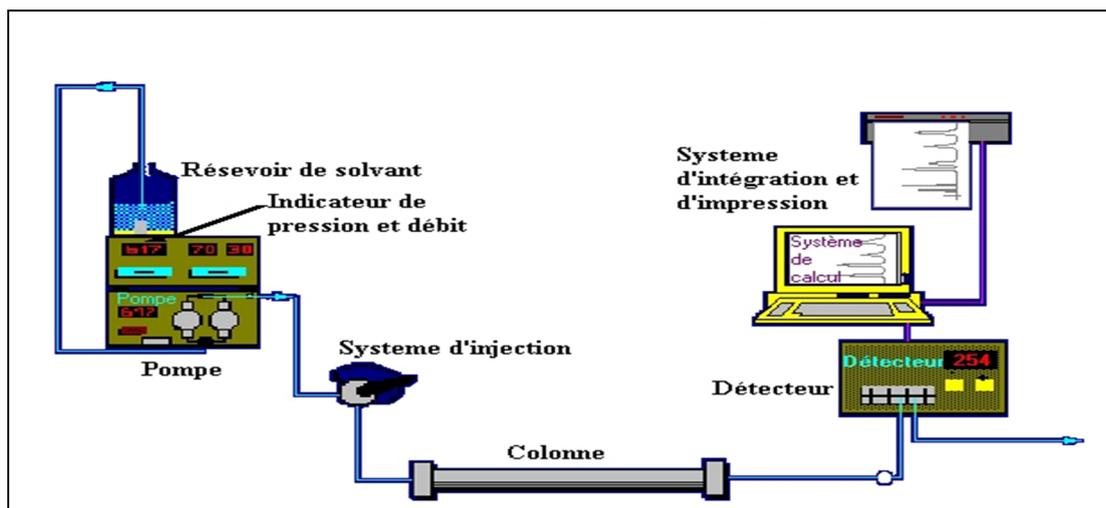


Fig 10. Schéma représentatif d'un dispositif de chromatographie liquide à haute performance (Anonyme, 2007).

II.4.2.1. Préparation des standards

✓ Solution standard de la pénicilline V

- Peser exactement 70 mg de pénicilline V standard dans une fiole jaugée de 100 ml ;
- Dissoudre avec la solution Tampon I et compléter le volume avec la même solution.

✓ Solution standard du précurseur de l'acide Phenoxyacétique (POAA)

- Peser exactement 30 mg du POAA dans une fiole jaugée de 100 ml.
- Dissoudre avec la solution Tampon I sous agitation 70°C pendant 10 min.
- Compléter le volume à 100 ml avec la même solution.

✓ Mélange de solutions standard de pénicilline V et de l'acide Phenoxyacétique

- Prendre 5 ml de chaque solution standard et les mettre dans une fiole jaugée de 100 ml puis compléter le volume avec la solution Tampon II ;
- Filtrer à travers un micro-filtre de 0,45 μm .

II.4.2.2. Préparation des échantillons

- Mettre 5ml du bouillon fermentatif, préalablement filtré à travers un papier filtre dans une fiole jaugée de 100 ml ;

- Diluer avec la solution tampon I puis compléter le volume jusqu'au trait de jauge ;
- Prendre 5 ml de cette solution, les mettre dans une fiole jaugée de 100 ml ;
- Diluer avec la solution tampon II ;
- Filtrer cette solution à travers un micro-filtre de 0,45 µm ;
- Injecter 20µl à l'aide d'une micro-seringue dans l'appareil de mesure chromatographique (HPLC).

➤ **Conditions chromatographiques :**

- Colonne : C18 dimension (250 × 4,6) mm 5 µm sphérique RP (gel de silice)
- Phase mobile : Acétonitrile /eau (33%)
- Débit : 0,8 ml/min
- Température : 28°C
- Volume d'injection : 20 µl
- Longueur d'onde : 215nm
- Atténuation : 128

II.4.2.3. Calcul du titre de la pénicilline V et de la concentration du précurseur (acide Phénoxyacétique)

Ces calculs se font selon les équations suivantes :

$$✓ \text{ Titre Pénicilline V : } \frac{Aire\ pic\ Ech \times Pes\ estd \times Act\ std}{Aire\ pic\ std \times 5}$$

$$✓ [\text{Acide Phénoxyacétique}] : \frac{Aire\ pic\ Ech \times Pes\ estd \times 100}{Aire\ pic\ std}$$

D'où : l'activité du standard est égale à 1681,78 UI/mg

La pesé de la pénicilline standard est égale à 70 mg

- ✓ La pesé du l'acide Phénoxyacétique est égale à 30 mg

Remarque : Pour des raisons techniques, on a pu effectuer les dosages par HPLC uniquement pour les tests de fermentations à 27°C et à 29°C.

Résultats et discussions

III.1. Résultats

III.1.1. Réactivation de la souche

La souche PV 04/05/10 réactivée sur milieu solide a donné un résultat positif, vu que toutes les boîtesensemencées ont donné des colonies typiques.

➤ **Morphologie des colonies typiques :**

- Diamètre.....8 à 10 mm.
- Couleur.....verte avec un petit cercle au tour clair au milieu.
- Pigmentation sur l'agar.....pigments non diffusibles.
- L'envers de la colonie.....couleur pratiquement blanche.
- Observation à l'œil nubonne et uniforme.
- Sporification.....centre élevé de 3 mm.

III.1.2. Repiquage sur milieu gélosé incliné

Les slantsensemencés par les deux souches PV 05/01/13, PV 05/02/13 ont présenté des tapis verdâtres uniformes sur toute la surface de la gélose, ce qui indique le développement des spores de ces souches.

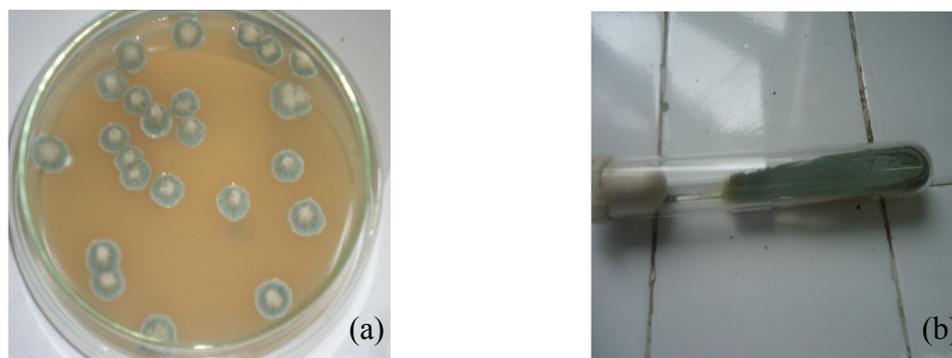


Fig 11. Apparition des colonies typiques **(a)** et d'un tapis verdâtre **(b)** sur milieu "CMP" V après 14 jours d'incubation.

III.1.3. Fermentations en batch dans des fioles agitées

L'observation microscopique après chaque test de germination et de fermentation pour les quatre tests fermentatifs a révélé l'absence de contamination.

III.1.3.1. Germination

Le pH des milieux végétatifs des quatre tests de fermentation après stérilisation, est de 5,60.

a) Test de fermentation à température 23°C

- Mesure du pH et estimation de la biomasse

Après 40 h de germination, les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III: pH et biomasse après 40 h de germination (test 23°C).

Souche	pH	Biomasse (%)
PV 05/01/13	5,17	15
PV 05/02/13	5,55	17

b) Test de fermentation à température 25°C

- Mesure du pH et estimation de la biomasse

Après 40 h de germination, les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV: pH et biomasse après 40 h de germination (test 25°C).

Souche	pH	Biomasse (%)
PV 05/01/13	5.23	17
PV 05/02/13	5.31	19

c) Test de fermentation à température 27°C

- Mesure du pH et estimation de la biomasse

Après 40 h de germination, les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau V : pH et biomasse après 40 h de germination (test 27°C).

Souche	pH	Biomasse (%)
PV 05/01/13	5.21	17
PV 05/02/13	5.15	18

d) Test de fermentation à température 29°C

- Mesure du pH et estimation de la biomasse

Après 40 h de germination, les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous

Tableau VI : pH et biomasse après 40 h de germination (test 29°C).

Souche	pH	Biomasse (%)
PV 05/01/13	5,34	17
PV 05/02/13	5,6	20

III.1.3.2. Fermentation

a) Evolution du pH

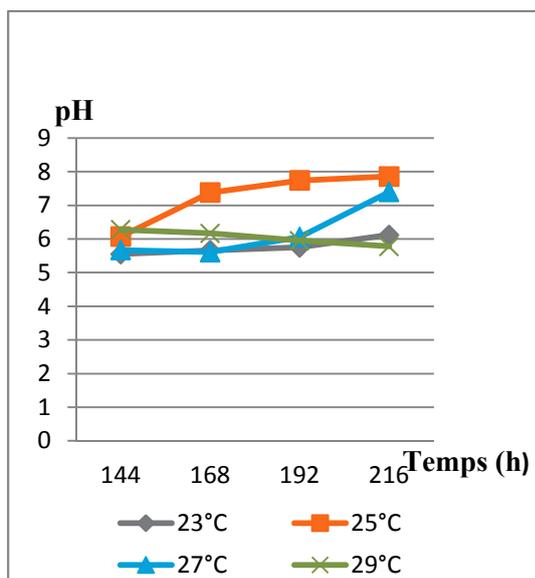


Fig 12. Evolution du pH des milieux fermentatifs pour S1.

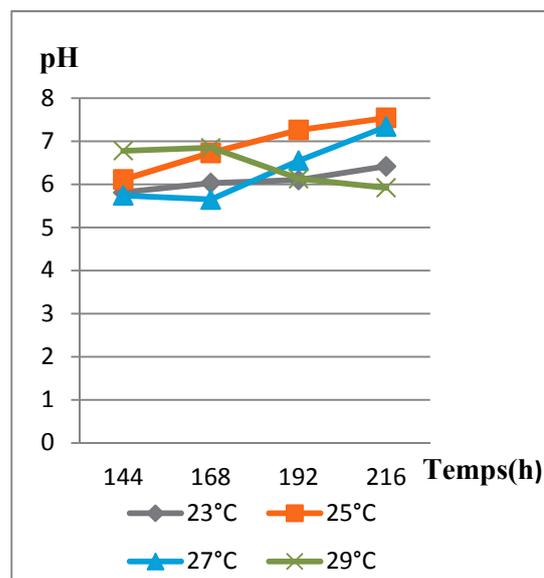


Fig 13. Evolution du pH des milieux fermentatifs pour S2.

b) Estimation de la biomasse

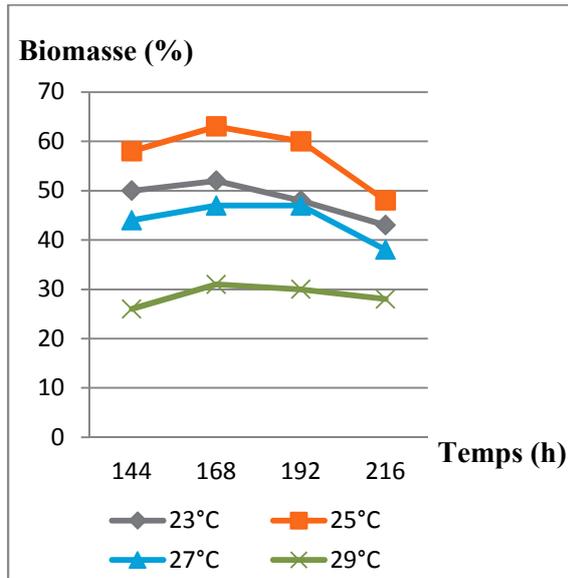


Fig 14. Evolution de la biomasse des milieux fermentatifs pour S1.

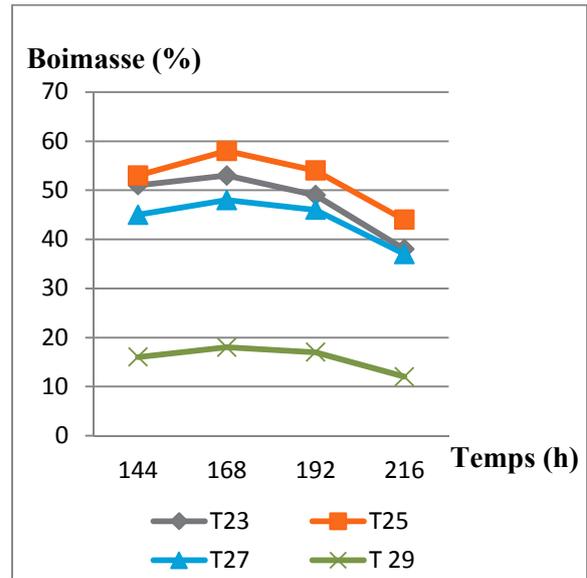


Fig 15. Evolution de la biomasse des milieux fermentatifs pour S2.

c) Titre de la pénicilline V par spectrophotométrie :

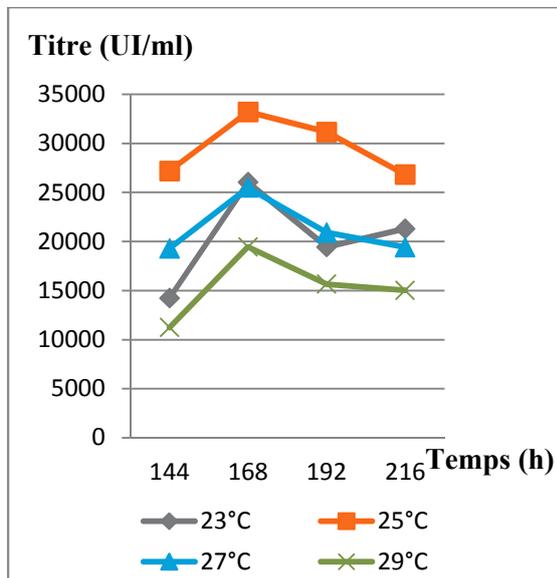


Fig 16. Evolution du titre de la péni V dans les milieux fermentatifs pour S1.

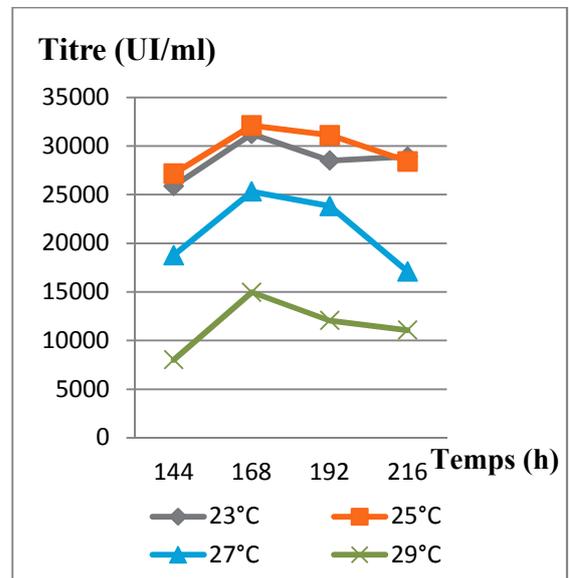


Fig 17. Evolution du titre de la péni V dans les milieux fermentatifs pour S2.

d) Titre de la péni V par HPLC :

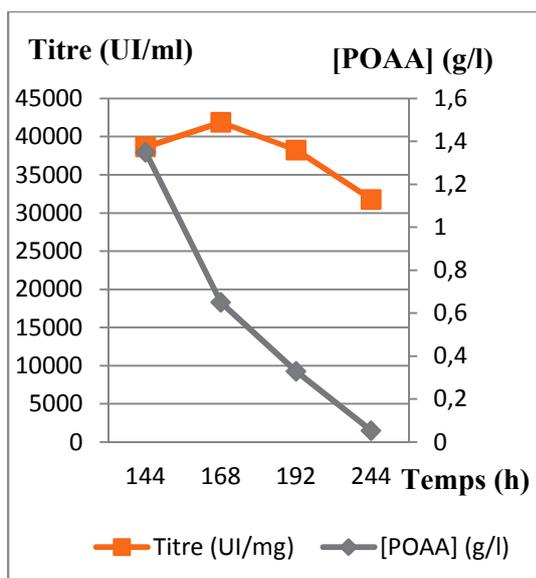


Fig 18. Evolution du titre de la péni V et de la [POAA] durant la fermentation à 27°C pour S1.

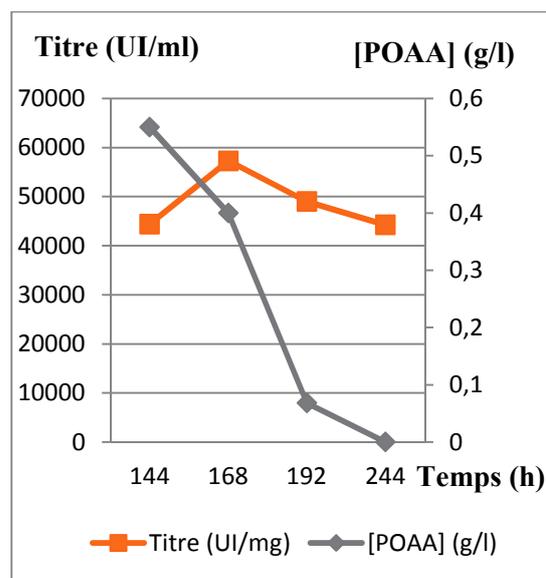


Fig 19. Evolution du titre de la péni V et de la [POAA] durant la fermentation à 27°C pour S2.

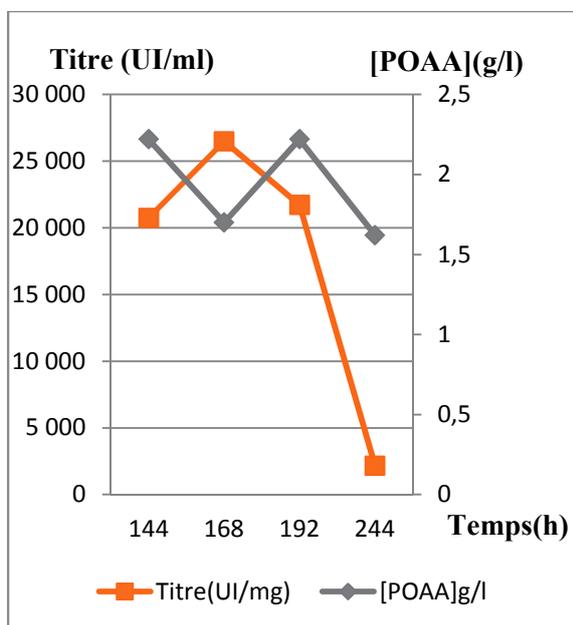


Fig 20. Evolution du titre de la péni V et de La [POAA] durant la fermentation à 29°C pour S1.

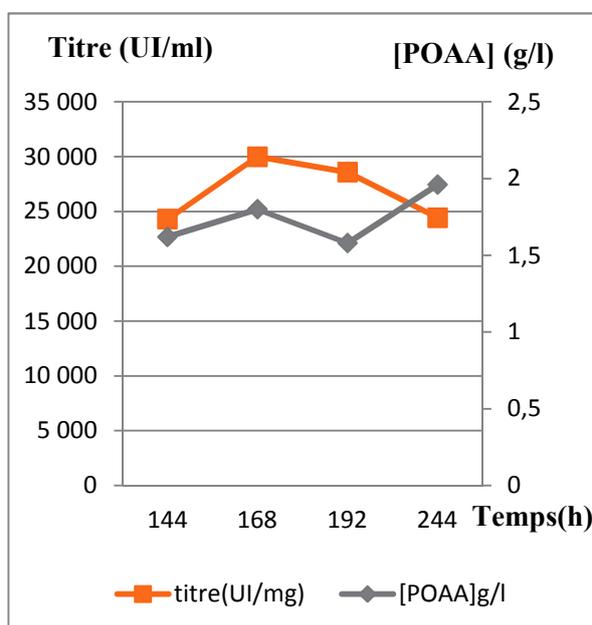


Fig 21. Evolution du titre de la péni V et de [POAA] durant la fermentation à 29°C pour S2.

III.2. Discussions

III.2.1. Réactivation et repiquage des souches conservées sur milieu gélosé

La réactivation de la souche PV 04/05/10 conservée depuis 2010 a donné des colonies typiques après 14 jours d'incubation et apparition d'un tapis verdâtre après le repiquage sur slants.

Selon la littérature, un bon résultat est assuré par une durée de conservation de 8 à 10 mois (**Botton et al., 1990**).

Pour avoir des bons résultats lors de la germination et fermentation, la réactivation sur boîte et le repiquage à nouveau sur slants étaient évident vu que la souche utilisée date de plus de deux ans. En effet, la conservation des souches sur milieu gélosé pour une longue durée est exposée à des problèmes de contamination et de variabilités génétiques.

III.2.2. Evolution du pH

Pour tous trois tests de fermentations (23°C, 25°C, et 27°C) effectués sur S1 et S2, on observe une augmentation du pH allant de 5 jusqu'à 7 tout au long du suivie de la fermentation (**figures 12 et 13**).

Cette évolution est dû à l'accumulation de l'ammoniac gaz (NH₃) résultant de la décomposition des composés azotés du milieu (protéines et acides aminés) (**Jerome et al., 2004**).

Pour le test de fermentation à 29°C, on remarque une baisse du pH pour S1 et S2, en parallèle avec une diminution de la croissance, résultant au non consommation des composés azotés du milieu.

III.2.3. Estimation de la biomasse

L'allure des courbes de croissances des deux souches (**figures 14 et 15**) dans les quatre tests de fermentations montrent toutes, trois phases :

➤ **Phase de ralentissement (144h à 168h) :**

Il y'a un ralentissement de la croissance cellulaire pour S1 et S2. Ce ralentissement est provoqué par la diminution des composés essentiels pour la croissance dans le milieu fermentatif (**Thonart, 2007**).

➤ **Phase stationnaire (168h à 192h) :**

Dans cette phase la concentration en cellules atteint son niveau maximal. Toutefois, la croissance cellulaire est en arrêt mais celle-ci confit une bonne activité métabolique (Thonart, 2007).

➤ **La phase de déclin (192h à 216h) :**

Dans cette phase, on observe une décroissance de la concentration en biomasse. Cette phase résulte du vieillissement du mycélium qui perd sa flexibilité. Ceci pourrait être dû aux forces de cisaillement engendrées par le mouvement de l'agitation, de l'épuisement de milieu, du manque d'oxygénation, de l'accumulation du CO₂ et des déchets. En Outre l'autolyse des cellules végétatives est aussi un facteur qui entrainerait la diminution du nombre de cellules vivantes (Bal, 2006).

Selon Thonart (2007), on observe souvent une division cellulaire de quelques espèces par consommation de la matière organique libérée par les cellules mortes, mais, la vitesse de croissance est inférieure à celle de la mortalité cellulaire.

Toutefois le pourcentage de la biomasse chez les deux souches S1 et S2, est différent d'un test de fermentation à un autre. En effet, des valeurs maximales de l'ordre de 63% pour S1 et de 58% pour S2, ont été observées pour le test de fermentation à T 25°C.

D'après Pitt (1988), le *P. chrysogenum* est mésophile avec des optima de croissance à 25°C. Cette valeur de température intervient dans la sporulation et la germination des spores

Les tests fermentatifs à 23°C et à 27°C, ont donné des valeurs maximales de 52% et de 53% respectivement, qui sont par ailleurs inférieures à celles de la fermentation à 25°C.

Ces résultats confirment les travaux de la littérature prédisant selon Samson et al., (2007) un optimum de croissance des *Penicillium* dans l'intervalle des températures variant de 20°C à 25°C.

Au-delà de la température de 25°C, on observe décroissance pour atteindre des valeurs minimales chez le test de fermentation à T 29°C, avec un pourcentage de 31% pour S1 et 18% pour S2.

L'influence de la température sur la croissance est en fait liée à la turgescence et à l'activité des enzymes de la cellule. Selon la littérature, les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des différentes enzymes (**Cloutier et al., 1992**).

III.2.4. Titre de la pénicilline V par spectrophotométrie:

Sur les graphes (**figures 16 et 17**), on remarque que l'évolution de la synthèse de la pénicilline V entre la S1 et la S2 durant la fermentation est identique pour tous les tests fermentatifs. Elles atteignent un maximum de production au 7^{ème} jour de fermentation. Au-delà on observe une vitesse de diminution variable d'un test à un autre.

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires synthétisés à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et au début de la phase stationnaire (idiophase) (**Scriban, 1999**).

Le maximum de production de pénicilline V correspond à une période de consommation d'une grande quantité du lactose (**Asselineau et Zelta, 1973**).

La baisse de production peut être liée à la synthèse de la phénoxyéthylpénicilline amidohydrolase, isolée du *P.chrysogenum*, qui hydrolyse la phénoxyéthylpénicilline en 6-APA au voisinage du pH 7,6. (**Whiteman et abraham, 1996**).

Une grande productivité en pénicilline V est observée chez le test fermentatif mené à 25°C avec un maximum de 33203 UI/ml pour S1 et de 32106 UI/ml pour S2

Une baisse importante de productivité est enregistrée chez le test fermentatif à 29°C pour les deux souches, avec un maximum de 19448 UI/ml pour S1 et de 14965 UI/ml pour S2

Les valeurs obtenues chez les tests fermentatifs à 23°C et à 27°C sont modérées. Des valeurs maximales; de 26020 UI/ml pour S1 et 31220 UI/ml pour S2 à la température de 23°C, et de 25480 UI/ml pour S1 et 25313 UI/ml pour S2 à la température de 27°C.

La comparaison entre les différents tests de fermentation, montre que la fermentation à la température de 25°C permet d'obtenir une multiplication importante du mycélium chez les deux souches, par conséquent, ceci assure une meilleure production de la pénicilline V. Par ailleurs, on retient que l'intervalle de température compris entre 23°C et 27°C pourrait être convenable pour la croissance des deux souches du *P. chrysogenum* exploitées.

III.2.5. Titre de la pénicilline V par HPLC:

Dans des conditions chromatographiques données, le temps de rétention (t_R), temps au bout duquel un composé est élué de la colonne pour être détecté, caractérise qualitativement et quantitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

Le spectre HPLC de notre standard (**annexe 10**) montre un premier pic de t_R de 4,53 min et un second pic à 11,49 min. Selon les résultats des travaux de la littérature (**Guy et al.**), le premier t_R (4,53 min) est attribuable à la pénicilline V et celui de 11.49 min au précurseur POAA.

➤ Test fermentatif à T 27°C

Les résultats des **figures 18** et **19** montrent que la production de la pénicilline augmente jusqu'à 168 heures de fermentation puis diminue progressivement. Pour le précurseur, on observe une chute brutale au cours de la fermentation. Ces observations sont similaires pour les deux souches S1 et S2. Cet antagonisme de diminution du précurseur avec celle de la pénicilline, après 168 h de fermentation, pourrait être attribué à la contribution de plusieurs facteurs entre autre l'enzyme, le pH du milieu, la température ...

➤ Test fermentatif à T29°C

Les résultats des **figures 20** et **21** montrent que les courbes représentant l'évolution de la production de la pénicilline V, une croissance jusqu'à 168 heures de fermentation. Au-delà, la cinétique d'évolution est différente. Chute brutale dans la **figure 20** (S1) et progressive dans la **figure 21** (S2). L'optimum de production de la pénicilline V est donc identique avec les deux souches.

Pour le POAA l'évolution des courbes est en dents de scie. On observe une augmentation du POAA entre 168 h et 192 h chez la souche 1 (**figure 20**) et entre 192 h et 244 h chez la souche 2 (**figure 21**). Les explications à ces augmentations seraient traduites par les spectres HPLC, tracés dans l'**annexe 21** et l'**annexe 26** pour S1 et S2 respectivement. En effet, les deux pics qui sont proches, présentent des t_R égaux à 11,49 min et à 11,91 min ; et la forme des pics indique qu'il y a aussi présence de deux substances ayant des t_R voisins qui

donnent des spectres en partie superposés. Ces substances seraient probablement la cause de l'augmentation de l'aire du pic que l'appareillage n'arrive pas à séparer pour mieux les analyser.

Conclusion

Conclusion

Au cours de notre étude effectuée au niveau de laboratoire de microbiologie industrielle du complexe ANTIBIOTICAL SAIDAL, nous avons optimisé la production de la pénicilline V par la souche *Penicillium chrysogenum* conservée sur gélose inclinée, en étudiant le seul paramètre influant sur le milieu fermentatif à savoir la variation de la température.

A partir de la souche réactivée PV 04/05/10, qui a donné naissance à deux souches S1 et S2, nous avons réalisé des germinations de deux jours suivies des fermentations de 9 jours dans des fioles agitées maintenues à des températures constantes de 23°C, de 25°C, de 27°C et de 29°C. Les résultats obtenus suite à la variation de ce paramètre de température d'incubation indiquent une variation des vitesses de croissance et de production de la pénicilline V.

Les analyses effectuées par spectrophotométrie dans le visible sur les milieux de fermentation menées en batch dans l'intervalle de température considéré, ont montré une production de la pénicilline V jusqu'à 7^{ème} jours de fermentation, avec une valeur maximale à 25°C.

Les analyses par la méthode HPLC effectuées uniquement sur les tests fermentatifs à 27°C et à 29°C ont montré une production effective de la pénicilline V, avec une activité meilleure chez le test à 27°C que à 29°C pour les deux seules températures considérées.

L'application industrielle de la production de métabolites secondaires exige de concevoir des installations dans lesquelles la régulation de tous les paramètres influant sur la production de la pénicilline V puisse être modélisée judicieusement et d'une manière très précise et d'une façon stable et continue.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Anonyme. (2007). HPLC. <[http : //www. rocler. qc.ca/pdubreui/chromatographie/HPLC/chroma 4.html](http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/HPLC/chroma4.html)>. (Consulté le 08/05/2013).

Aouni N, Bitouri M. (2006). Proposition d'un plan communication, Filiale Antibiotical Médéa (document de l'entreprise).

B

Bal Y, Bal K E, Laarbi-Bouamrane O, Lallam A. (2006).Copper II uptake by *Pleurotus mutilis* biomass, chitin and chitosan. *Minerals Engineering*. **19**, 1456-1458.

Benyoussef S. (2012). Les bétalactamines. < [http : //www.Doc les antibiotiques/les antibiotiques1/Pénicillines.htm](http://www.Doclesantibiotiques.com/lesantibiotiques1/Penicillines.htm)>(consulter le 21/02/2013).

Bibbal D.(2008).Impact des bêta-lactamines sur l'émergence d'entérobactéries résistantes dans la flore digestive chez le porc: caractérisation et strategies de prevention.Thèse de Doctorat de pharmacologie. Université de Toulouse III, 152 p.

Botton B , Breton A,Fèvre M, Gauthier S, Guy P, Larpent J P, Reymond P, Sanglier J J, Vayssier Y, et Veau P. (1990).Moisissures utiles et nuisibles Importance. Edition : Masson. Paris. 489 p.

Bouchet Ph, Guignard J. (1999). Les Champignons: Mycologie Fondamentale et Appliquée. Edition: Masson. Paris. pp.111-169.

Brakhage A A. (1999). Biosynthesis of β -lactam compounds in microorganisms. In: Kelly J W, (Eds.), *Aminoacids, Peptides, Porphyrins and Alkaloids*, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 159–193.

C

Cavallo J D, Fabre R, Jehl F, Rapp C et Garrabé E. (2004). Bétalactamines. EMC-Maladies infectieuses. (Eds.), Elsevier. Paris, pp.129-202.

Cloutier J, Prevost D, Nadou P et Antaun H. (1992). Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl Environ Microbiol.* **58**, 2846-2853.

D

Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. (Eds.), INRA. Paris, pp.52-57

Demain A L. (2000). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455-63.

Dossier technique de la filiale ANTIBIOTICAL de SAIDAL

F

Fauchère J L et Avril J L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Edition: EllipsMarketing. 368p.

Faure S. (2008). Pharmacothérapie pratique : Les pénicillines. *Actualités pharmaceutiques.* **476**, 43-46.

G

Guy M G, Amaya J, Vincent H, Carlos V P, Ellen S, Nico V E, Marc C et Martin J. Rapport Final SSTC (1998-2001). Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires. <<http://www.belspo.be/belspo/organisation>> (Consulter en Mai 2013).

H

Hilder E F, Klampfl C W, Buchberger W et Haddad P R. (2002). Electrophoresis. (Eds.), Fed, Germany, pp. 414-418.

J

Jerome J, Perry, James T, Staety ET Stephen Lory. (2004). Microbiologie. Edition: Dunod. Paris. 580p.

K

Kirsop B E, Doyle A.(1991). Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods (2nd edition). (Eds.), Academic Press, London

L

Laurent F. (2009). Principales β -lactamines :Pénicillines G, A, M, Inhibiteurs de β -lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, Monobactames et Carbapénèmes. Laboratoire deMicrobiologie. Groupement Hospitalier Nord. Lyon. pp.7-9.

M

Martin J F, Ullan R V et Estrada C G. (2010). Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. *Micro.Biotech.* **3.** pp.285-299.

Meyer A, Deiana J, Lecher H. (1995). Cours de microbiologie générale biosciences et techniques (Eds.), Doin, paris, pp. 92-124.

Mohammedi, (2010). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb.* **91,3-6.**

N

Nonus M., Cognart P., Kergoat F., Lebeault J M.(1997). Fermentation industrielle : conception et réalisation. *Techniques de l'ingénieur, traité de génie de procédé,[J 6 006].* pp. 2-18.

P

Patrick G L. (2003). Chimie pharmaceutique. Edition: DeBoeck

Pitt J I. (1988). Laboratory guide to common *Penicillium* species, 2ndEdition: commonw scientific Ind research organization. North Ride Australia. 197p.

Pitt J I et Hocking A D. (1999).Fungi and food spoilage.In: A Chapman and Hall Food Science Book. (2ndEds.), John Wiley and Sons. Ltd. England, pp. 289-290.

R

Rouy N. (1997). Penicillin. *Technique de l'ingenieur.doc, Procédés chimiques et biochimiques, [J6470].*7p.

S

Samson R A, Hoekstra E S, Frisvad J C. (2004). Introduction to food-and airborne fungi. (7^{ème} Eds.), Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, pp. 389-392.

Scriban R. (1999). Biotechnologie. 5^{ème} Edition: Techet doc, Paris, 1017p.

Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir des microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat de Génie des Procédé et Environnement. Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, 181p.

T

Thonart. (2007). Industries d'extraction et de fermentation. Centre Walson de biologie industrielle. Belgique. pp 1-200.

W

Whiteman P A et Abraham E P. (1996). Phenoxyethylpenicillinamidohydrolases from *Penicillium chrysogenum*. The sir William Dunn School of Pathology. South Parks Road, Oxford OXI 3RE, UK.

Y

Yang R D. (2001). Modern Industrial Microbiology South China, University of Technology Press, p. 53.

Yu N, Ruan X. (2006). A cellular automata model for simulating fed-batch penicillin fermentation process. Front. BIO. China **2**, pp.195-202.

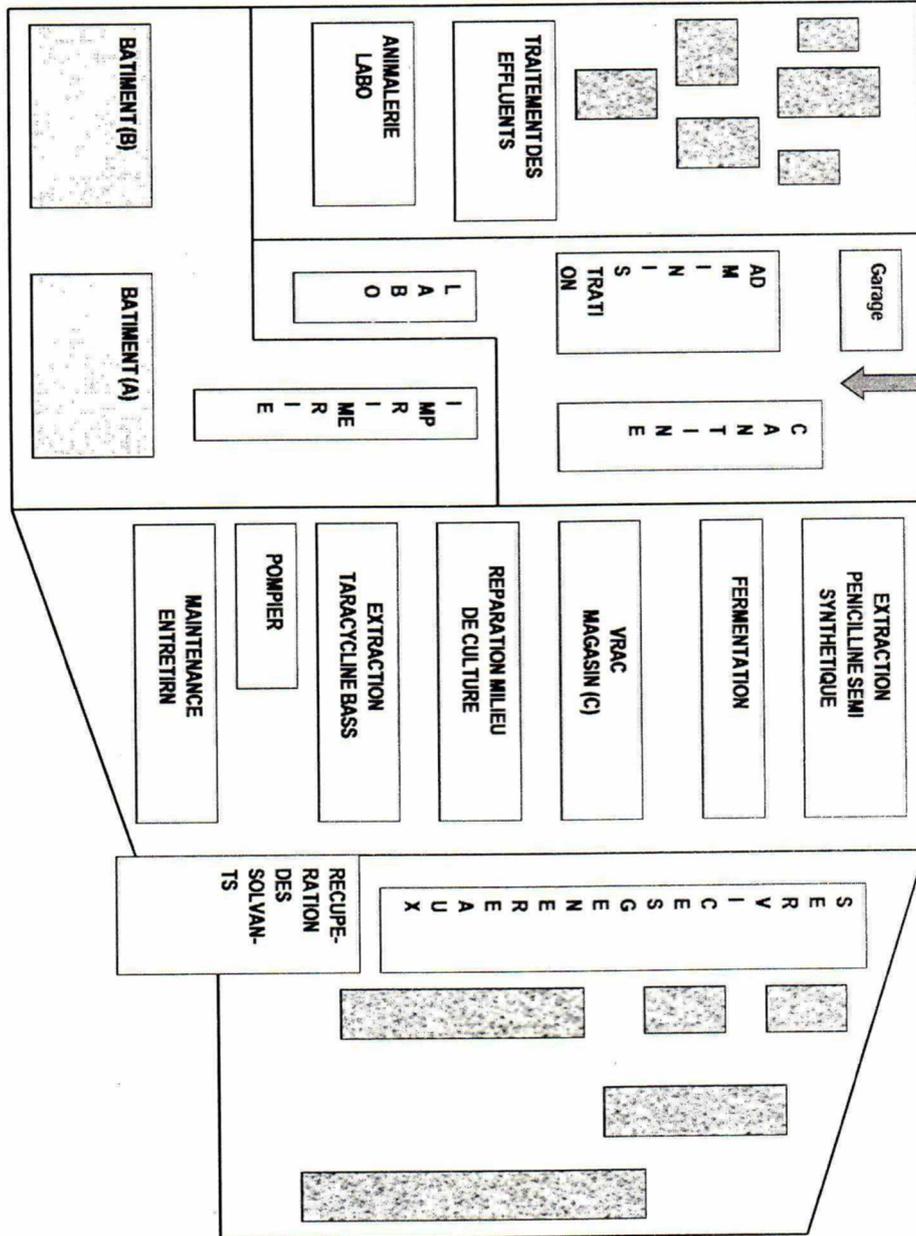
Z

Zitouni L. (2010). Spécialités sous la loupe : Les pénicillines. L'Officinal. **83**, pp.47-50.

Annexes

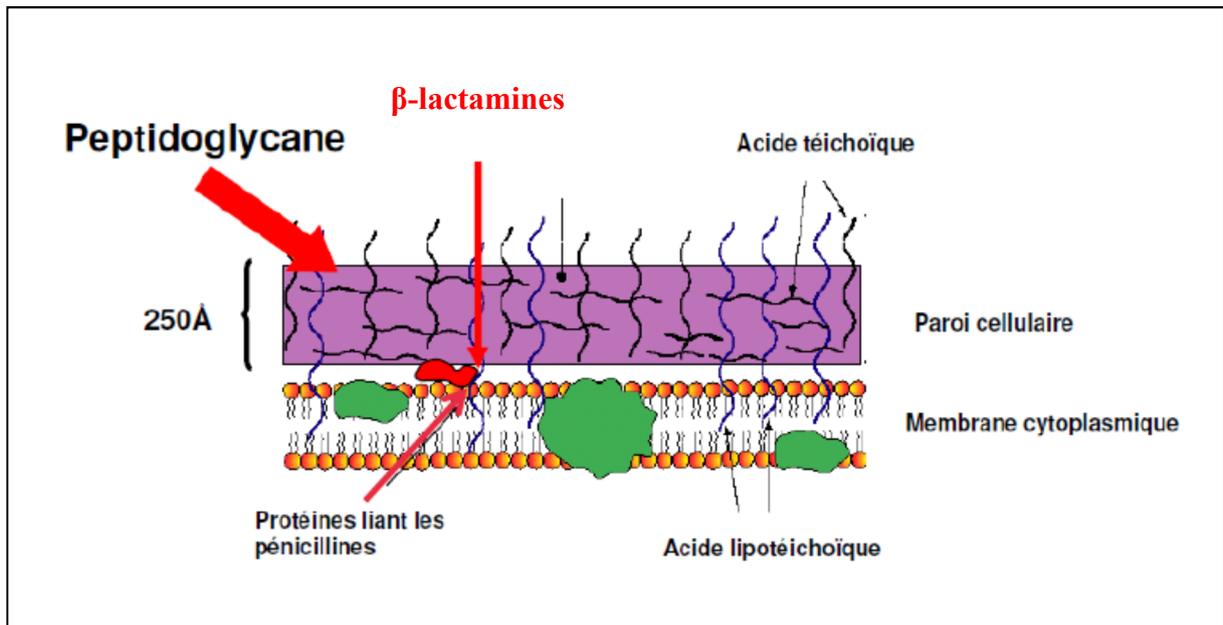
Annexe 1

Organisation de la filiale ANTIBIOTICAL

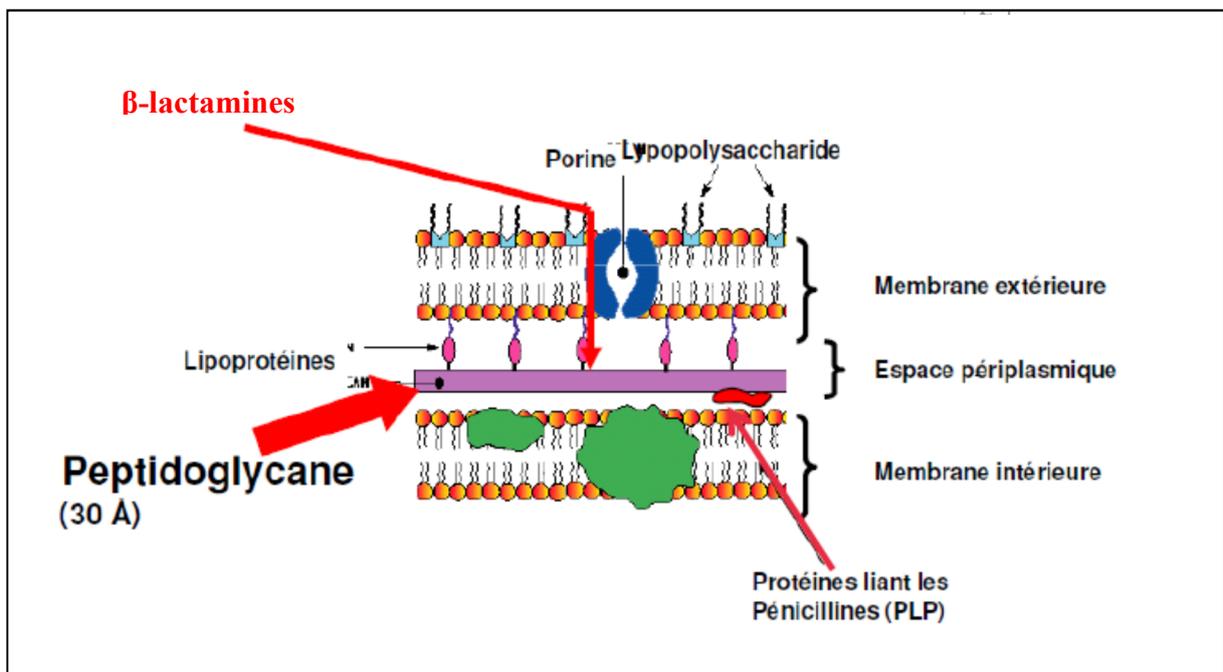


Annexe 2 (Benyoussef, 2012)

Mécanisme d'action des β -lactamines sur la paroi cellulaire des bactéries G⁺ :



Mécanisme d'action des β -lactamines sur la paroi cellulaire des bactéries G⁻ :



Annexe 3

Appareillage

- ✓ Agitateur magnétique "FISHER BRAND" ;
- ✓ Agitateur mécanique "HEAVY STIRRER" ;
- ✓ Agitateur rotatif "Continental Instrument" ;
- ✓ Autoclave (stérilisation à chaleur humide, 121°C/ 1,1 bar) "CALMIC CISA" ;
- ✓ Bain-marie ;
- ✓ Balance analytique "GIBERTINI" ;
- ✓ Centrifugeuse "CENTRIFUGE 4225" ;
- ✓ Chambre stérile (Hôte à flux laminaire) ;
- ✓ Chambre thermostatique (55% d'humidité) "CONTINENTAL INSTRUMENT" ;
- ✓ Etuve (stérilisation du matériels à chaleur sèche /250°C) "TORRE PICENARDCCR, CBM" ;
- ✓ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) "PERKIN ELMER"
- ✓ Microscope photonique "Olympus" ;
- ✓ pH mètre "METROHN" ;
- ✓ Réfrigérateur (+ 4°C) ;
- ✓ Spectrophotomètre "PERKIN ELMER"

Verrerie et petit matériels

- ✓ Anse ;
- ✓ Béchers ;
- ✓ Boîtes de Pétri ;
- ✓ Coton cardé ;
- ✓ Entonnoirs ;
- ✓ Fioles d'Erlenmeyer ;
- ✓ Fioles jaugées ;
- ✓ Gaze ;
- ✓ Papier de filtration WATMAN ;
- ✓ Papier Willy ;
- ✓ Pipettes (1, 2, 5, 10, 20 ml) ;
- ✓ Poires ;
- ✓ Portoirs ;
- ✓ Slants ;
- ✓ Spatules ;
- ✓ Tubes à essai ;
- ✓ Tubes coniques ;
- ✓ Tubes Potter.

Réactifs et solutions

- ✓ Acétate de sodium anhydre ;
- ✓ Acétonitrile ;
- ✓ Acide orthophosphorique ;
- ✓ Acide phénoxyacétique ;
- ✓ Acide sulfurique ;
- ✓ Agar ;
- ✓ Alcool éthylique ;
- ✓ Carbonate de calcium ;
- ✓ Chlorure de fer hexa-hydraté ;
- ✓ Chlorure de sodium ;
- ✓ Chlorure d'hydroxylamine ;
- ✓ Corn steep liquor ;
- ✓ Dextrose anhydrous ;
- ✓ Eau peptonée ;
- ✓ Huile de soja ;
- ✓ Hydroxyde de potassium ;
- ✓ Hydroxyde de sodium ;
- ✓ Lactose ;
- ✓ Peptone ;
- ✓ Pharmamédia ;
- ✓ Phosphate de potassium diacide ;
- ✓ Phosphate de potassium monoacide ;
- ✓ Réactif alcalin ;
- ✓ Solution d'acide orthophosphorique (H_3PO_4) à 1% ;
- ✓ Solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 20% ;
- ✓ Solution d'hydroxyde de sodium NaOH (1N) ;
- ✓ Solution d'hydroxyde de sodium NaOH (1%) ;
- ✓ Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 20% ;
- ✓ Solution alcoolique ;
- ✓ Solution tampon phosphate (pH= 6) ;
- ✓ Sulfate d'ammonium ;
- ✓ Sulfate d'ammonium ferrique ;
- ✓ Sulfate de cuivre penta-hydraté ;
- ✓ Sulfate de magnésium hépta-hydraté ;
- ✓ Sulfate de potassium ;

Annexe 4

Milieu "CMP" V

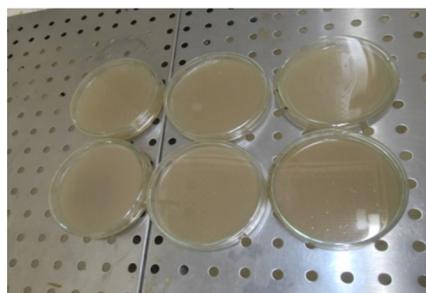
Milieu solide pour la réactivation de la souche sur boîte de pétri et repiquage sur slant.

Composition

- Lactose (Merck).....	15g
- Corn steep liquor (Roquette).....	05g
- Peptone (Difco).....	05g
- Chlorure de sodium (Merck).....	04g
- Sulfate de magnésium héptahydraté (Merck).....	0,5g
- Phosphate de potassium monobasique(Merck).....	0,6g
- Chloride de fer hexahydraté (Merck).....	0,5g
- Sulfate de cuivre pentahydraté (Merck).....	0,2g
- Bacto-agar (Difco).....	30g
- Eau distillée.....	1000ml

Préparation

- Dissoudre dans 700 ml d'eau distillée toutes les quantités des ingrédients selon l'ordre de la liste à l'exception de l'agar ;
- Compléter le volume à 1000 ml avec l'ED;
- Mettre en agitation mécanique pendant 5 à10 min ;
- Mesurer le pH qui devrait être 4,76 ;
- Ajuster le pH à 6,30 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 20% ;
- Ajouter l'agar sous agitation et chauffage ;
- Distribuer le milieu à raison de 75 ml dans des fioles de 500 ml bouchées avec du coton cardé et de la gaze ;
- Stériliser à 121°C pendant 20 min ;
- Mesurer le pH après stérilisation qui devrait être compris entre $6 \pm 0,2$;
- Répartir le milieu à raison :
 - 25 ml dans des boîtes de pétri.
 - 50 ml dans des slants.



Répartition du milieu" CMP" V dans des slants et boîtes de pétri.

Milieu "VMP" V

Milieu liquide pour la germination des spores dans des fioles agitées.

Composition

- Dextrose anhydrous (Difco).....	30g
- Lactose monohydraté (Technical grade).....	10g
- Corn steep liquor (Roquette).....	30g
- Pharmamedia (Traders).....	10g
- Sulfate d'ammonium (Merck).....	02g
- Carbonate de calcium (Technical grade).....	05g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....	0,5g
- Huile de soja (Technical grade).....	05g
- Eau distillée.....	1000ml

Préparation

- Dissoudre les quantités des ingrédients selon l'ordre de la liste de la composition ;
- Agiter avec un agitateur mécanique ;
- Mesurer le pH qui doit être compris entre $5,15 \pm 0,15$;
- Distribuer le milieu à raison de 75 ml dans des fioles de 500 ml ;
- Boucher les fioles avec un tapis du coton cardé et de la gaze ;
- Stériliser à 121°C pendant 20 min ;
- pH après stérilisation doit être compris entre $5,80 \pm 0,2$.



Répartition du milieu "VMP" V dans des fioles de 500 ml.

Milieu "FMP" V

Milieu liquide pour la fermentation dans des fioles agitées.

Composition :

- Acide phénoxyacétique (Sigma).....	12g
- Lactose monohydraté (Technical grade).....	130g
- Pharmamedia (Traders).....	32,5g
- Sulfate d'ammonium (Merck).....	12g
- Carbonate de calcium (Technical grade).....	10g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....	05g
- Sulfate de potassium (Merck).....	05g
- Huile de soja (Technical grade).....	10g
- Eau distillée.....	1000ml

Préparation :

- Dissoudre l'acide phénoxyacétique dans 20 ml d'alcool éthylique pur ;
- Dans une autre fiole, préparer 700 ml d'ED avec 4 g d'hydroxyde de potassium (KOH), puis ajouter le POAA à cette fiole ;
- Ajouter les ingrédients et compléter le volume à 1000 ml avec l'ED ;
- Distribuer le milieu à raison de 35 ml par fiole de 500 ml ;
- Boucher les fioles avec du coton cardé et de la gaze ;
- Ajuster le pH à 6,6 avec la solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (KOH) à 20% ;
- Stériliser le milieu à 121°C pendant 20 min ;
- pH après stérilisation doit être compris entre $6,3 \pm 0,2$.



Répartition du milieu "FMP" V dans des fioles de 500 ml.

Annexe 5

Préparation de d'eau péptonée à 0,1% :

- Dissoudre 1 g de peptone dans une fiole jaugée de 1000 ml, puis compléter avec de l'ED jusqu'au trait de jauge.

Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 20% :

- Dissoudre 200 g de NaOH dans une fiole jaugée de 1000 ml, puis compléter avec de l'ED jusqu'au trait de jauge.

Préparation de la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 20% :

- Dissoudre 20 g de KOH dans une fiole jaugée de 100 ml, puis compléter avec de l'ED jusqu'au trait de jauge.

Préparation de la solution d'acide orthophosphorique (H₃PO₄) à 1% :

- Verser 1 ml de H₃PO₄ dans une fiole jaugée de 100 ml, puis compléter avec de l'ED jusqu'au trait de jauge.

Préparation de la solution NaOH à 1N :

- Dissoudre 40 g de NaOH dans une fiole jaugée de 1000 ml, puis compléter avec de l'ED jusqu'au trait de jauge.

Préparation de la solution NaOH à 1% :

- Dissoudre 1 g de NaOH dans une fiole jaugée de 100 ml, puis compléter avec de l'ED jusqu'au trait de jauge.

Annexe 6

Préparation des solutions pour le dosage de l'antibiotique par spectrophotométrie :

1) Chlorure d'hydroxylamine :

Dissoudre 350 g de chlorure d'hydroxylamine dans 600 ml d'ED à 60 °C puis refroidir à 25 °C, porter le volume à 1000 ml.

2) Réactif alcalin :

Dissoudre 173 g d'hydroxyde de sodium et 20,6 g d'acétate de sodium anhydre dans 700 ml d'ED, refroidir à 25°C puis porter le volume à 1000 ml dans un ballon gradué, stocker à 25°C .

3) Solution alcoolique :

Mélanger :

- Un volume de solution de chlorure d'hydroxylamine ;
- Un volume de réactif alcalin ;
- Huit volumes d'ED ;
- Deux volumes d'alcool éthylique 95% ;

Régler le pH du mélange entre 6,9 et 7,1 avec l'hydroxylamine ou le réactif alcalin si nécessaire.

Remarque : la solution alcoolique doit être préparée avant chaque essai.

4) Sulfate d'ammonium ferrique (alun de fer) :

- Ajouter soigneusement 47 ml d'acide sulfurique concentré à 350 ml d'ED puis dissoudre dans cette solution 100 g de sulfate d'ammonium ferrique $12 \text{ H}_2\text{O}$;
- Refroidir à 25°C et porter le volume à 1000 ml dans un ballon gradué ;
- Filtrer sur papier filtre et stocker loin des sources de la lumière.

5) Tampon phosphate (pH= 6) :

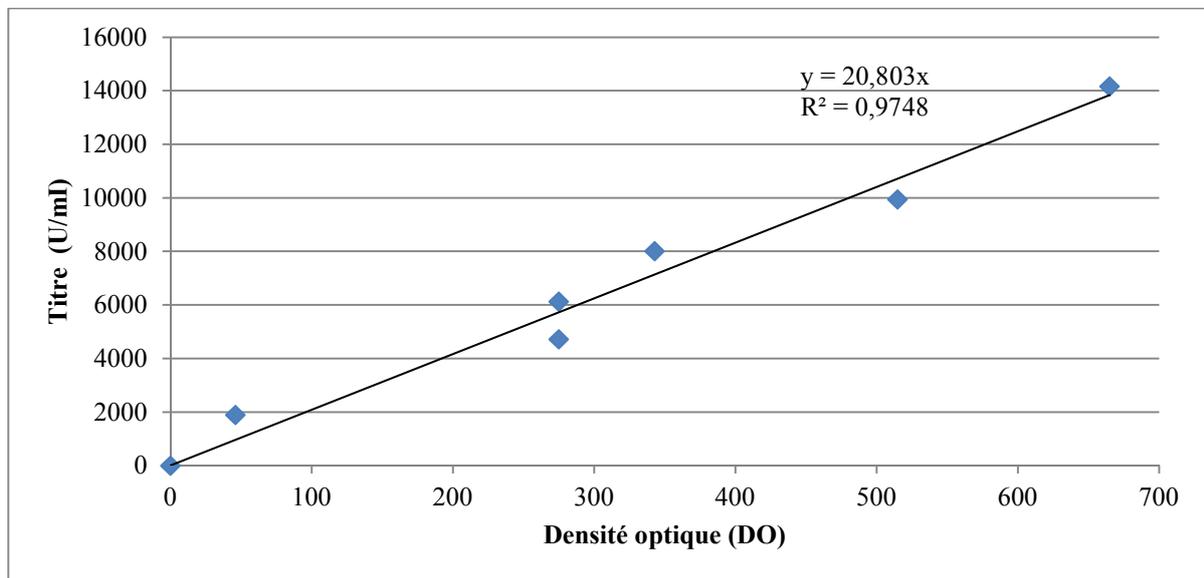
- Dissoudre dans 100 ml d'ED, 2 g de phosphate de potassium monoacide (K_2HPO_4) et 8 g de phosphate de potassium diacide (KH_2PO_4).
- Vérifier le pH qui doit être compris entre 5,95 et 6,05.

Annexe 7

Résultats de la préparation de la courbe d'étalonnage du standard de la Péni V

Tableau : résultats des Do de différentes concentrations du standard de la Péni V

[Standard] mg/ml	1,18	2,95	3,83	5,01	5,9	8,85
[Standard] UI/ml	1888	4720	6128	8016	9440	14160
Do Echantillon	0,046	0,226	0,275	0,343	0,515	0,665



Courbe d'étalonnage du standard de la pénicilline V.

Détermination du Km :

$$K_m = \text{Tg } \alpha = 20,80$$

Annexe 8

Préparation des solutions pour le dosage de l'antibiotique par HPLC:

✓ Solution Tampon I :

- Peser avec exactitude 6,8045 g de KH_2PO_4 dans une fiole jaugée de 1000 ml ;
- Dissoudre dans l'eau distillée, puis compléter le volume jusqu'au trait de jauge ;
- Ajuster le pH à 6 sous agitation magnétique avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1N.

✓ Solution Tampon II:

- Peser avec exactitude 6,8045 g de KH_2PO_4 dans une fiole jaugée de 1000 ml ;
- Dissoudre dans l'eau distillée, puis compléter le volume jusqu'au trait de jauge ;
- Ajouter 200 ml d'acétonitrile ;
- Ajuster le pH à 6 sous agitation magnétique avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1%.

✓ Solution aqueuse de phase mobile :

- Peser avec exactitude 6,8045g de KH_2PO_4 dans une fiole jaugée de 1000 ml ;
- Dissoudre dans l'eau distillée, puis compléter le volume jusqu'au trait de jauge ;
- Ajouter 330 ml d'acétonitrile ;
- Ajuster le pH à 4,5 sous agitation magnétique avec une solution d'acide orthophosphorique (H_3PO_4) à 1% ;
- Filtrer à travers une membrane filtrante de 0,45 μm ;
- Dégazer dans un bain ultrason.

Annexe 9

Récapitulation des résultats du suivi du pH et sédimentation des quatre tests de fermentations obtenus par spectrophotométrie

Tableau : pH et biomasse des quatre tests de fermentation

Souche	T (h)	pH				biomasse (%)			
		23°C	25°C	27°C	29°C	23°C	25°C	27°C	29°C
PV 05/01/13.	144	5,55	6,07	5,67	6,28	50	58	44	26
	168	5,66	7,38	5,61	6,17	52	63	47	31
	192	5,75	7,74	6,06	5,95	48	60	47	30
	216	6,12	7,86	7,4	5,87	43	48	38	28
PV05/02/13.	144	5,81	6,11	5,65	6,85	51	53	45	16
	168	6,03	6,73	5,65	6,78	53	58	48	18
	192	6,1	7,26	6,55	6,13	40	54	46	17
	216	6,42	7,54	7,34	5,92	38	44	37	12

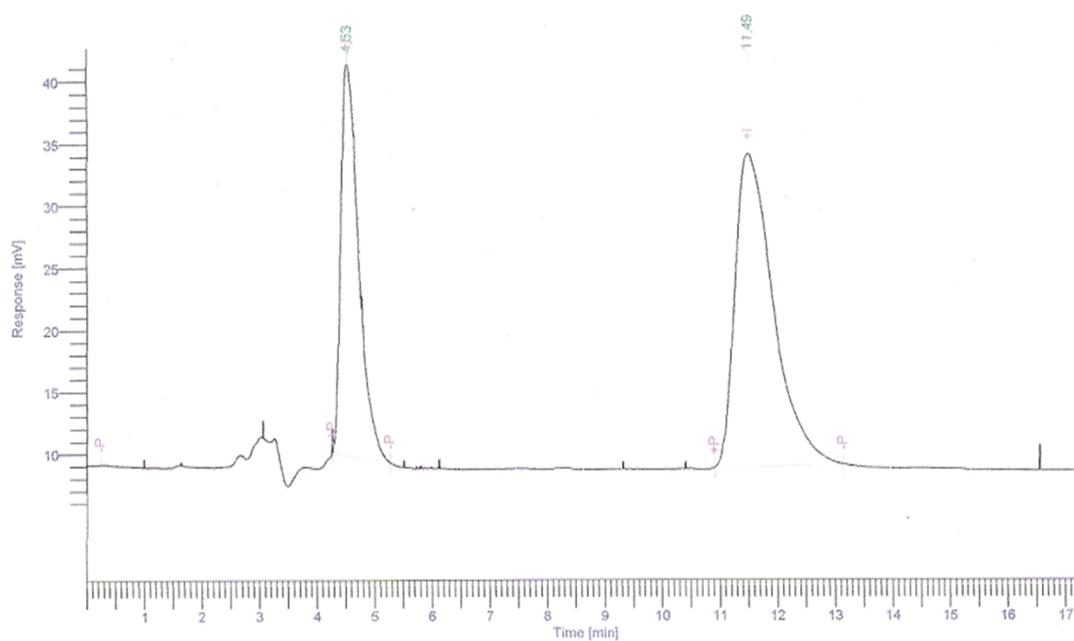
Résultats récapitulatifs du dosage du titre de la pénicilline V des quatre tests de fermentation par spectrophotométrie

Tableau : Titre de la Pénicilline V pour les quatre tests de fermentation

Souche	T (h)	Titre de la Pénicilline V (UI/ml)			
		23 °C	25°C	27°C	29°C
PV 05/01/13	144	14223	27190	19281	11232
	168	26020	33203	25480	19448
	192	19448	31150	20904	15645
	216	21294	26810	19406	15023
PV 05/02/13	144	25875	27144	18761	8008
	168	31220	32106	25313	14965
	192	28496	31098	23825	12044
	216	28912	28410	17087	11065

Annexe 10

Result File : E:\Controle et Inspection(2)\PENI V\11 04 13\MELANGE_STD_11 04
13001-20011212-020719.rst
Sequence File : E:\Controle et Inspection(2)\PENI V\4J.seq



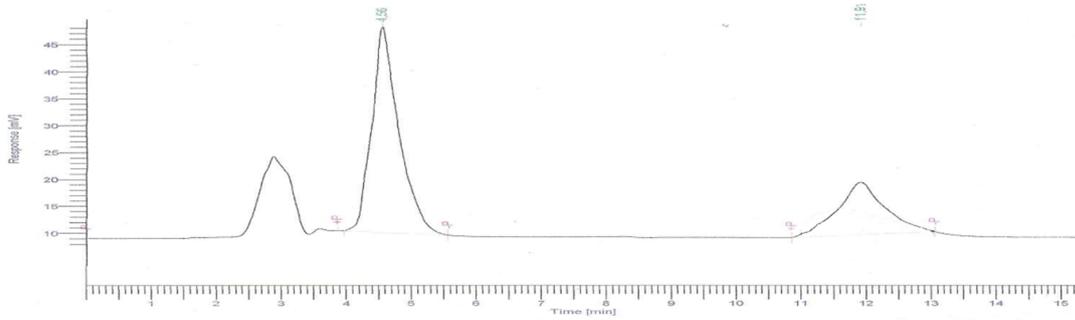
CHROMATOGRAMME

GRUPE INDUSTRIEL SAIDAL
FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]
1	4,530	670818,50	31437,81	36,72
2	11,487	1155781,67	25064,82	63,28
		1826600,17	56502,63	100,00

Annexe 11

Result File : E:\Contrôle et Inspection(2)\PENI VECH 27°C S1_6J_15 04 13016.rst
 Sequence File : D:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Examples\STAGIAIRE.seq



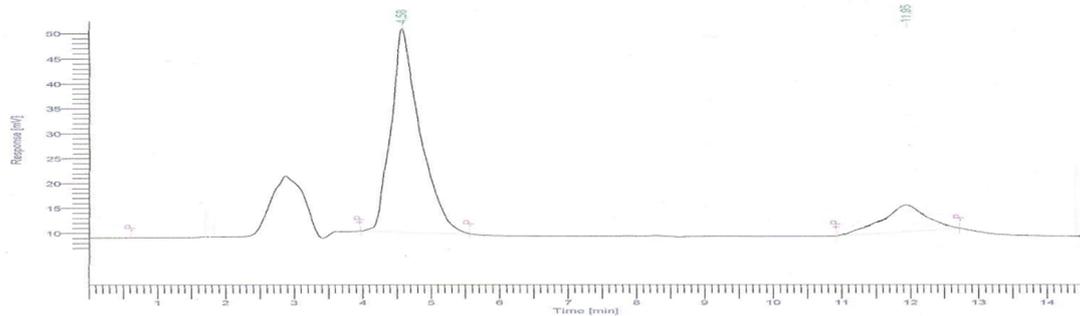
CHROMATOGRAMME

GRUPE INDUSTRIEL SAIDAL
 FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
 DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [µV·s]	Height [µV]	Area [%]
1	4,557	1101248,24	37994,61	67,86
2	11,913	521467,58	9635,69	32,14
		1622715,82	47630,31	100,00

Annexe 12

Result File : E:\Contrôle et Inspection(2)\PENI VECH 27°C S1_7J_16 04 13012.rst
 Sequence File : D:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Examples\STAGIAIRE.seq



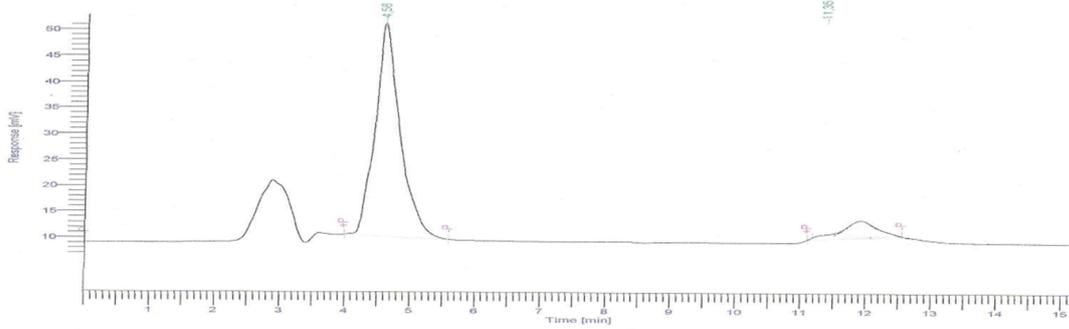
CHROMATOGRAMME

GRUPE INDUSTRIEL SAIDAL
 FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
 DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [µV·s]	Height [µV]	Area [%]
1	4,576	1193093,19	40647,87	82,57
2	11,948	251840,76	5251,56	17,43
		1444933,95	45899,43	100,00

Annexe 13

Result File : E:\Controle et Inspection(2)\PENI VIECH 27°C S1_8J_17 04 13008.rst
 Sequence File : D:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Examples\STAGIAIRE.seq



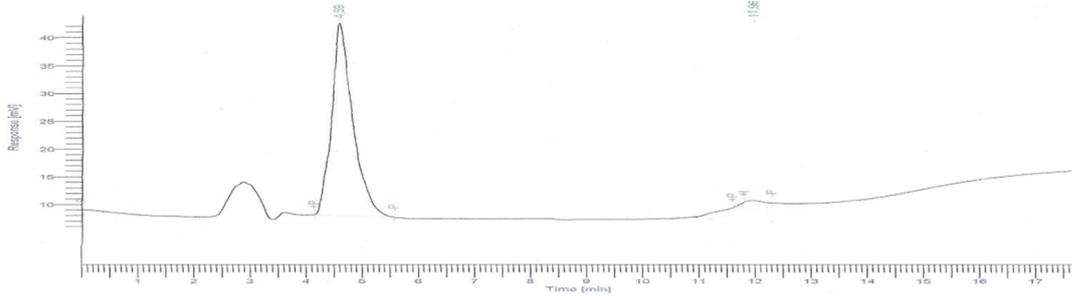
CHROMATOGRAMME

GRUPE INDUSTRIEL SAIDAL
 FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
 DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [µV·s]	Height [µV]	Area [%]
1	4,576	1090138,40	40889,81	89,53
2	11,349	127462,25	873,92	10,47
		1217600,65	41763,73	100,00

Annexe 14

Result File : E:\Controle et Inspection(2)\PENI VIECH 27°C S1_9J_18 04 13004.rst
 Sequence File : D:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Examples\STAGIAIRE.seq

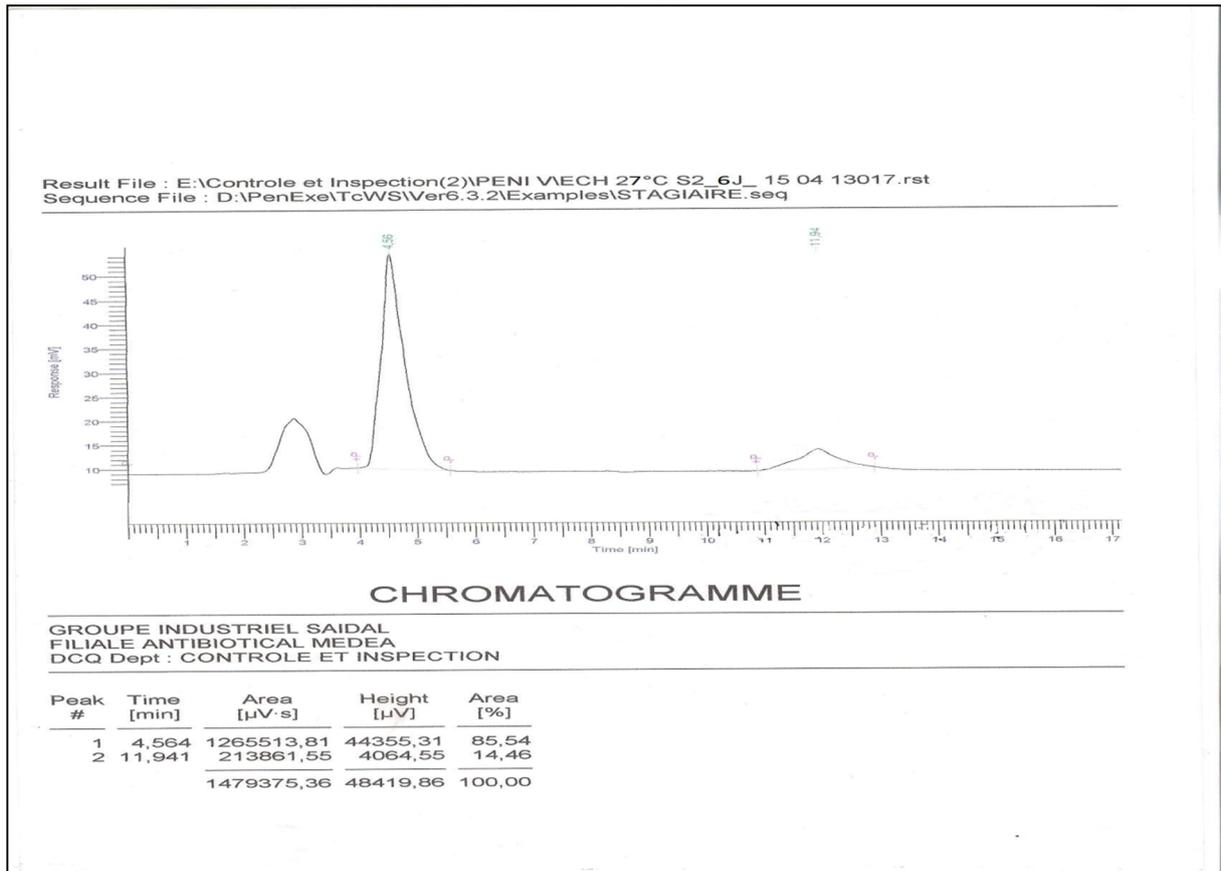


CHROMATOGRAMME

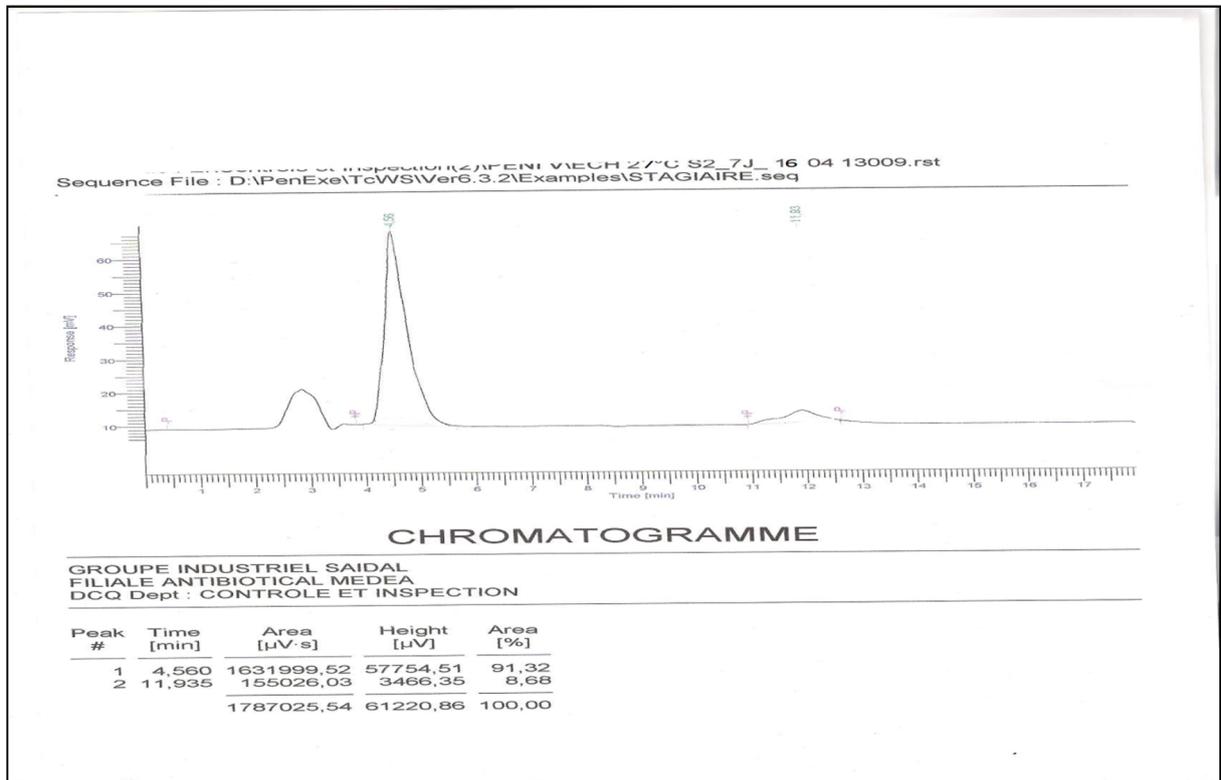
GRUPE INDUSTRIEL SAIDAL
 FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
 DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [µV·s]	Height [µV]	Area [%]
1	4,585	905138,97	34566,34	97,77
2	11,962	20606,66	859,68	2,23
		925745,63	35426,02	100,00

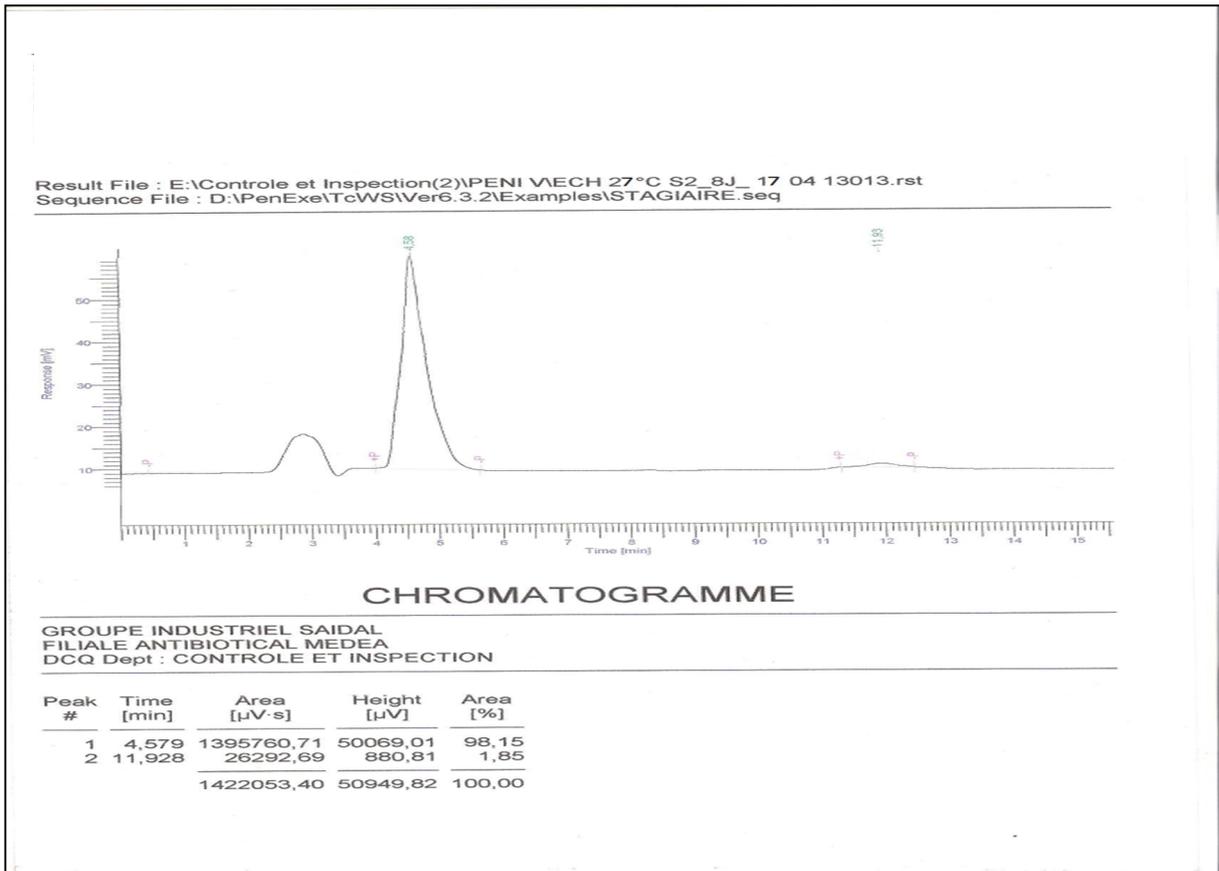
Annexe 15



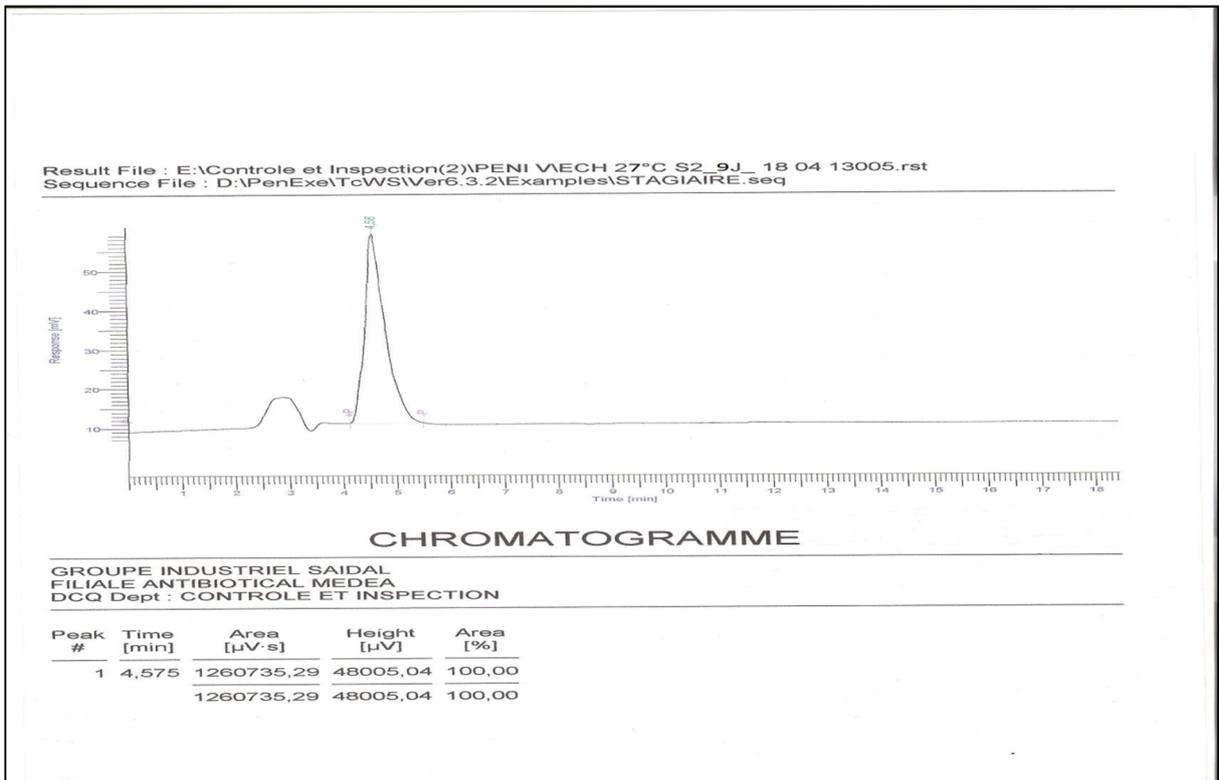
Annexe 16



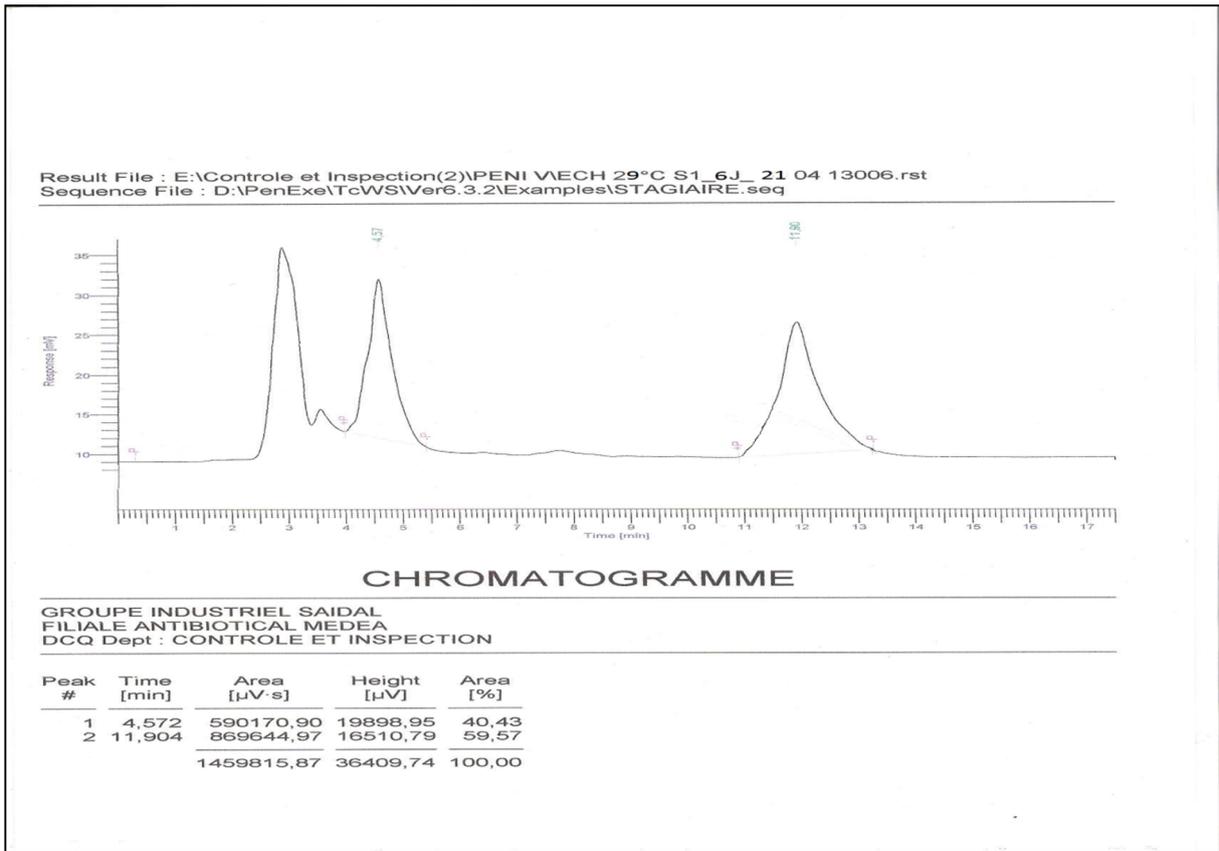
Annexe 17



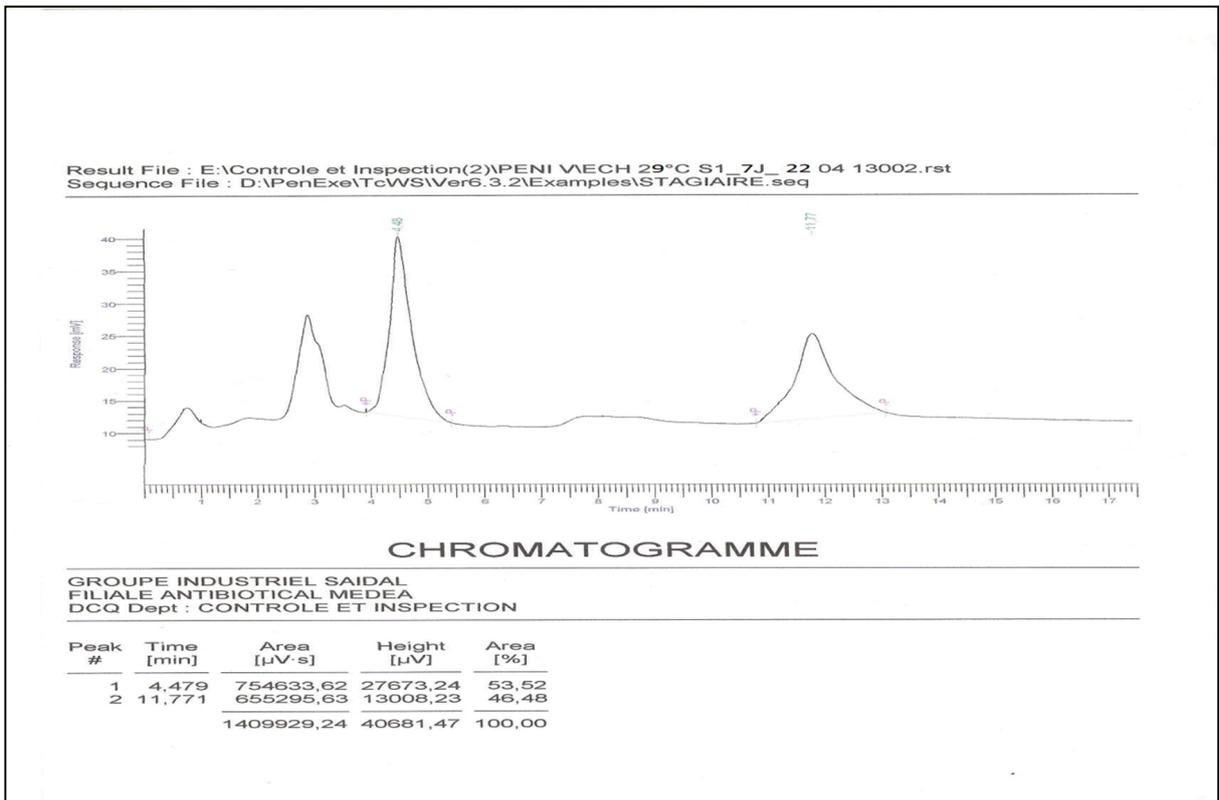
Annexe 18



Annexe 19

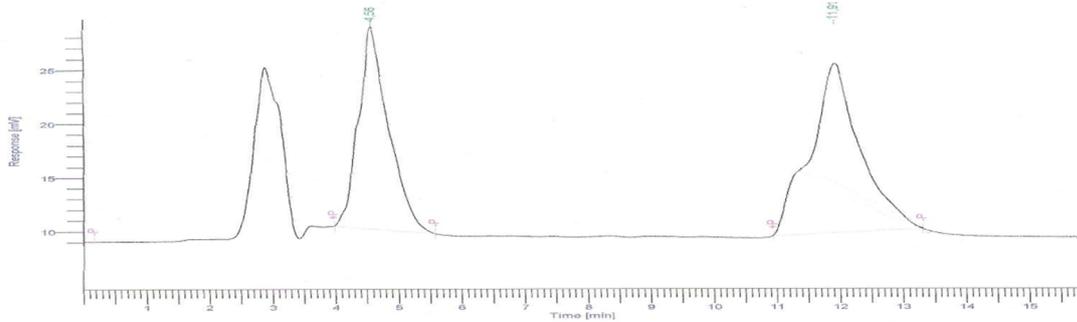


Annexe 20



Annexe 21

Result File : E:\Controle et Inspection(2)\PENI VIECH 29°C S1_8J_23 04 13010.rst
 Sequence File : D:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Examples\STAGIAIRE.seq



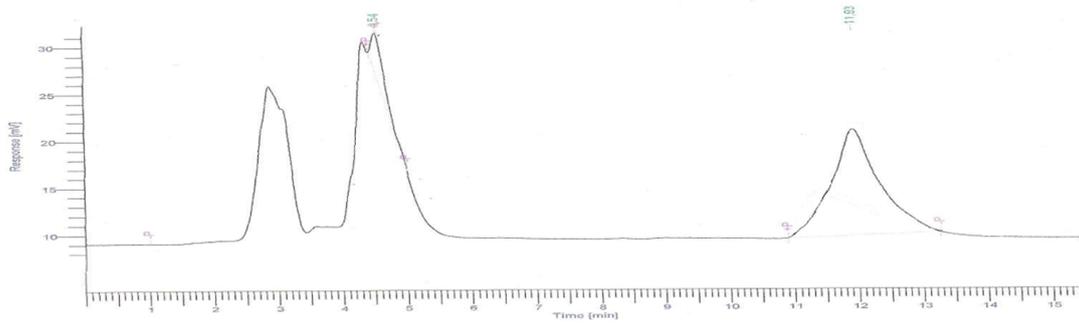
CHROMATOGRAMME

GRUPE INDUSTRIEL SAIDAL
 FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
 DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [µV·s]	Height [µV]	Area [%]
1	4,564	618806,26	18692,65	41,93
2	11,910	857028,75	15601,44	58,07
		1475835,01	34294,09	100,00

Annexe 22

Result File : E:\Controle et Inspection(2)\PENI VIECH 29°C S1_9J_24 04 13014.rst
 Sequence File : D:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Examples\STAGIAIRE.seq

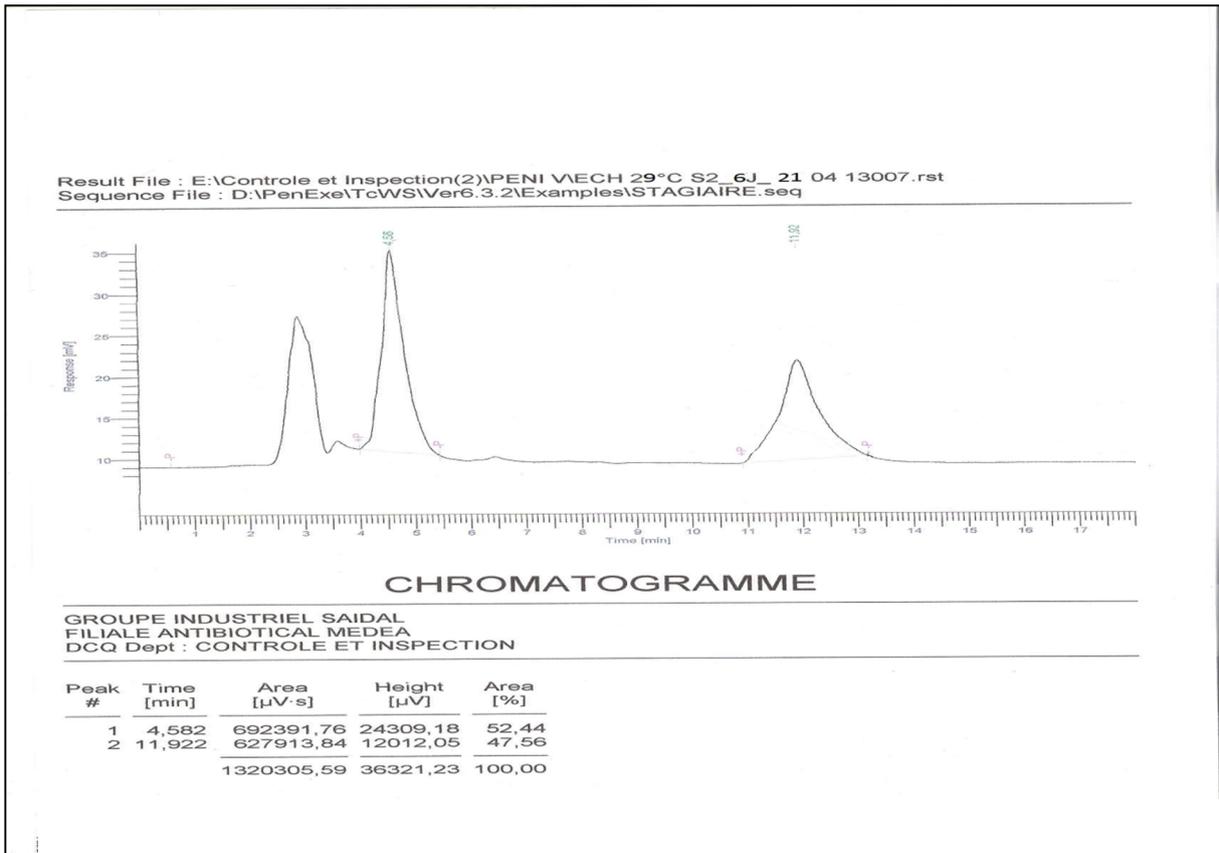


CHROMATOGRAMME

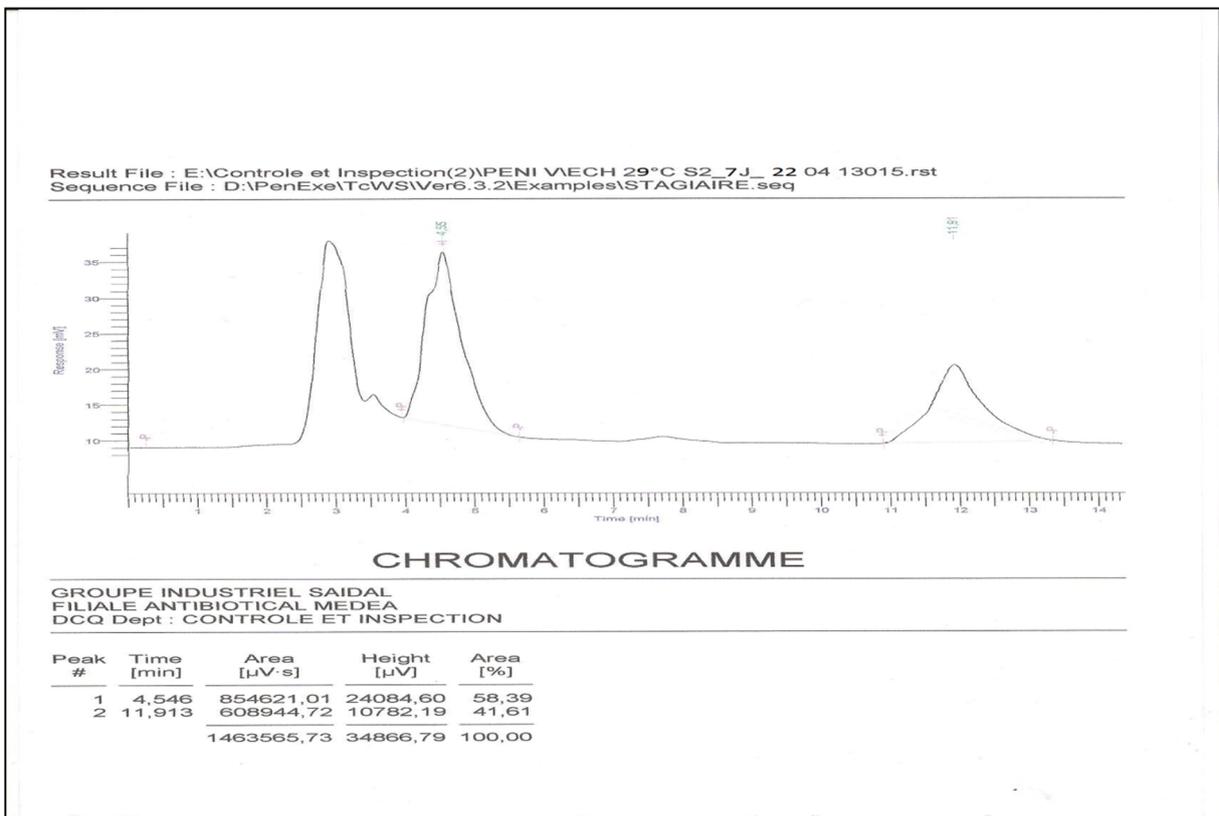
GRUPE INDUSTRIEL SAIDAL
 FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
 DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [µV·s]	Height [µV]	Area [%]
1	4,540	61238,97	4465,64	8,91
2	11,925	626166,59	11196,05	91,09
		687405,55	15661,69	100,00

Annexe 23

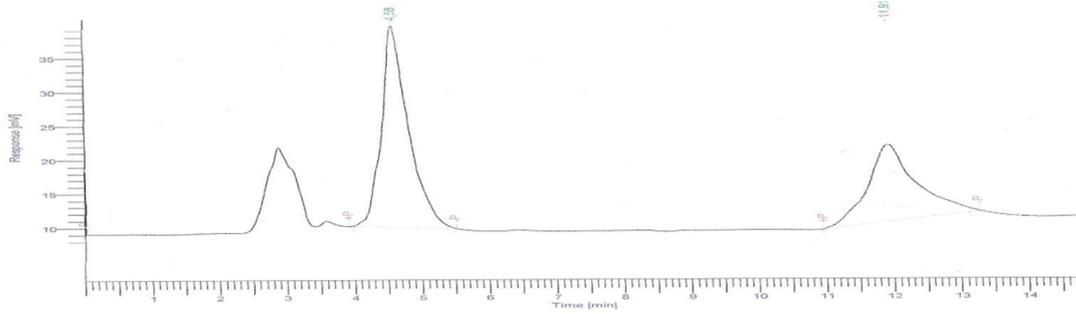


Annexe 24



Annexe 25

Result File : E:\Contrôle et Inspection(2)\PENI VIECH 29°C S2_8J_ 23 04 13003.rst
Sequence File : D:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Examples\STAGIAIRE.seq



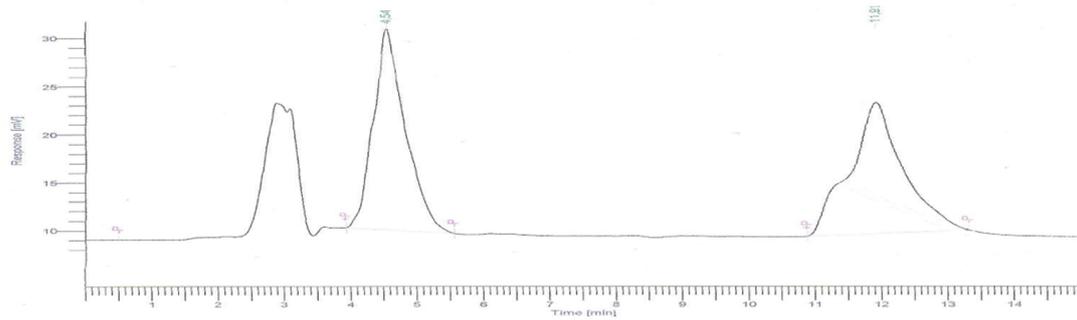
CHROMATOGRAMME

GRUPE INDUSTRIEL SAIDAL
FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [µV·s]	Height [µV]	Area [%]
1	4,580	814506,00	29477,83	58,56
2	11,909	576355,92	11214,89	41,44
		1390861,92	40692,73	100,00

Annexe 26

Result File : E:\Contrôle et Inspection(2)\PENI VIECH 29°C S2_9J_ 24 04 13011.rst
Sequence File : D:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Examples\STAGIAIRE.seq



CHROMATOGRAMME

GRUPE INDUSTRIEL SAIDAL
FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [µV·s]	Height [µV]	Area [%]
1	4,541	696041,73	20828,44	47,91
2	11,907	756815,68	13539,42	52,09
		1452857,41	34367,87	100,00

Annexe 27

Tableau : Titre de la Pénicilline V pour le test fermentatif à 27°C par HPLC

Souche	Aire Std	T (h)	Aire pic Ech ($\mu\text{V.s}$)		Titre (UI/ml)	[POAA] (g/l)
			PéniV	POAA		
PV05/01/13	Péni V= 670818,50 POAA= 1155781,67	144	1101248,24	521467,58	38652	1,35
		168	1193093,19	251840,76	41876	0,65
		192	1090138,40	127462,25	38262	0,33
		244	905138,97	20606,66	31769	0,053
PV05/02/13	Péni V= 670818,50 POAA= 1155781,67	144	1265513,81	213861,55	44418	0,55
		168	1631999,52	155026,03	57281	0,4
		192	1395760,71	26292,69	48989	0,068
		244	1260735,29	/	44250	/

Tableau : Titre de la Pénicilline V pour le test fermentatif à 29°C par HPLC

Souche	Aire Std	T (h)	Aire pic Ech ($\mu\text{V.s}$)		Titre (UI/ml)	[POAA] (g/l)
			PéniV	POAA		
PV05/01/13	Péni V= 670818,50 POAA= 1155781,67	144	590170,90	869644,97	20 735	2,25
		168	754633,62	655295,63	26486	1,7
		192	618806,26	857028,75	21 719	2,22
		244	61238,97	626166,59	2149	1,62
PV05/02/13	Péni V= 670818,50 POAA= 1155781,67	144	692391,76	627913,84	24 302	1,62
		168	854621,21	608944,72	29996	1,58
		192	814506,00	576355,92	28588	1,49
		244	696041,73	756815,68	24430	1,96

Résumé

La présente étude effectuée au niveau du complexe ANTIBIOTICAL SAIDAL de Médéa a permis d'optimiser la production de la pénicilline V à partir de la souche productrice *Penicillium chrysogenum* maintenue toujours en activité. La production réalisée en culture batch dans des fioles agitées a été étudiée sous différentes températures du milieu fermentatif à savoir 23°C, 25°C, 27°C, et 29°C.

La mesure de l'activité de la pénicilline V dans les milieux fermentatifs est suivie par la méthode colorimétrique et par la chromatographie liquide à haute performance. Les résultats nous ont permis de constater que l'intervalle de température compris entre 23°C et 27°C pourrait être convenable avec un optimum de 25°C pour la production de la pénicilline V des deux souches du *P.chrysogenum* exploitées.

Mots clés : Pénicilline V ; *Penicillium chrysogenum* ; Fermentation ; Température ;

Abstract

This study was carried out in SAIDAL ANTIBIOTICAL in Médéa to optimize the production of penicillin V produced by *Penicillium chrysogenum* strains. The production was done in batch culture in flasks with agitation. The effect of different temperatures on the production of penicilline ranging from 23°C to 29°C was studied.

The measurement of the activity of penicillin V in the fermentative mediums is followed by the colorimetric method and the high performance liquid chromatography. The results show that the maximal production of penicillin V was obtained at 25°C. The production was also satisfactory in temperature rang 23-27°C.

Key words: Penicillin V; *Penicillium chrysogenum*; Fermentation; Temperature; .