



HAL
open science

Effets de l'hydrodynamique et du transfert d'oxygène sur la physiologie de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de cultures en flacons agités

Nasir Mehmood

► **To cite this version:**

Nasir Mehmood. Effets de l'hydrodynamique et du transfert d'oxygène sur la physiologie de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de cultures en flacons agités. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL016N . tel-01748879

HAL Id: tel-01748879

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748879>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE (INPL)
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)
Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Par

Nasir MEHMOOD

Sujet

**Effets de l'hydrodynamique et du transfert d'oxygène sur
la physiologie de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de
cultures en flacons agités**

Soutenue publiquement le 25 mars 2011

Membres du jury

Rapporteurs :	Caroline GENTRIC	(Professeur, Université de Nantes)
	Rémy CACHON	(Professeur, Agrosup Dijon)
Examineurs :	Jérôme MORCHAIN	(Maître de conférences, INSA, Toulouse)
	Michel FICK	(Professeur, INPL, Nancy)
	Eric OLMOS	(Maître de conférences, INPL, Nancy)
	Stéphane DELAUNAY	(Maître de conférences, INPL, Nancy)
Invité :	Jean-Paul SERVANS	(Sanofi-Pasteur, Marcy-L'Etoile)



REMERCIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés LRGP de l'INPL de Nancy. Je remercie Gabriel WILD, Directeur de ce laboratoire, de m'y avoir accueilli.

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser une pensée toute particulière au Pr Jean-Louis Goergen qui nous a quitté récemment et à qui je dédie ce mémoire, il m'a accueilli au sein de son équipe et a toujours fait preuve de disponibilité, de générosité, de patience et d'écoute.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le Professeur Rémy CACHON à Agrosup Dijon et le Professeur Caroline GENTRIC de l'université de Nantes pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

J'exprime ma gratitude à Mr Jérôme MORCHAIN de l'INSA de Toulouse et Mr Jean-Paul SERVANS de Sanofi-Pasteur d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie le Pr . Michel FICK d'avoir accepté d'être mon Directeur de thèse en prenant le relais suite à la triste disparition du Pr Jean-Louis GOERGEN me permettant ainsi de conclure cette thèse.

Mes remerciements les plus sincères à Eric OLMOS, qui s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Stéphane DELAUNAY pour avoir suivi et co-dirigé cette thèse, pour tout le temps qu'il m'a consacré ainsi que pour ses pertinentes analyses et critiques qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire

De plus, je tiens à remercier le Pr J. BUCHS de m'avoir si gentiment accueilli au sein de son laboratoire situé à Aachen (Allemagne), d'avoir été très à l'écoute et pour ses bons conseils pour mes travaux de thèse.

Je remercie également Fabrice BLANCHARD pour sa disponibilité et son aide apportée tout au long de mon parcours. Je n'oublie pas Philippe MARCHAL que je remercie vivement pour son aide.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à toute l'équipe du BioPromo (LRGP), ma famille et mes amis, en particulier mon épouse qui m'a toujours soutenu et encouragé tout au long de ces années.



TABLE DES MATIERES

NOMENCLATURE	I-9
INTRODUCTION GENERALE	I-15
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	I-23
I.1. INTRODUCTION.....	I-26
I.2. <i>STREPTOMYCES</i> MORPHOLOGY.....	I-28
I.2.1. <i>Types of morphology</i>	I-28
I.2.2. <i>Relationships between morphology and production of antibiotics</i>	I-30
I.2.3. <i>Relationships between morphology and broth rheology</i>	I-30
I.2.4. <i>Cell viability inside pellets</i>	I-31
I.3. CULTURAL CONDITIONS.....	I-32
I.3.1. <i>Inoculum</i>	I-32
I.3.1. <i>Temperature</i>	I-34
I.3.2. <i>pH</i>	I-36
I.4. NUTRITIONAL PARAMETERS.....	I-38
I.4.1. <i>Regulation of antibiotic production by carbon source</i>	I-38
I.4.2. <i>Regulation of antibiotic production by nitrogen sources</i>	I-42
I.4.3. <i>Regulation of antibiotic production by phosphate</i>	I-52
I.4.4. <i>Effects of ions on growth, antibiotics production and morphology in Streptomyces</i>	I-55
I.4.5. <i>Overview of molecular mechanisms responsible for the regulation of antibiotic production in Streptomyces</i>	I-58
I.5. BIOREACTOR HYDRODYNAMICS AND ITS EFFECTS ON THE PHYSIOLOGY OF <i>STREPTOMYCES</i> CULTURES.....	I-60
I.5.1. <i>Hydrodynamics description</i>	I-60
I.5.2. <i>Mixing effects</i>	I-66
I.5.3. <i>Oxygen transfer</i>	I-69
I.6. CONCLUSION.....	I-72
I.7. REFERENCES.....	I-73
I.8. LES PRISTINAMYCINES.....	I-90
I.8.1. <i>Micro-organisme producteur</i>	I-90
I.8.2. <i>Classification</i>	I-90
I.8.3. <i>Description des pristinamycines</i>	I-91
II. MATERIELS, METHODES ET OUTILS NUMERIQUES	II-95

II.1.	MICRO-ORGANISMES ET MILIEUX DE CULTURE UTILISES.....	II-97
II.1.1.	<i>Micro-organismes</i>	II-97
II.1.2.	<i>Milieux de culture</i>	II-97
II.2.	MISE EN ŒUVRE DES CULTURES	II-100
II.2.1.	<i>Systèmes de culture</i>	II-100
II.2.2.	<i>Conditions opératoires</i>	II-101
II.3.	MESURE DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE ET DES METABOLITES EXTRACELLULAIRES	II-102
II.3.1.	<i>Mesure de la concentration en biomasse</i>	II-102
II.3.2.	<i>Détection des pristinamycines par test microbiologique</i>	II-103
II.3.3.	<i>Extraction et dosage des pristinamycines</i>	II-103
II.3.4.	<i>Dosage de l'acide malonique</i>	II-104
II.3.5.	<i>Dosage du glucose</i>	II-105
II.3.6.	<i>Dosage des ions ammonium</i>	II-105
II.3.7.	<i>Dosage du phosphate</i>	II-105
II.3.8.	<i>Dosage du glutamate et de l'arginine</i>	II-106
II.4.	MESURE DU DIAMETRE DES PELOTES	II-108
II.5.	CARACTERISATION DU TRANSFERT D'OXYGENE	II-110
II.5.1.	<i>Estimation semi-empirique du coefficient volumique de transfert d'oxygène</i>	II-110
II.5.2.	<i>Vitesse de transfert d'oxygène</i>	II-110
II.6.	CALCULS DES VITESSES SPECIFIQUES EXPERIMENTALES DE CROISSANCE, CONSOMMATION ET PRODUCTION	II-114
II.7.	RHEOLOGIE DES SUSPENSIONS BACTERIENNES	II-115
II.7.1.	<i>Dispositif expérimental</i>	II-115
II.7.2.	<i>Éléments généraux de rhéologie</i>	II-116
II.8.	QUANTIFICATION DE LA PUISSANCE DISSIPÉE VOLUMIQUE.....	II-117
II.8.1.	<i>Modélisation semi-empirique</i>	II-118
II.8.2.	<i>Mesure expérimentale de la dissipation volumique</i>	II-120
II.8.3.	<i>Simulation numérique des écoulements (CFD)</i>	II-121
III.	INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE SUR LA REPONSE PHYSIOLOGIQUE ET LA MORPHOLOGIE DE	
S.	PRISTINAESPIRALIS PR11 CULTIVEE EN FIOLES AGITEES	III-127
III.1.	INTRODUCTION	III-129
III.2.	OXYGEN SUPPLY CONTROLS THE ONSET OF PRISTINAMYCINS PRODUCTION BY <i>S. PRISTINAESPIRALIS</i> IN SHAKING FLASKS....	III-130
III.2.1.	<i>Abstract</i>	III-130
III.2.2.	<i>Introduction</i>	III-131
III.2.3.	<i>Material and methods</i>	III-134
III.2.4.	<i>Results</i>	III-138
III.2.5.	<i>Discussion</i>	III-147

III.2.6.	<i>Conclusion</i>	III-150
III.2.7.	<i>References</i>	III-150
III.3.	INFLUENCE DE LA PUISSANCE DISSIPÉE VOLUMIQUE SUR LA MORPHOLOGIE DE <i>S. PRISTINAESPIRALIS</i> PR11.....	III-154
III.4.	CONCLUSION.....	III-156
IV.	INFLUENCE DE LA PUISSANCE DISSIPÉE VOLUMIQUE (P/V) ET DU COEFFICIENT VOLUMIQUE DE TRANSFERT D'OXYGÈNE (K_LA) SUR LA PRODUCTION DES PRISTINAMYCINES	IV-159
IV.1.	RELATION BETWEEN PRISTINAMYCINS PRODUCTION BY <i>S. PRISTINAESPIRALIS</i> , POWER DISSIPATION AND VOLUMETRIC GAS-LIQUID MASS TRANSFER COEFFICIENT, K_LA	IV-162
IV.2.	RELATION ENTRE DISSIPATION VOLUMIQUE ET CONCENTRATION DE BIOMASSE.....	IV-170
IV.3.	RELATION ENTRE DISSIPATION VOLUMIQUE ET CONCENTRATION EN PRISTINAMYCINES I ET II	IV-171
IV.4.	RELATION ENTRE LE K_LA ET LA CONCENTRATION MAXIMALE DES PRISTINAMYCINES.....	IV-172
IV.5.	INFLUENCE DE LA DISSIPATION ET DU TRANSFERT D'OXYGÈNE SUR LES VITESSES SPÉCIFIQUES DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DES PRISTINAMYCINES	IV-173
IV.6.	INFLUENCE DE LA DISSIPATION ET DU TRANSFERT D'OXYGÈNE SUR LES VITESSES SPÉCIFIQUES DE CONSOMMATION DES SUBSTRATS	IV-174
IV.7.	CONCLUSION.....	IV-176
V.	LES EFFETS DE LA TURBULENCE ET DE L'OXYGÉNATION PEUVENT-ILS ÊTRE EXTRAPOLÉS À UNE AUTRE SOUCHE DE <i>S. PRISTINAESPIRALIS</i>?	V-179
V.1.	INTRODUCTION.....	V-181
V.2.	COMPORTEMENT RHEOLOGIQUE DE SUSPENSIONS DE <i>S. PRISTINAESPIRALIS</i> PR11 ET DSMZ 40338	V-181
V.2.1.	<i>Mesures rhéologiques</i>	V-181
V.2.2.	<i>Vérification de l'hypothèse de viscosité faible</i>	V-183
V.3.	REPONSE PHYSIOLOGIQUE GLOBALE : COMPARAISON DE <i>S. PRISTINAESPIRALIS</i> PR11 ET DE <i>S. PRISTINAESPIRALIS</i> DSMZ 40338	V-184
V.3.1.	<i>Biomasse, consommation des substrats et production de pristinamycines</i>	V-184
V.3.2.	<i>Relation entre le k_La et la concentration de biomasse</i>	V-188
V.3.3.	<i>Vitesses spécifiques maximales</i>	V-189
V.3.4.	<i>Production des pristinamycines</i>	V-191
V.4.	COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ RESPIRATOIRE DE <i>S. PRISTINAESPIRALIS</i> PR11 ET DSMZ 40338	V-195
V.4.1.	<i>Comparaison des OUR</i>	V-195
V.4.2.	<i>Vitesses spécifiques de consommation d'oxygène</i>	V-196
V.4.3.	<i>Profils d'oxygène dissous</i>	V-197
V.5.	CONCLUSION.....	V-198
VI.	DECOUPLAGE DES EFFETS DE L'AGITATION ET DE L'AÉRATION SUR LA PRODUCTION DES PRISTINAMYCINES PAR <i>S. PRISTINAESPIRALIS</i> EN FIOLES AGITÉES	VI-201
VI.1.	INTRODUCTION.....	VI-203

VI.2.	DECOUPLING OF OXYGEN TRANSFER AND POWER DISSIPATION FOR THE STUDY OF THE PRODUCTION OF PRISTINAMYCINS BY <i>STREPTOMYCES PRISTINAESPIRALIS</i> IN SHAKING FLASKS	VI-204
VI.2.1.	<i>Abstract</i>	VI-204
VI.2.2.	<i>Introduction</i>	VI-205
VI.2.3.	<i>Materials and methods</i>	VI-207
VI.2.4.	<i>Results</i>	VI-214
VI.2.5.	<i>Discussion</i>	VI-222
VI.2.6.	<i>Conclusion</i>	VI-225
VI.2.7.	<i>References</i>	VI-225
VI.3.	INFLUENCE DE LA DISSIPATION VOLUMIQUE SUR LES CINETIQUES DE CROISSANCE DE PELOTES ET LEUR DIAMETRE .	VI-229
VI.3.1.	<i>Agitation et croissance des pelotes.</i>	VI-229
VI.3.2.	<i>Impact de la turbulence sur les diamètres de pelotes et les contraintes particulières</i>	VI-232
VI.4.	IMPACT DES DIAMETRES DE PELOTES SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE ET LA PRODUCTION	VI-239
VI.4.1.	<i>Relation entre le diamètre des pelotes et la consommation d'oxygène</i>	VI-240
VI.4.2.	<i>Relation entre le diamètre des pelotes et la production de pristinamycines</i>	VI-241
VI.4.3.	<i>Impact des contraintes hydrodynamiques sur la production</i>	VI-242
VI.5.	CONCLUSION.....	VI-243
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	245
	REFERENCES	255

NOMENCLATURE

VARIABLES

A	Aire de la surface libre ou surface de la pelote	m^2
a	Aire interfaciale spécifique (bulle)	m^{-1}
a_p	Aire interfaciale de la pelote	m^{-1}
C	Couple	N.m
C_1	Constante	
C_2	Constante = 0,7	
C_b	Concentration dans la phase liquide (bulk)	$kg.m^{-3}$
C_i	Concentration dans la phase liquide (interface)	$kg.m^{-3}$
d	Diamètre (corde horizontale maximale) du flacon	m
d_0	Diamètre de la table d'agitation	m
D_{iff}	Diffusivité moléculaire	$m^2.s^{-1}$
DO	Oxygène dissous	%air sat
d_p	Diamètre de particule ou de pelote	m
E	Potentiel de l'électrode	mV
E_0	Potentiel de référence	mV
F_c	Force de cohésion de la particule	N
F_H	Force hydrodynamique	N
F_{ST}	Force volumique de tension de surface	$N.m^{-3}$
g	Gravité	$m.s^{-2}$
J	Flux massique total	$kg.s^{-1}$
k	Coefficient de transfert de matière à l'interface liquide-solide	$m.s^{-1}$
K	Indice de consistance	$Pa.s^n$
k_L	Coefficient de transfert de matière coté liquide	$m.s^{-1}$
$k_{i,a}$	Coefficient volumique de transfert gaz-liquide	s^{-1}, h^{-1}
L	Longueur	m
l_B	Echelle de Batchelor	m
l_K	Echelle de Kolmogorov	m

N	Fréquence d'agitation	s^{-1} , rpm
n	Indice d'écoulement	
OTR	Taux de transfert d'oxygène	$mol.L^{-1}.h^{-1}$
OTR_{max}	Vitesse maximale de transfert de l'oxygène	$mol.L^{-1}.h^{-1}$
OUR	Consommation globale d'oxygène	$mol.L^{-1}.h^{-1}$
$[O_2]$	Concentration en oxygène dissous	$g.L^{-1}$
$[O_2]^*$	Concentration de saturation en oxygène dissous	$mol.L^{-1},\%$ $g.L^{-1}$ $mol.L^{-1},\%$
p	Pression du fluide	Pa
p_{O_2}	Pression partielle en oxygène	Pa
P/V	Dissipation de puissance par unité de volume	$W.m^{-3}$
P	Puissance mécanique	W
q	Rendement massique de production	$mg.g^{-1}$
$q_{arginine}$	Vitesse spécifique de consommation de l'arginine	$g.h^{-1}.g^{-1}$
$q_{glucose}$	Vitesse spécifique de consommation du glucose	$g.h^{-1}.g^{-1}$
$q_{glutamate}$	Vitesse spécifique de consommation du glutamate	$g.h^{-1}.g^{-1}$
q_{O_2}	Vitesse spécifique de consommation de l'oxygène	$mol.s^{-1}.g^{-1}$
q_p	Vitesse spécifique de production	$mg.h^{-1}.g^{-1}$
q_s	Vitesse spécifique de consommation du substrat	$g.h^{-1}.g^{-1}$
R	Constante des gaz parfaits	$J.moles^{-1}.K^{-1}$
R_p	Taux de croissance des pelotes	$\mu.m.h^{-1}$
R_{pmax}	Taux de croissance maximal des pelotes	$\mu.m.h^{-1}$
S	Concentration en substrat	$g.L^{-1}$
S_p	Surface de pelote	m^2
t	Temps	s, h
u	Vitesse du liquide	$m.s^{-1}$
$\overline{u^2}(d_p)$	Moyenne quadratique des fluctuations de vitesses à l'échelle de la particule	$m.s^{-1}$
U_g	Vitesse superficielle du gaz	$m.s^{-1}$
u_{LS}	Vitesse relative liquide-solide	$m.s^{-1}$
V, V_L	Volume de remplissage	mL
V_0	Volume total de la fiole	mL

V_p	Volume de pelote	m^3
X	Concentration en biomasse	$g.L^{-1}$
$Y_{P/X}, Y_{Prist./X}$	Rendement en produit par rapport à la biomasse	$mg.h^{-1}.g^{-1}$

VARIABLES GRECQUES

α_g	Fraction volumique de gaz	
α	Fraction volumique de liquide	
ε	Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	$m^2.s^{-3}, W.kg^{-1}$
$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement	s^{-1}
κ	Courbure locale	m^{-1}
$\mu_{l,g}$	Viscosité dynamique de la phase liquide et gaz	Pa.s
μ_∞	Viscosité à cisaillement infini	Pa.s
μ	Viscosité dynamique du liquide	Pa.s
μ	Vitesse spécifique de croissance	h^{-1}
ν	Viscosité cinématique	$m^2.s^{-1}$
ρ_g	Masse volumique du gaz	$kg.m^{-3}$
ρ_P	Masse volumique de la pelote	$kg.m^{-3}$
π	vitesse spécifique de production du produit	$mg.h^{-1}.g^{-1}$
ρ, ρ_l	Masse volumique du liquide	$kg.m^{-3}$
σ	Tension de surface	$N.m^{-1}$
τ_c	Contrainte hydrodynamique critique	Pa
τ	Contrainte hydrodynamique	Pa
U_{O_2}	Vitesse spécifique de consommation de l'oxygène	$mol.s^{-1}.g^{-1}$

NOMBRES ADIMENSIONNELS

<i>BREAK</i>	Nombre de rupture	$BREAK = \frac{F_H}{F_C}$
<i>Ne'</i>	Nombre de Newton modifié	$Ne' = \frac{P}{\rho N^3 d^4 V^{1/3}}$
<i>Np</i>	Nombre de puissance	$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$
<i>Re</i>	Nombre de Reynolds	$Re = \frac{\rho N d^2}{\mu}$
<i>Sc</i>	Nombre de Schmidt	$Sc = \frac{\mu}{\rho D_{iff}}$
<i>Sh</i>	Nombre de Sherwood	$Sh = \frac{k \cdot d_p}{D_{iff}}$

ABBREVIATIONS

ADH	Alanine déshydrogénase
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
AMP	Adénosine mono-phosphate
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
AS	Activité spécifique
AT	Alanine transaminase
ATCC	American type culture collection
ATP	Adénosine 5' tri-phosphate
CFD	Computational Fluid Dynamics (Simulation numérique des écoulements)
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
DO	Densité Optique
DOC	Dissolved Oxygen Concentration

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Collection Allemande de microorganismes et de culture cellulaire)
GDH	Glutamate déshydrogénase
GOGAT	Glutamate synthétase
GS	Glutamine synthétase
MLS	Macrolides, lincosamines et synergistines
MM	Masse molaire
MOPS	Acide morpholinopropanesulfonique
MS	Poids sec
NAD ⁺	Nicotine adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	Nicotine adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP ⁺	Nicotine adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADPH	Nicotine adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
OPA	Ortho-phthaldialdéhyde
PI	Pristinamycines de classe I
PII	Pristinamycines de classe II
Ref	Critical transition Reynolds number
RMS	Root mean square
rpm	Rotation par minute
RSM	Reynolds Stress Model
TSA-YE	Gélose trypcase soja - extrait de levure
TSB-YE	Bouillon trypcase soja - extrait de levure
UV	Ultra violet
v/v	Volume par volume
VOF	Volume Of Fluid
VVM	Volume par volume et par minute

w/v

Masse par volume

Unités

g

gramme

h

heure

kb

kilobase

L

litre

M

molaire

min

minute

mM

millimolaire

nm

nanomètres

s

seconde

UE

unité enzymatique

W

Watt

°C

degré Celsius

°K

degré Kelvin

INTRODUCTION GENERALE

Le genre *Streptomyces* appartient à l'ordre des Actinomycètes. Il est composé de bactéries Gram-positives, aérobies strictes et filamenteuses. Ce genre joue un rôle important pour la santé humaine car il produit divers métabolites secondaires, notamment des molécules aux propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antihelminthiques et anti-tumorales. Parmi ces métabolites, les antibiotiques sont, de loin, la plus importante application industrielle des *Streptomyces*. Ainsi, environ deux tiers des antibiotiques commercialisés sont produits par ce genre bactérien, avec de réelles autres perspectives de production. La compréhension et le contrôle du déclenchement de la production des antibiotiques demeurent un sujet de grand intérêt pour les scientifiques et les industriels. Chez les *Streptomyces*, celui-ci est classiquement attribué à une limitation nutritionnelle (carbone, azote, phosphate). Cependant, rares sont les études qui ont relié les capacités de transfert ou d'agitation des systèmes de culture au déclenchement de la production, bien que ces derniers aspects semblent indissociables de tout phénomène de "limitation" en substrat. L'amélioration des performances de production des antibiotiques existants et à venir passe donc, entre autres, par une compréhension fine des mécanismes déclenchant et intensifiant la production mais également des phénomènes associés de transfert de matière en bioréacteur.

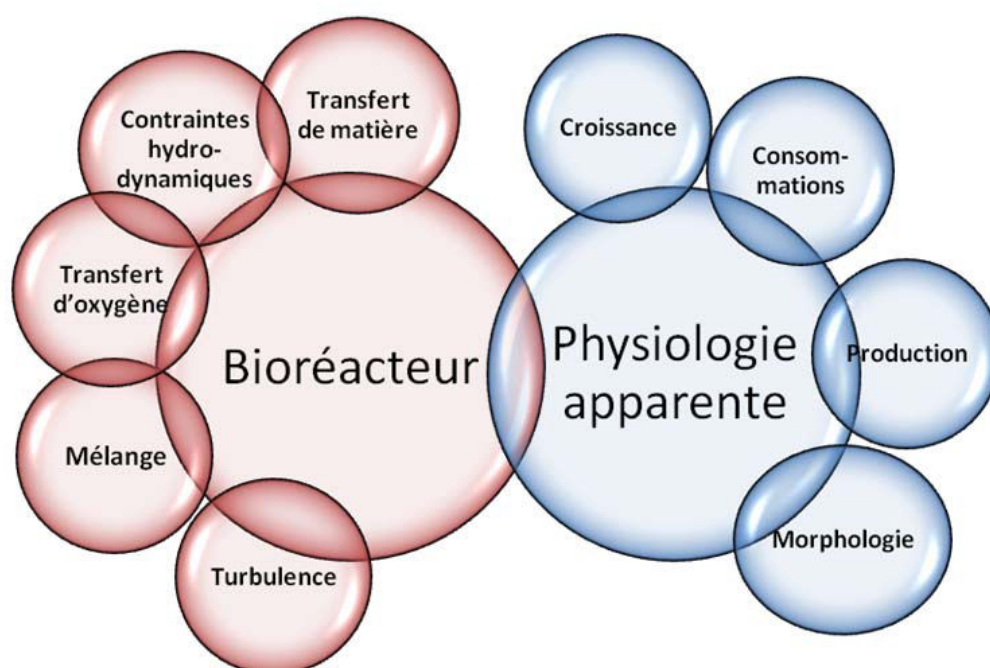


Figure A. Interactions entre l'environnement hydrodynamique rencontré dans un bioréacteur et la physiologie apparente du micro-organisme.

Lors de leur culture en bioréacteur, ces microorganismes sont soumis à une hydrodynamique qui conditionne, entre autres, les contraintes particulières, les flux de transfert de matière (substrats carbonés, azotés et oxygène) et les structures d'écoulement. Par conséquent, les réponses physiologiques apparentes ou réelles du microorganisme (croissance, morphologie, consommations et productions) sont potentiellement couplées à la conception et à l'opération du bioréacteur (Figure A). L'hydrodynamique des réacteurs gaz-liquides agités mécaniquement, généralement utilisés pour la culture industrielle des *Streptomyces*, présente une complexité particulière. En effet, pour ces systèmes, la complexité est issue notamment des couplages gaz-liquides, des mécanismes de coalescence et de rupture de bulles, des phénomènes de dissipation d'énergie cinétique turbulente dans le voisinage de l'agitateur. Ainsi une étude fine des couplages entre le biocatalyseur et l'environnement hydrodynamique passe préférentiellement par l'utilisation de systèmes de culture à l'hydrodynamique simplifiée (Lara et al., 2006). On pourra ainsi citer les travaux de Douaire (2010) et Barbouche (2008) réalisés en réacteur de type Taylor-Couette. Ce système, particulièrement intéressant, ne permet cependant pas des apports en oxygène suffisants pour des microorganismes fortement demandeurs.

Ainsi, dans le cadre de notre étude, notre choix s'est orienté vers des fioles lisses d'Erlenmeyer. De nos jours, 90 % des cultures microbiennes sont réalisées en fioles d'Erlenmeyer (Büchs, 2000), ce qui justifie donc également le choix de ce système. Ce dernier présente par ailleurs un certain nombre d'avantages : (i) possibilité de mener un grand nombre d'expériences en parallèle, (ii) coût et mise en œuvre réduits, (iii) hétérogénéité de l'écoulement sensiblement moins marqué qu'en réacteur mécaniquement agité. De plus, la littérature fournit désormais un certain nombre d'études permettant de caractériser les grandeurs macroscopiques hydrodynamiques et de transfert en fioles agitées telles que le quotient respiratoire (Anderlei et Büchs, 2001; Anderlei et al., 2004), la puissance dissipée volumique (Büchs et al., 2000), le coefficient volumique de transfert d'oxygène (Maier, 2002), l'oxygène dissous (Gupta and Rao, 2003) et le temps de mélange (Gerson and Kole, 2001; Tan et al., 2011).

Sur la base de ce constat général, nous nous proposons, dans le cadre de ce travail de thèse, de relier la physiologie apparente du microorganisme et plus spécifiquement la production d'antibiotiques (déclenchement et concentration) à son environnement hydrodynamique. Le modèle bactérien utilisé dans cette étude sera l'espèce *Streptomyces*

pristinaespiralis productrice de pristinamycines. Ainsi, les principaux objectifs de ce travail sont les suivants:

- Caractériser l'environnement hydrodynamique macroscopique escompté en fioles agitées lisses en termes de dissipation volumique, transfert d'oxygène et échelles de dissipation.
- Identifier les conditions environnementales (oxygène, nutriments) nécessaires au déclenchement de la production d'antibiotiques par *S. pristinaespiralis* en fioles agitées.
- Associer les grandeurs macroscopiques d'agitation et d'aération du bioréacteur à la réponse physiologique apparente tout en découplant leurs effets respectifs.
- Valider les conclusions précédemment obtenues dans un maximum de systèmes, en modifiant notamment la souche microbienne et la taille des fioles utilisées.
- Améliorer la connaissance des interactions entre la turbulence et la taille des pelotes microbiennes.

Afin de répondre à ces questions générales, des cultures de *S. pristinaespiralis*, ont été réalisées sous diverses conditions d'agitation et d'aération. Ces conditions engendrent des dissipations volumiques comprises entre 0,55 et 14 kW.m⁻³ et des coefficients volumiques de transfert d'oxygène compris environ entre 30 et 490 h⁻¹ et sont donc similaires, au moins en moyenne, aux conditions rencontrées dans un réacteur agité gaz-liquide. La réponse physiologique apparente a été quantifiée en termes de croissance, consommation des substrats, morphologie et production de pristinamycines. Ce travail de thèse a été articulé en six chapitres selon la structure suivante.

Dans **un premier chapitre**, une revue bibliographique rédigée sous la forme d'un projet de publication, rappelle l'impact des conditions opératoires de culture sur la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* en bioréacteur. Ainsi, l'influence des paramètres de culture (inoculum, température, pH) mais surtout des stress nutritionnels (carbone, azote, phosphate essentiellement), hydrodynamiques (agitation, transfert d'oxygène) et morphologiques sur la croissance et l'induction de la production est rappelée et détaillée. Cette revue est complétée par une brève présentation du genre *Streptomyces*, de l'espèce *S. pristinaespiralis* et des pristinamycines.

Le **second chapitre** (matériels et méthodes) décrit les souches utilisées, la composition du milieu de culture, les **protocoles expérimentaux** utilisés pour la mesure des

concentrations en biomasse, en substrats et en antibiotiques, pour la mesure du diamètre des pelotes et pour la caractérisation de la rhéologie des suspensions microbiennes. Ce chapitre présentera également les principales relations et méthodes utilisées pour la **quantification des grandeurs macroscopiques de l'hydrodynamique**.

Dans un **troisième chapitre**, l'influence de la **dissipation volumique** a été étudiée sur les **cinétiques** de croissance, de consommation des substrats (dont l'oxygène) et de production de pristinamycines ainsi que sur le diamètre des pelotes. Pour cela, des suivis cinétiques de cultures de *S. pristinaespiralis* pr11 ont été menées en fioles lisses de 250 mL de volume total. Sur la base des résultats obtenus, une meilleure compréhension des **conditions nutritionnelles nécessaires au déclenchement de la production** est escomptée. Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication soumise à *Biotechnology & Bioengineering* à laquelle sont ajoutés des résultats complémentaires.

Le **quatrième chapitre** se propose d'extrapoler les résultats obtenus dans le chapitre III à des cultures réalisées en fioles de 500 et 1000 mL de volume total. En particulier, la validité de la dissipation volumique moyenne et du coefficient volumique de transfert gaz-liquide comme critère d'extrapolation sera testée par la construction d'un diagramme de production généralisé (k_{La} vs P / V). Ce diagramme devra permettre la prédiction des conditions opératoires conduisant au déclenchement de la production en fioles d'Erlenmeyer. Pour cela, la mécanique des fluides numérique a été utilisée afin de prédire les viscosités équivalentes des suspensions microbiennes dans le cas de rhéologies non-Newtoniennes. Des corrélations entre les vitesses spécifiques de croissance, de consommation de substrats, les capacités de production d'une part et la dissipation volumique d'autre part ont été établies. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article publié dans *Process Biochemistry* auquel sont ajoutés des résultats complémentaires.

Dans le **cinquième chapitre**, la validité des résultats précédemment exposés avec la souche *S. pristinaespiralis* pr11 a été testée sur une **autre souche** *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338.

Enfin, dans le **sixième chapitre** la dissipation volumique moyenne a été **découplée** du coefficient volumique de transfert d'oxygène. Ainsi, les effets respectifs d'une augmentation de la dissipation et du transfert d'oxygène ont été étudiés sur la croissance, la consommation des substrats, l'induction et la production de pristinamycines ainsi que sur la croissance et le diamètre des pelotes. Cette première partie du chapitre sera présentée sous la forme d'un

Introduction générale

projet de publication. Ce travail de thèse se propose enfin d'estimer les échelles de dissipation et les contraintes hydrodynamiques escomptées et de les relier aux diamètres de pelotes ainsi qu'aux capacités de production du microorganisme.

La conclusion générale reprend les résultats majeurs de ce travail et relate les perspectives restant à entreprendre.

1^{er} Chapitre

I. Revue bibliographique

*Impact des conditions de culture sur la
production d'antibiotiques par
Streptomyces en bioréacteur*

Cette première partie de la thèse est principalement constituée d'un projet de publication. Une partie complémentaire présentant l'espèce bactérienne utilisée au cours de ce travail ainsi que les métabolites secondaires synthétisés par cette espèce viendra compléter les informations présentées dans ce projet de publication.

Influence of operating conditions and hydrodynamics on antibiotic production by *Streptomyces* in bioreactors.

N. Mehmood, E. Olmos, J-L. Goergen and S. Delaunay

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés-UPR CNRS 3349, Nancy-Université

ENSAIA-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172 F-54505 Vandœuvre lès Nancy

France

Abstract

Streptomyces are filamentous, gram positive bacteria with high GC contents. *Streptomyces* are used for production of various secondary metabolites. Antibiotics are mainly produced industrially in stirred tank reactors while at laboratory scale shaking flasks are often used too. As secondary metabolites, antibiotics are produced under different environmental cues. Nutritional and hydrodynamic stresses are phenomena impacting the production of antibiotics. Various other factors like temperature, pH, inoculum quality and morphology can also be related to the production of antibiotics. In this review, the effects of various cultural (inoculum, temperature, pH), nutritional (carbon, nitrogen, phosphate, metal ions), hydrodynamic (agitation, oxygen transfer) and morphological parameters on the production of antibiotic by *Streptomyces* have been summarized.

Keywords: *Streptomyces*, morphology, nutritional limitation, cultural conditions, hydrodynamics, bioreactor

I.1. Introduction

Streptomyces is a genus of Actinomycetes, a group of Gram-positive and generally high GC (65–75 %) content bacteria. These filamentous microorganisms are strictly aerobic. *Streptomyces* are prokaryotic but their life cycle is similar to the cycle of fungi. In liquid medium, as fungi, *Streptomyces* may present three types of morphology: filaments that may be branched or not, clumps and pellets. *Streptomyces* produce a wide range of secondary metabolites including antimicrobial, antifungal, anthelmintic agents, antitumor agents, herbicides, pigments and other bioactive compounds. The wide range of secondary metabolites produced by *Streptomyces* genus may be due to the fact that they are found in various natural environments, which frequently turn out to be complex and diverse. They are known to compete with other microorganisms for the nutrients present in the environment (Xiong et al., 2004).

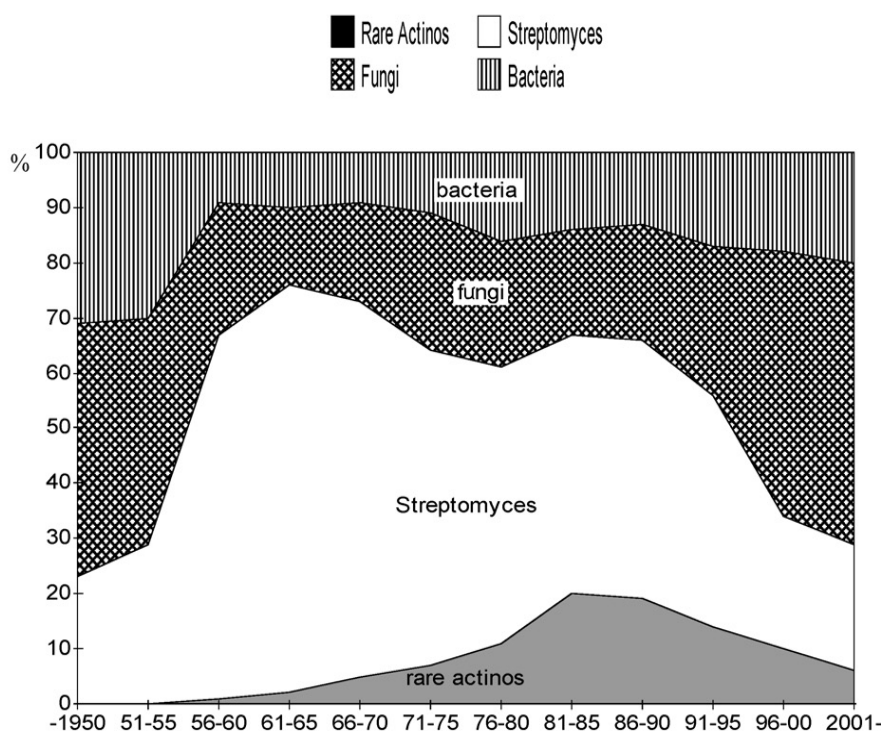


Figure I-1. Distribution of antibiotics produced by different groups of microorganisms from 1950 to 2001 (Berdy et al., 2005).

Among the 12,000 antibiotics known in 1995, 55 % were produced by actinomycetes (44 % from *Streptomyces*) (Berdy et al., 2005). Antibiotics from *Streptomyces* alone had a

market of \$ 25 billion in 2001, while market for antifungal drugs in 2002 was \$4 billion (Demain, 2009). Discovery of new antibiotics produced by *Streptomyces* still continues, for example, mediomycin A, mediomycin B and clethramycin were isolated from *S. mediodidicus* ATCC 23936 (Cai et al., 2007), a new analogue of bleomycin (NC0604) was isolated from fermentation broth of *S. verticillus* var. *pingyangensis* (Chen et al., 2008) and caboxamycin, a new benzoxazole antibiotic was isolated from *Streptomyces* sp. NTK 937 (Hohmann et al., 2009). Thus, species belonging to this genus still remain an important source of antibiotics.

Antibiotics are defined as “a chemical substance derived from microorganisms which has the capacity of inhibiting growth and even destroying certain other microorganisms in dilute solutions” (Rokem et al., 2007). Main characteristics of antibiotics are the following:

- Most important group of secondary metabolites produced industrially
- Mostly produced by fermentation.
- Broad range of different chemical structures as well as different molecular targets in fighting infection diseases. Some antibiotics have wide range of application and are produced in large quantities like penicillins, while some antibiotics have very small application and produced in relatively small quantity like vancomycin (Rokem et al., 2007).
- Produced under various environmental cues including phosphate, level and nature of carbon and nitrogen sources as well as typical variables like temperature, pH and light (Ruiz et al., 2010) and hydrodynamic stresses (Mehmood et al., 2010).

Much progress has been made in recent years in understanding the genetic and biochemical basis for the biosynthesis of these complex molecules. These studies have been aided by the development of molecular genetics tools and gene transfer methods in *Streptomyces*. For all antibiotics, there is a general interest to obtain high productivities and high titre, as it ensures a cost effective production. This has been achieved by using several approaches like classical strain improvement, optimization of process parameters as well as genetic approaches (Rokem et al., 2007).

Streptomyces are thus key microorganisms for human health as well as for the pharmaceutical industry. Detailed knowledge of the mechanisms implied in antibiotics production is thus a pre-requisite to increase the antibiotic titer. Literature regarding medium

optimization as well as process parameter is extremely important for the production of antibiotics. In this review, effects of operating conditions (inoculums, temperature, pH), nutrients (carbon, nitrogen, phosphate and metal ions) and hydrodynamics (agitation, oxygen transfer, impact on morphology) on the production of antibiotics by *Streptomyces* have been summarized. This review focused on submerged fermentation carried out in shaking flasks, stirred and airlift bioreactors.

I.2. *Streptomyces* morphology

I.2.1. Types of morphology

As depicted in Figure I-2, filamentous microorganisms exhibit two main characteristic types of morphology in submerged cultures (Paul and Thomas, 1998; Amanullah et al., 2000).

I.2.1.1. Filamentous form

The filamentous form is commonly referred to freely dispersed mycelia which may be branched or unbranched. These mycelia often get entangled to form clumps.

I.2.1.2. Pellet form

The general structure of pellets is a core of densely packed and interwoven hyphae, surrounded to a greater or lesser extent by a more dispersed 'hairy' region. Their diameters vary from ten micrometers to few millimeters (Kim and Hancock, 2000). The exact process of pellet formation was not fully understood. Two mechanisms (coagulating and non coagulating pelletization) were proposed for fungi pellets (Takahashi and Yamada, 1959; Takahashi et al., 1959; Nielsen et al., 1995). The coagulating mechanism involved aggregation of spores to form pellet nuclei and subsequent aggregation of small clumps of germinated spores. On the contrary, the non-coagulating pellet mechanism involved the germination of a single spore. Similar mechanisms might be supposed for *Streptomyces* pellets. The size of the pellets can be regulated, more or less, by power dissipation, DOC, temperature, pH, nutritional parameters (discussed in this review in the dedicated section).

In industrial fermentations, it is often desirable to grow filamentous microorganisms in a given morphological form. For instance, penicillin production required the filamentous form of *Penicillium chrysogenum* while the pelleted form of *Aspergillus niger* was required for optimal production in many commercial citric acid productions (Paul et al., 1998).

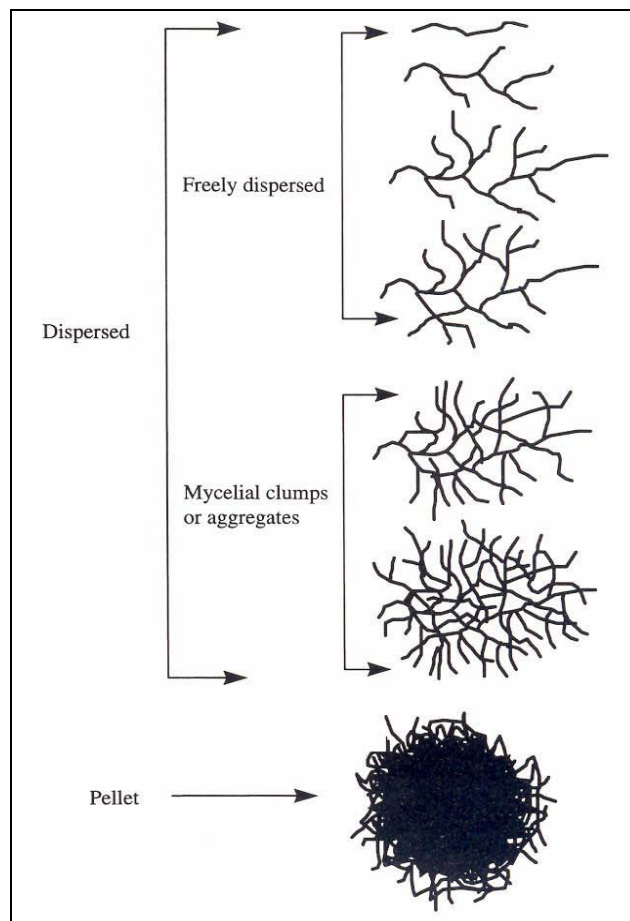


Figure I-2. Different types of *Streptomyces* morphology during growth in liquid cultures (Paul and Thomas, 1998).

To characterize microorganism morphology, image analysis can be used to obtain quantitative and automated information from microscopic observations. This technique was used to characterize the morphology and simple differentiation of actinomycetes (Reichl et al., 1992; Yang et al., 1996; Drouin et al., 1997; Pinto et al., 2004; Pandolfi et al., 2007). Focused Beam Reflectance Measurement can also be used for online characterization of morphology (Pearson et al., 2003).

I.2.2. Relationships between morphology and production of antibiotics

Production of antibiotics strongly depends on the type of morphology as well as of the size distribution of microbial pellets, if pellet morphology is encountered. Establishing general relationships between process variables, product formation and morphology is inherently difficult, as many parameters are coupled (Papagianni, 2004).

Smaller pellets were found to promote the production of hybrid antibiotics by *Streptomyces lividans* (Sarra et al., 1999), geldanamycin by *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* (Dobson et al., 2008), hexaene H-85 and azalomycine by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 (Ilic et al., 2008) and avermectin by *Streptomyces avermitilis* (Yin et al., 2008). In some studies, an optimal area of pellets was reported as maximizing the production. Indeed, Tamura et al. (1997) proposed the pellet area of $4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ for the maximum production of tylosin by *Streptomyces fradiae* while Vecht-Lifshitz et al. (1991) found that a pellet diameter of 1.4 mm was optimal for nikkomycin production by *Streptomyces tendae*. Beside these works, other studies claimed that no particular type of morphology was required for the production of antibiotics. Jonsbu et al. (2000) used *Streptomyces noursei* ATCC 11455 and NGL 19 for the production of nystatin. The strain ATCC 11455 generally grew in the form of clumps while the strain NGL 19 formed pellets. The size of the clumps remained almost constant through the cultivation time while the pellet diameters increased from 77 to 147 μm during culture. In this study, both strains produced nystatin, thus showing that no particular morphology was required for the production of nystatin. Similarly, a morphological change of *Streptomyces virginiae* had no direct impact on virginiamycin production (Yang et al., 1996).

I.2.3. Relationships between morphology and broth rheology

The rheological properties of the fermentation broth may affect transport phenomena in the bioreactor and finally the efficiency and the productivity of the entire process (Papagianni, 2004). These properties are mainly determined by the concentration of biomass, its morphology and possibly the molecules excreted.

1.2.3.1. *Filamentous form*

Filaments promote high viscosity and non-Newtonian broth rheology, resulting in poor mass and heat transfer. A shear-thinning behavior is most of the time observed. The geometry of hyphae (length, diameter and branching frequency), the hyphal flexibility and the hyphal-hyphal interactions are additional factors impacting broth rheology. During cultivation, as biomass concentration increased, the number of particles (free or aggregated mycelia) and thus the inter-particle interactions also increased, thus leading to a possible rise in broth viscosity and to the occurrence of non-Newtonian behavior (Pamboukion and Facciotti, 2005; Warran et al., 1997). Tamura et al. (1997) have observed that the larger the pellet size of *S. fradiae* is, the lower the viscosity of the culture broth is. The authors explained the increase in viscosity (> 0.1 Pa.s) for agitation rates of 400 rpm and above by higher ratio of filaments and entangled filaments.

1.2.3.2. *Pellet form*

The pellet morphology generally leads to Newtonian behavior of the broth (Ohta et al., 1995; Papagianni, 2004). A shear-thinning behavior for high biomass concentrations was shown by Mehmood et al. (2010) with *Streptomyces pristinaespiralis*, despite the occurrence of pellets. However, a Newtonian plateau was observed for the highest shear rates.

Broth rheology can be manipulated by modifying agitation intensity, DOC and form of morphology. In the study of O’Cleirigh et al. (2005), varying concentrations of xanthan gum were used to control the apparent viscosity of *S. hygroscopicus* broth and thus particle interaction, aggregation and pellets formation. By this way, increase in pellets number, biomass concentration and mean pellet volume was observed in cultures supplemented with 3 g.L⁻¹ of xanthan gum.

1.2.4. Cell viability inside pellets

Despite its advantages (promotion of low-viscosity broths, and thus better heat and mass transfer in the liquid phase), pellet morphology raises a few problems:

- *Diffusion of nutriments.* Inside the pellet core, the transport of nutrients is governed by diffusion, thus related to pellet diameter and significantly slower than convective transfer in the bulk liquid phase. At the periphery of large pellets of *A. niger*, transport of oxygen seemed influenced by liquid advection too (Hille et al., 2009).

- *Cell death in pellet core.* The limiting conditions in pellet core may entail premature cell death. This death can be put into evidence using various stains (propidium iodide, fluorescein isothiocyanate (FITC), SYTO 9) followed by examination under confocal laser scanning microscope (CLSM). Manteca et al. (2008) have reported that death processes took place in the pellets core in *S. coelicolor* cultures. An inactive core was present inside the *S. fradiae* pellets in both stirred and air-lift reactor (Park et al., 1997).

I.3. Cultural conditions

I.3.1. Inoculum

The nature, size and age of inoculum are prime important factors that can affect microbial growth as well as production of antibiotics during cultures with *Streptomyces* (Glazebrook et al., 1992).

I.3.1.1. Nature

Various studies have studied the influence of the nature of inoculum (vegetative or spores) on growth and antibiotics production (onset, yields) in *Streptomyces*. The preferred nature of inoculum depends on the species of *Streptomyces* used. For example, the use of a spore suspension as inoculum resulted in better growth and specific growth rate in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (Doull and Vining, 1989; Elibol et al., 1995) while cell growth was nearly independent on the nature of inoculum in *Streptomyces natalensis* (El-Enshasy et al., 2000).

The optimum antibiotics concentration can be obtained either with spores or vegetative cells depending once again upon the species of *Streptomyces*. The highest natamycin concentration as well as production yield by *S. natalensis* (El-Enshasy et al., 2000) and actinorhodin by *S. coelicolor* A3 (2) (Elibol et al., 1995) have been obtained with spore inoculated cultures while the best spiramycin production yield by *Streptomyces ambofaciens* has been observed with vegetative cells (Ashy et al., 1982). On the contrary, synthesis of streptomycin by *Streptomyces griseus* was independent of inoculum nature (Fazeli et al., 1995).

1.3.1.2. Size

The size of the inoculum (initial spore concentration or percentage of vegetative cell suspension) to be inoculated is critical in microbial cultures (Hunt and Stieber, 1986; Webb and Kamat, 1992).

Table I-1. Influence of inoculum size on *Streptomyces* growth and antibiotic production.

<i>Streptomyces</i> strain	Type of inoculum	Optimum level of inoculum size	Reference
<i>S. coelicolor</i>	vegetative cells	2.5 % (growth and production)	Elibol et al. (1995)
<i>S. natalensis</i>		5 % (growth and production)	El-Enshasy et al. (2000)
<i>S. pristinaespiralis</i>			Paquet et al. (1990)
<i>S. violatus</i>			Hassan et al. (2001)
<i>S. peucetius</i>			10 % (growth and production)
<i>S. rimosus</i> MY02		Yu et al. (2007)	
<i>S. gilvosporeus</i>		Luo et al. (2005)	
<i>S. hygrosopicus</i>		Bhattacharyya and Sen (2002)	
<i>S. natalensis</i>	spores	2×10^8 spores.mL ⁻¹ (optimal production yield $Y_{P/X}$)	El-Enshasy et al. (2000)
<i>S. coelicolor</i>		1×10^5 spores.mL ⁻¹ (growth and production)	Manteca et al. (2008)
<i>Streptomyces</i> sp. 201		2×10^9 spores.mL ⁻¹ (growth and production)	Thakur et al. (2009)
<i>S. violatus</i>		4×10^6 spores.mL ⁻¹ (growth and production)	Hassan et al. (2001)
<i>S. coelicolor</i> A3 (2)		10^5 spores.mL ⁻¹ (growth) 10^7 spores.mL ⁻¹ (actinorhodin production)	Hobbs et al. (1990)

The optimum inoculum size for growth and for antibiotics production depends on the *Streptomyces* species. When spore suspensions are used as inoculum, there exist threshold (and sometimes different) levels of spores number for optimal growth and production. Above them, biomass growth and antibiotics production are not sensibly affected by inoculum size.

Below these threshold values, biomass and antibiotics concentrations become progressively lower (Doull and Vining, 1990). The optimum spore concentration for growth as well as antibiotics production can vary from each other (Table 1-1). Spore concentration can also affect the microorganism morphology. Generally, high concentrations of spores promote dispersed form in *Streptomyces* while low levels rather favour pellet formation (Dobson et al., 2008; El-Enshasy et al., 2000; Kim and Hancock, 2000; Nielsen et al., 1995; Vecht-Lifshitz et al., 1990; Vecht-Lifshitz et al., 1989; Whitaker, 1992). As for spore inoculum, an optimum level of concentration of vegetative cells exists for growth and production of antibiotics. This level depends on the species of *Streptomyces* as well as on the antibiotics produced (Table 1-1).

1.3.1.3. Age

In many experimental protocols, the spores are initially germinated in a shaking flask. This preculture is then transferred to the culture medium used for the production of antibiotics. The age of the preculture used for bioreactor inoculation sensibly affects growth as well as antibiotics production. The optimum ages reported with various *Streptomyces* species range from 24 to 144 h. A 24 h – old preculture was found optimal for growth as well as for pristinamycins production by *S. pristinaespiralis* (Paquet et al., 1990; Saffroy, 2006) and for tylosin production by *S. fradiae* TM-224-4 (Choi et al., 2007). Older precultures were necessary for optimal production of spiramycin by *S. ambofaciens* (44 hours, Drouin, 1997), of natamycin production by *S. natalensis* and *Streptomyces gilvosporeus* (48 hours, El-Enshasy et al., 2000; Luo et al., 2005) and for antifungals produced by *Streptomyces rimosus* MY02 (96 to 144 hours, Yu et al., 2008).

1.3.1. Temperature

1.3.1.1. Operating temperature

Temperature is an environmental parameter that is easy to control, especially in small-scaled systems but its variation can dramatically affect process performance. It is generally admitted that, in a certain extent, a slight increase in temperature may favor the growth rate but the dissolved oxygen saturation varies inversely with increasing temperature. Similarly, nutritional and pH requirements for growth may be influenced by the temperature (Papagiani et al., 2004).

Table I-2. Influence of temperature on growth and antibiotic production on various *Streptomyces*.

<i>Streptomyces</i> strain	Antibiotic	Optimal temperature	Reference
<i>S. rimosus</i> MY02	antifungal	28 °C (production)	Yu et al. (2008)
<i>S. californicus</i> JCM 6910	griseorhodin		Suetsuna and Osajima (1990)
<i>S. endus</i> N40	antialgal		El-Shirbmy et al. (2007)
<i>S. tendae</i> TK-VL-333	bioactive metabolite	30 °C (production)	Kavitha and Vijayalakshmi (2009)
<i>Streptomyces</i> KEH23	antifungal and antibacterial		Oskay (2009)
<i>S. galbus</i>	antifungal		Paul and Benerjee (1983)
<i>Streptomyces</i> DAUFPE 3060	clavulanic acid	32 °C (production)	Viana et al. (2010)
<i>S. aburaviensis</i> 1DA-28	antifungal		Raytapadar and Paul (2001)
<i>S. hygroscopicus</i>	Validamycin A	35 °C (production)	Liao et al. (2009)
<i>S. albidoflavous</i>	antimicrobial metabolite		Narayana and Vijayalakshmi (2008)
<i>S. thermoviolaceus</i>	granaticin	45 °C (production)	James and Edward (1989)
<i>Streptomyces</i> sp. 201	bioactive metabolite	35 °C (growth) 30 °C (production)	Thakur et al. (2009)
<i>S. fradiae</i> TM-224	tylosin	30 – 34 °C (growth) 32 °C (production)	Choi et al. (2007)
<i>S. griseus</i> ATCC 12475	streptomycin	34 °C max (growth) 37 °C max (production)	Deeble et al. (1995)

Streptomyces are mostly mesophilic microorganisms showing a narrow range of temperature for optimum growth and antibiotic production. A temperature ranging from of 28 to 35 °C was found optimum for various antibiotic productions. Some thermophilic antibiotic producing *Streptomyces* have also been identified (James et al., 1991; James and Edward, 1989). Some studies regarding the effects of temperature on antibiotic production by *Streptomyces* are depicted in Table I-2.

1.3.1.2. Temperature variation effects

Temperature variation may entail a specific action on the antibiotic synthesis. For example, the effect of heat shocks on the production of actinomycins and their composition was studied in *Streptomyces chrysomallus*. After a 1 h shock at 35 or 38°C, the maximum quantity of actinomycin was increased without significant change in the composition of the actinomycin complex while actinomycins concentration was lowered after heat shock at 40, 42, 45 or 50°C (Lyui et al., 2000). For few antibiotics, temperature shifting strategy during cultures has been used to increase the final concentration. For example, after 76 h, a temperature shift from 30°C to 28°C promoted an increase in the concentration of the meilingmycin produced by *Streptomyces nanchangensis*, compared to a process with a constant temperature (Yan et al., 2002).

The morphology of *Streptomyces* sp. has also been found to be somewhat dependent on culture temperature. An increase in temperature from 30 to 37°C caused a decrease in pellet size by one third in cultures of *S. griseus* (Kim and Hancock, 2000). Vecht-Lifshitz et al. (1990) also reported that high incubation temperatures (31-32°C) induced dispersed growth of *S. tendae*, in contrast to lower temperatures (26-30°C) that promoted pellet growth.

1.3.2. pH

pH can affect several cell activities like nutrient transport or solubility, enzyme reactions or surface phenomena. Without pH control, the composition of the medium can affect the initial pH as well as pH drifts during growth. Media containing ammonium salts are likely to become more acidic during growth, while media containing nitrate are likely to become alkaline (Papagianni et al., 2004). It is often desirable to minimize pH drifts during growth but this is often difficult to achieve. High concentrations of ions such as phosphate are used to achieve pH stability but they may strongly influence the enzymatic activities and growth. Moreover, the culture pH influences the concentration of dissolved bicarbonate formed from gaseous CO₂. The prevailing pH and buffer capacity of the culture medium can thus influence antibiotic production. *Streptomyces* mostly grow at pH between 6 and 8 but the optimum range of pH is species and product dependent (see Table I-3). pH shift strategies have been used to improve the production of certain antibiotics (see the works of Kim et al., 2000; Lee et al., 2002 and Mao et al., 2009 in Table I-3).

Table I-3. Some examples of optimal pH for growth and metabolites production with *Streptomyces*

<i>Streptomyces</i> strain	Antibiotic	Optimal pH value	Reference
<i>S. rimosus</i> MY02	antifungals	pH = 6 (production)	Yu et al. (2008)
<i>Streptomyces</i> DAUFPE 3060	clavulanic acid		Viana et al. (2010)
<i>S. ambofaciens</i> <i>S. thermoviolaceus</i>	spiramycins granaticin	pH = 6.5 (production)	Ashy et al. (1982) James and Edward (1989)
<i>S. antibioticus</i>	broad spectrum antibiotic	pH = 6.8 (production)	Haque et al. (1995)
<i>S. albidoflavous</i>	antimicrobial metabolites	pH = 7.0 (production)	Narayana and Vijayalakshmi (2008)
<i>S. olindensis</i> ICB20	retamycin		Guimaraes et al. (2004)
<i>S. hygroscopicus</i>	antimicrobial and antifungal		Bhattacharyya et al. (1998)
<i>Streptomyces</i> KGG13 and KVK11	antimicrobial metabolites	pH = 7.2-7.4 (production)	Oskay et al. (2010)
<i>Streptomyces</i> sp. 201	antimicrobial metabolites	pH = 7.5 (production)	Thakur et al. (2009)
<i>Streptomyces</i> KEH23	antimicrobial and antibacterial		Oskay et al. (2009)
<i>S. gilvosporeus</i>	natamycin	7.5 < pH < 8.0 (growth) 6.5 < pH < 7.0 (production)	Luo et al. (2005)
<i>S. fradiae</i> TM-224	tylosin	7.0 < pH < 7.5 (growth) pH = 7.5 (production)	Choi et al. (2007)
<i>S. tendae</i>	nikkomycin	pH = 7.8 (growth)	Vecht-Lifshitz et al. (1990)
<i>S. hygroscopicus</i>	rapamycin	6.2 < pH < 6.8 (growth and production)	Chen et al. (1999)

pH also affects the morphology of *Streptomyces*. However, many conflicting reports in literature do not permit to draw general conclusion. Braun and Vecht-Lifshitz (1991) have reported that at pH above 5.5, the cell wall of most organisms is negatively charged which causes separation of the aggregated cells due to electrostatic repulsion. In *S. tendae* (Vecht-Lifshitz et al., 1989), the size of the pellets was between 0.1 and 0.2 mm at pH = 7 but it was between 1.2 and 1.5 mm at pH = 4. A similar trend was observed with *S. griseus* (Kim and Hancock, 2000). On contrary, with culture of *S. akiyoshiensis*, the size of the aggregates was 4 to 5 folds larger at pH higher than 5.5 (Glazebrook et al., 1992).

Within a same microorganism, a change in pH may result in the production in different molecules. For example, at pH 4.5 to 5.5, significant formation of actinorhodin occurred with *S. coelicolor* whereas at pH between 6.0 and 7.5 undecylprodigiosin was produced instead of actinorhodin (Bystrykh et al., 1996). pH may also be controlled at different values during a process to promote the antibiotic production. In the first phase, pH is maintained at an optimal value for growth. Then, it is shifted to a more acid level to optimize the antibiotic production (Mao et al., 2009; Kim et al., 2000). In some cases, the culture pH may also be modified to avoid the antibiotic degradation (Lee et al., 2002).

I.4. Nutritional parameters

The composition of the medium strongly affects the growth and the metabolite production in *Streptomyces*. The morphology of these bacteria may also be affected by the medium composition. Various carbon, nitrogen, inorganic phosphate sources as well as ions play an important role, not only on the onset of production, but on the concentration produced as well.

I.4.1. Regulation of antibiotic production by carbon source

Carbon source is known to be one of the major medium components as it provides energy and building blocks to the microorganism. In most of the works, glucose is used as carbon source. Glucose is rapidly assimilated resulting in a fast growth. However, its use as carbon source may interfere with the synthesis of many antibiotics through carbon catabolite repression (Demain, 1989). When the medium contains a mixture of carbon sources, some of them can be rapidly used for growth without synthesis of secondary metabolites. After depletion of these sources, other carbon sources can then be used, slower, for the production of the secondary metabolites (Ruiz et al., 2010; Sanchez et al., 2010).

1.4.1.1. Nature of the carbon source

As antibiotics production is generally low in natural environments, an optimal carbon source (nature, concentration) has to be identified to sustain both growth and high antibiotic production. Some carbon sources used for the production of different antibiotics are summarized in Table I-4. The type and amount of carbon source may influence the antibiotic synthesis. As an example, *S. lividans* produces actinorhodin when glycerol is used as the sole carbon source while no actinorhodin is formed during culture on glucose (Kim et al., 2001). On the contrary, *S. coelicolor* is capable to produce actinorhodin during culture with glucose as carbon source. No molecular explanation of this phenomenon is currently available but it has been found that expression of a regulator gene is dependent on the nature of the carbon source in *S. lividans* (Kim et al., 2001).

In some processes, lower concentration of glucose is used in combination with another “slower” utilized carbon source. In this case, glucose supports rapid growth and the second carbon source is used for the synthesis of the product, when slower growth rate is desirable (Masurekar et al., 2008). This strategy has led to fed batch process which is a common mode of industrial fermentation.

The carbon source can affect the morphology of microorganism. Generally, dispersed forms are more likely in rich, complex media, and pellets formation occur in chemically defined media (Whitaker, 1992). Jonsbu et al. (2001) observed that *S. noursei* grown on fructose as sole carbon source, exhibited smaller ‘clump’ sizes throughout the culture compared to a culture on glucose. However, Glazebrook et al. (1992) reported that there was no consistent relationship between the size of the mycelial aggregates and the carbon source in cultures of *S. akiyoshiensis*.

1.4.1.2. Carbon catabolite repression

The synthesis of several secondary metabolites is submitted to carbon catabolite repression (CCR) (Deutscher, 2008; Gorke and Stulke, 2008). This phenomenon is normally caused by glucose but, in several microorganisms, other rapidly metabolized carbon sources (glycerol, maltose, mannose, sucrose and xylose) can cause repression including glucose catabolism (Sanchez and Demain, 2002).

Chapitre I. Revue bibliographique

Table I-4. Carbon sources used for the production of several antibiotics by *Streptomyces*.

Preferred carbon source	Microorganisms	Antibiotic	Optimal concentration	Other carbon sources	References
Glucose	<i>S. tanashiensis</i> A2D	unidentified antibiotic	1 % (w/v)	lactose, mannitol, sucrose, fructose and xylose	Singh et al. (2009)
	<i>S. viridochromogenes</i>	avilamycin	20 g.L ⁻¹		Zhu et al. (2007)
	<i>S. venezuelae</i> ISP 5230	jodomycin	17 mM	xylose, mannose, sucrose, maltose and trehalose	Jakeman et al. (2006)
	<i>Streptomyces</i> BT-408	antibiotic SBR-22	10-12 g.L ⁻¹	fructose, glycerol, starch, sucrose and arabinose	Sujatha et al. (2005)
	<i>Streptomyces</i> sp. US80	unidentified antimicrobial	1 % (w/v)	starch, fructose, glycerol and saccharose	Fourati-Ben Fguira et al. (2004)
	<i>S. chattanoogensis</i> MTCC 3423	unidentified antibiotic	5 %	fructose, glucose, glycerol, molasses, soluble starch and sorbose	Gupte and Kulkerni (2002)
	<i>S. natalensis</i>	natamycin	20 g.L ⁻¹		Farid et al. (2000)
	<i>S. griseocarneus</i> NCIMB 40447	pyrazoloisoquinolinone	7.5 g.L ⁻¹	arabinose, xylose, fructose, mannose, lactose, maltose, sucrose, starch and sorbitol	Cruz et al. (1999)
	<i>S. rugosporus</i> LL-42D005	pyrroindomycin	5 - 7.5 g.L ⁻¹	fructose, mannitol, corn oil, starch, glycerol and maltose	Abbanat et al. (1999)
	<i>S. avermilitis</i>	avermectin B1a			Zhinan and Peilin (1999)
	<i>S. pedanus</i> PMS - 702	fungichromin	0.5 % (w/v)	cellobiose, galactose, mannose and xylose	Huang et al. (2007)
	<i>S. peuciteus</i>	anthracycline	75-125 mM	fructose, maltose, starch	Dekleva et al. (1985)
Fructose	<i>S. antibioticus</i>	oleandomycin	55 mM	fructose, galactose, cellobiose, xylose, melibiose	Vilches et al. (1990)
	<i>S. griseus</i>	viridomycin	20 g.L ⁻¹	fructose, cellobiose, glycerol, mannose, galactose, glucose, sucrose and arabinose	Kuroban et al. (1987)
Maltose	<i>S. albidoflavus</i>	unidentified antibiotic	1% (w/v)	arabinose, dextrose, fructose, galactose, glycerol, inosine, lactose, maltose, mannitol, mannose, sucrose and trehalose	Narayana and vijayalkshmi (2008)
	<i>S. rimosus</i> MY02	unidentified antifungal	3.3 % (w/v)	starch, maltose, sucrose, dextrin, glucose, and lactose	Yu et al. (2008)
	<i>S. endus</i> N40	niromycin	6 g.L ⁻¹	starch, glucose, fructose, galactose, sucrose, maltose and lactose	El-Shirbmy et al. (2007)
	<i>S. griseus</i> SANK 60196	capuramycin		glucose, glycerol, sucrose and fructose	Muramatsu et al. (2006)
Sucrose	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	actinorhodin	340 g.L ⁻¹	glucose	Elibol and Mavituna (1997)
	<i>S. rochei</i> G164	unidentified antifungal			Chattopadhyay and Sin (1997)
Starch	<i>S. avermilitis</i> 14 - 12 A	avermectin B1a	150 g.L ⁻¹		Gao et al. (2009)
	<i>S. armentosus</i>	armentomycin		glucose, fructose, starch, glycerol and lactose	He et al. (1995)
	<i>S. arenae</i> var <i>ukrainiana</i>	tetraene polyene		glucose	Gupte and Naik (1998)
Dextrose	<i>S. kanamyceticus</i> M27	unidentified antibiotic	1.5 % (w/v)	sucrose, maltose and starch	Pandey et al. (2005)
Lactose	<i>S. hygrosopicus</i>	AK-111-81	2.5 % (w/v)	fructose, sucrose, lactose, glycerol, starch, glucose	Gesheva et al. (2005)
Galactose	<i>S. kanamyceticus</i>	kanamycin	1 % (w/v)	dextrin, soluble starch, potato starch	Basak and Majumdar (1973)
	<i>S. tendae</i> TK-VL-333	bioactive metabolite		fructose, glucose, xylose, glycerol, mannitol, starch, sucrose, sorbitol and inositol	Kavita and Vijayalakshmi (2009)
Mannitol	<i>Streptomyces</i> sp 201	active metabolites	1 % (w/v)	sucrose, glycerol, lactose, galactose, xylose, starch, ribose, Na-citrate and glucose	Thakur et al. (2009)
	<i>S. rugosporus</i> LL-42D005	pyrroindomycins	5 - 7.5 g.L ⁻¹	fructose, mannitol, corn oil, starch, glycerol and maltose	Abbanat et al. (1999)

Chapitre I. Revue bibliographique

Table I-4 (continued). Carbon sources used for the production of several antibiotics produced by *Streptomyces*.

Preferred carbon sources	Microorganism	Antibiotic produced	Optimal concentration	Other carbon sources	Reference
Glycerol	<i>S. violatus</i>	unidentified antibiotic	12.5 g.L ⁻¹	starch	Hassan et al. (2001)
	<i>S. antibioticus</i> Tu 6040	simocyclinone	20 - 25 g.L ⁻¹	sucrose, soyabean oil, sunflower oil, galactose, mannitol, matose, fructose and starch	Theobald et al. (2000) Schimana et al. (2002)
	<i>S. hygrosopicus</i> D1.5	unidentified antibiotic	11.5 g.L ⁻¹	glycerol, glucose, starch, fructose, sucrose, galactose, lactose, dextrin, mannitol and xylose	Bhattacharyya et al. (1998)
	<i>S. antibioticus</i> SR 15.4	unidentified antibiotic	1 M		Haque et al. (1995)
Raw corn meal	<i>S. fradiae</i> TM -224-4	tylosin	80 g.L ⁻¹	glucose	Choi et al. (2007)
Dextrin	<i>S. ambofaciens</i>	spiramycin		glycerol	Lounes et al. (1995b)
Olive oil	<i>S. clavuligerus</i>	clavulanic acid	0.6 % (v/v)	glycerol and sunflower oil	Efthimiou et al. (2008)
Soyabean oil	<i>S. clavuligerus</i>	cephamycin C	7 g.L ⁻¹	starch	Park et al. (1994)
Seeds lipids	<i>S. rimosus</i>	oxytetracycline	70 g.L ⁻¹	glucose	Abou-Zeid and Baeshin (1992)
Glucose and glycerol	<i>Streptomyces</i> KGG13,	unidentified antimicrobial	1 % (w/v)	sucrose and starch	Oskay et al. (2009)
Glucose and triolein	<i>S. lividans</i>	actinorhodin	2.5 and 2.5 g.L ⁻¹	dextrin, palmitic acid and palm oil	Peacock et al. (2002)
Glucose and starch	<i>S. aburaviensis</i>	IDA-28			Ryatapadar and Paul (2001)
Glucose and fructose	<i>S. coelicolor</i> A 3(2)	methylenomycin		galactose, lactose, maltose, starch and sucrose	Hobb et al. (1992)
Glycerol, mannitol and ramnose	<i>S. olivocinereus</i> 11-98	heliomycin		sucrose, arabinose	Deianova et al. (1988)
Fructose, mannose, galactose and xylose	<i>S. hygrosopicus</i>	rapamycin	30 g.L ⁻¹ each	35 other carbon sources	Kojima et al. (1995)
Dextrin and glucose	<i>S. ambofaciens</i>	spiramycin	25 and 15 g.L ⁻¹		Ashy et al. (1982)

The mechanism of CCR in *Streptomyces* is not clearly understood. Even though the glucose concentration in the medium is high, the CCR could be inactive meaning that the glucose concentration in the cell is not at a repressing concentration. Both the rate of glucose uptake and the rate of glucose utilization by the metabolism determine the internal glucose level which may influence the CCR mechanism (Rokem et al., 2007). However, there is probably more than one mechanism. The identified and possible mechanisms have been discussed in several publications (Deutscher, 2008; Gorke and Stulke, 2008; Ruiz et al., 2010;

Sanchez et al., 2010). More than 30 secondary metabolites are suppressed by the presence of glucose which limits the use of glucose as a carbon source for production of antibiotics. Some antibiotics for which the synthesis is controlled by CCR are listed in Table I-5.

To be effective, CCR necessitates various glucose concentrations according to the *Streptomyces* species. It was shown that the actinorhodin production by *S. lividans* was repressed in presence of 100 mM glucose in the culture medium (Ruiz et al., 2010) whereas higher concentration was necessary to repress doxorubicin production by *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Escalante et al., 1999) and retamycin production by *Streptomyces olindensis* (Inoue et al., 2007).

CCR may be exerted at the level of antibiotic-biosynthetic genes or of regulator genes. For example, glucose repressed mannosidostreptomycinase and alkaline phosphatase involved in streptomycin and neomycin biosynthesis produced by *S. griseus* and *S. fradiae* respectively (Demain and Inmine, 1970; Bandyopadhyay and Majumdar, 1974). This sugar also repressed hydroxykynureninase and phenoxazinone synthase involved in actinomycin biosynthesis in *Streptomyces antibioticus* (Brown et al., 1980; Jones, 1985).

I.4.2. Regulation of antibiotic production by nitrogen sources

The choice of nitrogen source and of its concentration in the culture medium is critical for many antibiotic producing processes. Commonly used nitrogen sources (Table I-6) in the antibiotic producing processes are:

- *Ammonium and nitrate salts*: ammonium sulfate, ammonium citrate, ammonium nitrate, sodium nitrate, potassium nitrate.
- *Amino acids*: arginine, leucine, isoleucine, glutamate, histidine, serine, valine, hydroxy proline, methionine, and phenylalanine.
- *Urea*
- *Complex nitrogen sources*.

In the nitrogen metabolism, glutamate and glutamine have a central role as biochemical intermediates. Glutamate provides 85 % of the nitrogen necessary for the biosynthesis of the intracellular nitrogenous compounds while the remaining 15 % come from glutamine (Voelker and Altaba, 2001).

Chapitre I. Revue bibliographique

Table I-5. Overview of the interference of various carbon sources with antibiotic production in *Streptomyces*.

antibiotics	Microorganims	Interfering carbon source (s)	Non interfering carbon source (s)	References
actinomycin	<i>S. antibioticus</i>	glucose	lactose	Gallo and Katz (1972)
streptomycin	<i>S. griseus</i>	glucose	mannan	Demain and Inamine (1970)
siomycin	<i>S. sioyanesis</i>	glucose	maltose	Kimura (1967)
indolmycin	<i>S. griseus ATCC 12648</i>	glucose	fructose, galactose	Hurley and Bialek (1974)
neomycin	<i>S. fradiae</i>	glucose	maltose	Majumdar and Majumdar (1973)
kanamycin	<i>S. kanamyceticus</i>	glucose	galactose	Basak and Majumdar (1973)
puromycin	<i>S. alboniger</i>	glucose	glycerol	Sankaran and Pogell (1975)
novobiocin	<i>S. niveus</i>	citrate	glucose	Kominek (1972)
cephamycin c	<i>S. clavuligerus</i>	glycerol	starch	Lebrihi et al. (1988)
cephamycin	<i>S. clavuligerus</i>	glycerol	asparagine, starch	Aharonowitz and Demain (1978)
actinorhodin	<i>S. coelicolor</i>	glucose	glycerol	Kim et al. (2001) ; Lee et al. (2009)
cloramphenicol	<i>S.venezuelae</i>	glucose		Bhatnagar et al. (1988)
tetracycline	<i>S. aureofaciens</i>	glucose	fructose, sucrose	Erban et al. (1983)
tylosin	<i>S. fradiae</i>	glucose		Vu-Trong et al. (1981)
erythromycin	<i>S. erythraeus</i>	glucose, deoxyglucose, sucrose	lactose	Escalante et al. (1982)

Chapitre I. Revue bibliographique

Table I-6. Preferred nitrogen sources used for antibiotic producing processes with various *Streptomyces*.

Preferred nitrogen sources	Microorganisms	Antibiotics produced	Optimum concentration	Other nitrogen sources	References
ammonium succinate	<i>S. hygrosopicus</i>	AK-111-81	0.15 %	NH ₄ NO ₃ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ Cl, KNO ₃ , ammonium acetate, potassium nitrate, lysine, arginine, casein hydrolysate	Gesheva et al. (2005)
ammonium nitrate	<i>Streptomyces sp.</i>	unidentified antibiotic			Bulchandani and Parvateesam (2007)
ammonium asparagine	<i>S. lactamdurans</i>	cephamycin c	1 mM 10 mM		Castro et al. (1984)
ammonium	<i>S. clavuligerus</i>	clavulanic acid	50 mg.L ⁻¹		Visser-Luirink et al. (2006)
ammonium sulphate aspartic acid and glycine	<i>S. arenae 2064</i>	gilvocarcin	1.5 mM 1 g.L ⁻¹	arginine, asparagine, glutamic acid, glutamine, histidine, proline	Byrne and Greenstein (1986)
ammonium sulphate	<i>S. viridochromogenes</i>	avilamycin	10 mM		Zhu et al. (2007)
	<i>S. sannanensis</i> RJT-1	unidentified antibiotic	1 % (w/v)	peptone, yeast extract, casein and casamino acids	Vasavada et al. (2006)
ammonium phosphate and yeast extract	<i>S. kanamyceticus</i> M27	unidentified antibiotic	0.68 %	NaNO ₃ , peptone	Panday et al. (2005)
ammonium nitrate	<i>Streptomyces</i> BT-408	antibiotics SBR-22	1 %	ammonium citrate, ammonium sulphate, monosodium glutamate, potassium nitrate sodium nitrate, several amino acids	Sujatha et al. (2005)
ammonium nitrate	<i>S. aburaviensis</i> IDA -28	antifungals			Ryatapadar and Paul (2001)
sodium nitrate	<i>S. violatus</i>	unidentified antibiotic	2.5 g.L ⁻¹	peptone, alanine, monosodium glutamate, phenylalanine, ammonium sulphate, sodium nitrate, beef extract	Hassan et al. (2001)
	<i>S. natalensis</i>	natamycin	10 g.L ⁻¹	beef extract, sodium nitrate	Farid et al. (2000)
ammonia sulphate lysine, asparagine	<i>S. avermitilis</i>	avermectin	15 mM 0.2%	ammonium nitrate, sodium nitrate alanine, isoleucine	Cimburkova et al. (1988)
ammonium sulphate	<i>S. hygrosopicus</i>	rapamycin	5.3 g.L ⁻¹	ammonium nitrate, ammonium chloride, urea, potassium nitrate, ammonium citrate, lysine, aspartate	Lee et al. (1997)
potassium nitrate, NH ₄ Cl NH ₄ NO ₃ cystine, alanine, leucine, glutamic acid	<i>S. halstedii</i>	magnamycin	3.0 g.L ⁻¹ 2.5 g.L ⁻¹	sodium acetate, sodium tartrate, sodium citrate proline, glycine, serine, aspartic acid, tyrosine, lysine	Ghonaim et al. (1980)

Chapitre I. Revue bibliographique

Table I-6 (continued). Preferred nitrogen sources used for antibiotic producing processes with various *Streptomyces*.

Preferred nitrogen sources	Microorganims	Antibiotics produced	Optimum concentration	Other nitrogen sources	References
asparagine	<i>Streptomyces sp. 201</i>	bioactive molecules	0.9 g.L ⁻¹	ammonium chloride, ammonium sulphate, sodium nitrate, arginine, potassium nitrate, asparagine, threonine, glutamic acid, glycine, tyrosine, valine, aspartic acid	Thakur et al. (2009)
	<i>S. cettleya</i>	cephamycin c		glutamine	Khaoua et al. (1991)
	<i>S. endus N40</i>	niromycin	1.5 g.L ⁻¹	potassium nitrate, peptone, yeast extract, beef extract, sodium nitrate, ammonium chloride, ammonium nitrate and ammonium sulphate	El-Shirbiny et al. (2007)
asparagine and threonine	<i>S. carzinostaticus</i> F-41	neocarzinostatin			Kudo et al. (1992)
arginine and ornithine	<i>S. clavuligerus</i>	clavulanic acid	5 mM, 115 mg.L ⁻¹		Chen et al. (2003)
glutamic acid	<i>S. padanus</i> PMS-702	antifungal s			Huang et al. (2007)
lysine	<i>S. antibioticus</i> Tu 6040	simocyclinone	20 mM	NH ₄ NO ₃ , tryptophane, urea, phenylalanine, (NH ₄) ₂ SO ₄ , tyrosine, leucine, glutamine, proline, glutamic acid, valine, L-arginine, glycine	Theobald et al. (2000)
	<i>S. griseocarneus</i> NCIMB 40447	pyrazoloisoquinolinone	2 g.L ⁻¹	arginine, aspartic acid, glycine, glutamic acid, histidine, proline and valine	Cruz et al. (1999)
	<i>S. armentosis</i>	armentomycin	40-120 mM		He et al. (1995)
glutamine	<i>S. antibioticus</i> Tu 6040	simicyclinone	5.84 g.L ⁻¹	arginine	Schimana et al. (2002)
glutamine, arginine	<i>S. rugosporus</i> LL-42D005	pyrroindomycin	30, 20 g.L ⁻¹	casein, ammonium chloride	Abbanat et al. (1999)
arginine	<i>S. antibioticus</i> SR15.4	unidentified antibiotic	0.02 M		Haque et al. (1995)
	<i>S. hygroscopicus</i>	unidentified antibiotic	0.75 g.L ⁻¹	various organics and inorganics sources	Bhattacharyya et al. (1998)
valine	<i>S. ambofaciens</i>	spiramycin		ammonium	Laakel et al. (1994)
aspartic acid + arginine +histidine	<i>S. hygroscopicus</i>	rapamycin	0.5 + 0.5 + 0.5 g.L ⁻¹	all the other amino acids	Kojima et al. (1995)
aspartic acid, lysine and NaNO ₃	<i>S. antibioticus</i>	oleandomycin	15 mM	other amino acids, inorganic salts and urea	Vilches et al. (1990)

Chapitre I. Revue bibliographique

Table I-6 (continued). Preferred nitrogen sources used for antibiotic producing processes with various *Streptomyces*.

Preferred nitrogen sources	Microorganisms	Antibiotics produced	Optimum concentration	Other nitrogen sources	References
alanine	<i>S. griseus</i>	viridomycin	1 g.L ⁻¹	glycine, proline, glutamic acid, potassium nitrate, asparagine, histidine, leucine, ammonium sulphate, bacto-peptone	Kuroban et al. (1986)
l-valine, l-leucine, l-isoleucine, l-threonine,	<i>S. fradiae</i>	tylosin	10 mM each	ammonium	Omura et al. (1984)
soya bean meal	<i>S. tanashiensis</i> A2D	unidentified antibiotic	1%	casein, yeast extract, peptone, NH ₄ Cl, NH ₄ NO ₃ , NaNO ₃ , urea	Singh et al. (2009)
	<i>S. chattanoogensis</i>	unidentified antibiotic	1%	ammonium sulphate, ammonium chloride, beef extract, corn steep liquor, dry yeast, malt extract, peptone, potassium nitrate, sodium nitrate, urea and yeast extract	Gupte and Kulkerni (2002)
soya protein isolates (SPI)	<i>S. clavuligerus</i>	clavulanic acid	20 g.L ⁻¹ of SPI		Teodoro et al. (2006)
soya bean flour	<i>S. clavuligerus</i>	clavulanic acid	1.6 g.L ⁻¹	soya bean protein isolates	Ortiz et al. (2007)
protein extract of soybean	<i>S. clavuligerus</i>	clavulanic acid		four different soya bean derivatives	Gouveia et al. (2001)
soya meals	<i>S. albidoflavus</i>	unidentified antibiotic	0.2 %	ammonium sulphate, ammonium chloride, NaNO ₃ , KNO ₃ , L-asparagine, L-glutamine, tyrosine, casein, peptone and yeast extract	Narayana and Vijayalkshmi (2008)
soya bean meal + fish meal	<i>S. fradiae</i> TM-224-4	tylosin	12 + 14 g.L ⁻¹	peptone, yeast extract, gluten meal, fishmeal, soybean meal, ammonium sulphate and urea	Choi et al. (2007)
peptone, soybean meal and urea KNO ₃ and Ca(NO ₃) ₂	<i>S. rimosus</i> 93060	oxytetracycline	5.0, 9.0 and 1.5 g.L ⁻¹ 5.25 and 4.5 g.L ⁻¹	various organic and inorganic sources	Abou-Zeid et al. (1981)
defatted peanut power	<i>S. rimosus</i> MY02	antifungals	9.37 g.L ⁻¹	defatted soya powder, corn powder, yeast extract, peptone, (NH ₄) ₂ SO ₄ , ammonia	Yu et al. (2008)
corn steep liquor + peanut meal	<i>S. arenae</i>	HA-2-91 antibiotic			Gupte and Naik (1998)
date seed amino acid hydrolysate	<i>S. rimosus</i>	oxytetracycline	4 g.L ⁻¹	urea	Abou-Zeid and Baeshin, (1992)
fodder yeast	<i>S. ambofaciens</i>	spiramycin	6.5 g.L ⁻¹	soybean meal, peptone, Ca(NO ₃) ₂ , NH ₄ NO ₃	Ashy et al. (1982)

Glutamate and glutamine can be synthesized respectively by glutamate dehydrogenase (GDH) and by glutamine synthetase (GS) from ammonium when it is used as nitrogen source. Glutamine can be converted into glutamate and reversely by the GS/glutamate synthase (GOGAT) system (Schreier, 1993; Reitzer, 1996). For the *Streptomyces* species that do not possess the GDH activity (Brana et al., 1986), an alternative pathway consists in the conversion of ammonium into alanine using alanine dehydrogenase (ADH). This amino acid can then be converted into glutamate by alanine transaminase (Novak et al., 1997). All these conversions have been previously summarized by Voelker and Altaba (2001) (Figure I-3).

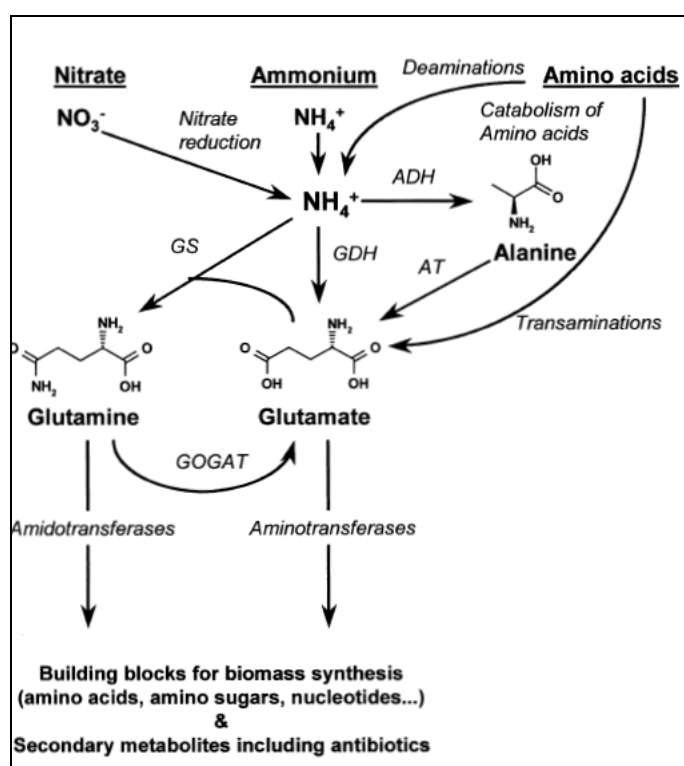


Figure I-3. Interconversion of nitrogenous molecules in the central nitrogen metabolism of *Streptomyces*. GDH, glutamate dehydrogenase; GS, glutamine synthetase; GOGAT, glutamate synthase; ADH, alanine dehydrogenase; AT, alanine transaminase (Voelker and Altaba, 2001).

According to the species, one or several nitrogen assimilating system may be present. In some species such as *Streptomyces venezuelae* (Shapiro and Vining, 1983) and *Streptomyces noursei* (Grafe et al., 1977), all the systems were detected. On the contrary, only GS/GOGAT system and ADH were determined in *S. clavuligerus* (Aharonowitz, 1979; Aharonowitz and

Friedrich, 1980) and in *Streptomyces erythreus*, only GDH and ADH were detected (Roszkowski et al., 1969). In addition, the possible occurrence of two GDH (one NAD-dependent and the second NADP-dependent) and of two GS in many *Streptomyces* species (Behrmann et al., 1990; Kumada et al., 1990) have been shown.

When amino acids are used as nitrogen sources, they can be converted either into ammonium (and the corresponding keto acids) or into glutamate (Figure I-3). The first step in the use of amino acids is the partition of the molecule into the amino group on one side and the carbon backbone on the other side. This can be done either by deamination of the amino acid, yielding free ammonium, or by transfer of the amino group to an acceptor, generally 2-oxoglutarate giving glutamate (Untrau et al., 1994).

In most *Streptomyces*, the preferred nitrogen source is ammonium, which can be easily assimilated through the different pathways mentioned above. As an easily assimilated nitrogen source, ammonia may also act as a repressor for the use of alternative nitrogen sources and, in many cases, can also entail the repression of the antibiotic synthesis (Aharonowitz, 1980; Brana and Demain, 1988; Brana et al., 1985). For few antibiotics, the repression may be caused by other nitrogen sources such as amino acids (Table I-7). Despite a good knowledge of nitrogen sources effects on biomass growth, the actual mechanism responsible for the antibiotic production and the molecular mechanism underlying repression of antibiotic synthesis at high nitrogen concentration are not well known (Rokem et al., 2007).

Nature of nitrogen sources can also affect the morphology of *Streptomyces* (Choi et al., 2000). When amino acid (glutamic acid and aspartic acid) or gluten meal were used as nitrogen source for *S. fradiae*, the big pellets (with a surface higher than $1.2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) represented only 8 % of the different morphological forms whereas this percentage increased up to 70 % with ammonium ions.

Chapitre I. Revue bibliographique

Table I-7. Overview of the interference of various nitrogen sources with antibiotic production in *Streptomyces*.

Antibiotics	Microorganisms	Interfering nitrogen source	Non-interfering nitrogen source	Reference
spiramycin	<i>S. ambofaciens</i>	NH ₄ ⁺	valine, leucine, isoleucine	Lebrihi et al. (1992)
pristinamycins	<i>S. pristinaespiralis</i>	NH ₄ ⁺	glutamate, nitrate	Voelker and Altaba (2001)
tylosin	<i>S. fradiae</i>	NH ₄ ⁺	L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-threonine	Omura et al. (1984)
nystatin	<i>S. noursei</i>	NH ₄ ⁺		Jonsbu et al. (2000)
chloramphenicol	<i>S. venezuelae</i>	NH ₄ ⁺		Shapiro and Vining (1985)
avilamycin	<i>S. viridochromogenes</i>	NH ₄ ⁺		Zhu et al. (2007)
steptonigrine	<i>S. flocculus</i>	NH ₄ ⁺		Wallace et al. (1990)
gilvocarcin	<i>S. arenae</i>	NH ₄ ⁺	aspartic acid, glycine	Byrne and Greenstein (1986)
erythromycin	<i>S. erythreus</i>	NH ₄ ⁺		Flores and Sanchez (1985)
magnamycin	<i>S. halstedii</i>	lysine, alanine	NH ₄ ⁺	Ghonaim et al. (1980)
actinomycin	<i>S. galbus</i>	glutamate, alanine, phenylalanine, valine	isoleucine	Yocheva et al. (2003)
actinorhodin	<i>S. coelicolor</i>	NH ₄ ⁺	nitrate	Hobbs et al. (1990)

1.4.2.1. Regulation of antibiotics production by ammonium ions

The enzymes of nitrogen metabolism are known to be regulated by ammonium ions concentration as well as by the nature of the nitrogen sources. Each enzyme of the nitrogen metabolism is susceptible to be repressed by ammonium. In *S. ambofaciens* RP 18110, GDH and GOGAT are repressed by increasing the ammonium concentration (Lamsaif, 1992). In the same way, in *S. hygrosopicus*, no GDH was measured in the presence of ammonium ions (Chipeva et al., 1991). In *S. clavuligerus*, the GOGAT synthesis was not affected by the nitrogen source. On the contrary, GS was repressed in the presence of ammonium ions (Brana et al., 1986). Conversely, ADH was induced by alanine or by ammonium concentrations higher than 20 mM (Brana et al., 1986).

The presence of ammonium ions in the culture medium generally supports growth but represses or delays the onset of antibiotics production. This phenomenon was shown with *S. hygrosopicus* (Chipeva et al., 1991), *S. pristinaespiralis* (Voelker and Altaba, 2001), *S. noursei* (Jonsbu et al., 2000), *S. flocculus* (Wallace et al., 1990), *S. venezuelae* (Shapiro and Vining, 1984) and *S. erythreus* (Flores and Sanchez, 1985). With these species, the antibiotic production occurred after the exhaustion of ammonium ions.

In *S. ambofaciens*, the addition of ammonium ions severely reduced spiramycin production. An excess in ammonium repressed and even inhibited the activity of valine dehydrogenase, the enzyme responsible for the assimilation of the alternative nitrogen sources that are valine, leucine and isoleucine. The highest spiramycin concentrations were measured when valine and isoleucine were used as nitrogen sources (Lebrihi et al., 1992; Lounes et al., 1995a; Untrau et al., 1994).

Tylosin, a 16-membered macrolide antibiotic produced by *S. fradiae*, comprises the aglycone and the three sugars mycaminose, mycarose and mycinose. The four building blocks are synthesized in separate pathways and assembled in a sequential order. NH_4^+ excess suppressed the synthesis of one precursor of the aglycone whiles other sugar synthesis and final attachment was not affected by NH_4^+ (Tanaka et al., 1985; Lee and Lee, 1993).

In *S. coelicolor* A3 (2), producing both actinorhodin and undecylprodigiosin, the ratio of these two molecules may be influenced by the presence of ammonium ions in the culture medium. Actinorhodin synthesis is very sensitive to ammonium concentration and was completely suppressed in presence of an ammonium chloride concentration as little as 1 mM.

On the contrary, more than 50 mM ammonium chloride was required to prevent undecylprodigiosin production (Hobbs et al., 1990).

In several studies, various ammonia trapping agent ($Mg_3(PO_4)_2$; $Ca_3(PO_4)_2$) have been tested to counteract the effect of ammonium ions. The use of these trapping agents have resulted in a better production of spiramycin by *S. ambofaciens* (Untrau et al., 1994), streptonigrin by *Streptomyces flocculus* (Wallace et al., 1990), tylosin by *S. fradiae* (Masuma et al., 1983), cephalosporin by *S. clavuligerus* (Brana et al., 1985), lincomycin by *Streptomyces lincolensis* (Young et al., 1985) and leucomycin by *Streptomyces kitasatoensis* (Omura et al., 1980).

In some rare cases, the presence of a slight concentration in ammonium ions may favor the antibiotic production. When ammonium chloride was fed slowly throughout the course of cultivation of *S. flocculus* (Wallace et al., 1990), the production phase was prolonged and the final concentration of streptonigrin was increased compared to a batch control containing either the same initial or the same total ammonium chloride levels.

1.4.2.2. Regulation of antibiotics by amino acids

Amino acids are also a very important source of nitrogen for production of antibiotics. Glutamate has been mentioned in several works as an important nitrogen source. Among amino acids, glutamate is preferentially consumed by *S. lividans* (D'Huys et al., 2010). It was shown that the use of amino acid as nitrogen source favored growth as well as pristinamycins production with *S. pristinaespiralis* (Voelker and Altaba, 2001). With the same bacterium, when glutamate and arginine were used as nitrogen sources and glucose as the main carbon source, glutamate was first consumed as carbon and nitrogen source. Then, glucose and arginine were used after the exhaustion of glutamate. The pristinamycins production occurred in arginine limiting conditions (Corvini et al., 2004).

Valine has been shown to be an important nitrogen source as well as a precursor for the production of macrolids such as tylosin and spiramycin (Tang et al., 1994).

The use of an amino acid as nitrogen source may affect the antibiotic production. For example, the influence of fourteen amino acids was determined in the spiramycin production by *S. ambofaciens* (Lamsaif, 1992). As a conclusion of this study, these amino acids were classified into 3 categories:

- two amino acids did not interfere with the production of spiramycin even at high concentration: lysine and isoleucine,
- the use of some amino acids resulted in a high production of spiramycin when their initial concentration was between 25 and 50 mM: valine, threonine, alanine, serine, glycine and glutamate,
- certain amino acids like cysteine, proline and arginine permitted the spiramycin production only at low concentration while one amino acid, threonine, did not allow the antibiotic production at all.

In a similar work, it was demonstrated that the production of methylomycin and actinorhodin by *S. coelicolor* A3 (2) was affected by the nature of the amino acid present in the culture medium as nitrogen source. Both antibiotics were produced in presence of lysine, leucine, valine, glycine, serine, threonine and glutamine, but only methylomycin was produced with histidine and alanine (Hobbs et al., 1992).

1.4.2.3. Regulation of antibiotics by complex nitrogen sources

Generally, at the industrial scale, culture media used for antibiotic production contain complex nitrogen sources such as soybean meal, peptone and yeast extract for example. These sources have been selected to produce high antibiotic concentration which was supposed to be due to slow release of nitrogenous components during the culture course (Voelker and Altaba, 2001). The optimal concentration of some complex nitrogen sources for antibiotics production is shown in Table I-6.

1.4.3. Regulation of antibiotic production by phosphate

The role of inorganic phosphate as a regulator for antibiotic biosynthesis is well known. Its negative effect on the antibiotic production was reported in the 1950's (Perlman and Wagman, 1951; Biffi et al., 1954). On the contrary to inorganic phosphate, phosphate bound to organic compounds generally does not interfere with the antibiotic production (Behal, 2002).

The production of numerous antibiotics starts when the inorganic phosphate concentration in culture medium decreases down to a threshold level. This threshold has been determined in several *Streptomyces*. In the same way, the addition of inorganic phosphate in an antibiotic producing culture, generally results in the stopping of the antibiotic production

(Martin and Demain, 1976). When phosphorous sources are depleted from the medium, the synthesis of enzymes of secondary metabolism is initiated and antibiotic producing phase starts. The tolerance of several antibiotic productions to inorganic phosphate is summarized in Table I-8.

On the basis of the phosphate sensitivity, antibiotics have been classified into three groups by Martin (1977) and Curdova (1989):

1. Antibiotics for which the production is inhibited by less than 1mM phosphate.
2. Antibiotics whom production can tolerate 1 to 10 mM phosphate.
3. Antibiotics that can tolerate more than 10 mM.

Inorganic phosphate can regulate antibiotics production by several mechanisms such as inhibition, repression or ATP availability. Beside the regulation of antibiotics production, phosphate may also influence *Streptomyces* morphology. The morphology of *S. akiyoshiensis* was observed to be dependent on phosphate concentration in the medium. The bacterial aggregation as well as the pellet size increased with the decrease in the phosphate concentration (Glazebrook et al., 1992).

1.4.3.1. Regulation by inhibition or repression of phosphatases

In several antibiotic biosynthetic pathways, biologically inactive phosphorylated intermediates are synthesized. The phosphatases that cleave these intermediates are often regulated via feedback inhibition or repression by inorganic phosphate (Martin and Demain, 1980). Miller and Walker (1970) observed that a phosphorylated derivative of streptomycin was accumulated in cultures of *S. griseus* with an excess of inorganic phosphate. This accumulation was attributed to the repression by inorganic phosphate of the guanidinodeoxy-*scyllo*-inositol phosphate phosphatase (Walker and Walker, 1971).

Inorganic phosphate was also shown to repress or inhibit some alkaline phosphatases involved in the synthesis of viomycin by *Streptomyces vinaceus* (Pass and Bojanowska, 1968), of neomycin by *S. fradiae* (Majumdar and Majumdar, 1971) and of spiramycin by *S. ambofaciens* (Lounes et al., 1996).

Chapitre I. Revue bibliographique

Table I-8. Optimal concentration of inorganic phosphate [Pi] for the production of some antibiotics by various *Streptomyces*.

Antibiotics	Microorganism	[Pi] (mM)	Reference
streptomycin	<i>S. griseus</i>	1.5 - 15	Perlman and Wagman (1951)
novobiocin	<i>S. niveus</i>	9.0 - 40.0	Hoeksema and Smith (1961)
monamycin	<i>S. jamaicensis</i>	0.2 - 0.4	Hall and Hassal (1970)
chlortetracycline	<i>S. aureofaciens</i>	1.0 - 5.0	Hostallek et al. (1969)
oxytetracycline	<i>S. rimosus</i>	2.0 - 10.0	Zygmunt (1964)
vancomycin	<i>S. orientalis</i>	1.0 - 7.0	Mertz and Doolin (1973)
actinomycin	<i>S. antibioticus</i>	1.4 - 17.0	Katz et al. (1958)
tetracycline	<i>S. aureofaciens</i>	0.14 - 0.2	Makarevich et al. (1975)
kanamycin	<i>S. kanamyceticus</i>	2.2 - 5.7	Basak and Majumdar (1973)
cycloheximide	<i>S. griseus</i>	0.05 - 0.5	Abou Zeid (1972)
oleandomycin	<i>S. antibioticus</i>	0.5	Torbochkina et al. (1965)
cephamycin	<i>S. clavuligerus</i>	25	Aharanowitz and Demain (1977)
candicidin	<i>S. griseus</i>	0.5 - 5	Liu et al. (1974)
levorin	<i>S. levoris</i>	0.3 - 4	Belousova et al. (1970)
nystatin	<i>S. noursei</i>	1.6 - 2.2	Tereshin (1976)
avilamycin	<i>S. viridochromogenes</i>	1.0 - 10.0	Zhu et al. (2007)
armentomycin	<i>S. armentosus</i>	0 - 3.0	He et al. (1995)
rapamycin	<i>S. hygroscopicus</i>	5 - 10.0	Cheng et al. (1995)
nanaomycin	<i>S. rosa</i>	< 10	Masuma et al. (1986)
avermectine	<i>S. avermitilis</i>	1.0 - 20	Curdova et al. (1989)
pyrroindomycin	<i>S. rugosporus</i>	0.08 - 2.4	Abbanat et al. (1999)
oleandomycin	<i>S. antibioticus</i>	0.5 - 1.0	Vilches et al. (1990)

1.4.3.2. Regulation by repression of enzymes other than phosphatases

Inorganic phosphate may also repress or inhibit enzymes other than phosphatases. Phosphate represses the biosynthesis of cephamycin synthetase, expandase and clavulanic acid synthetase (Lebrihi et al., 1988; Jhang et al., 1989). The activities of methylmalonyl-coenzyme A carboxyltransferase and propionyl-coenzyme A carboxylase involved in the production of tylosin in *S. fradiae* (Vu-Trong et al., 1981) as well as the anhydrotetracycline oxygenase in the oxytetracycline biosynthetic pathway in *S. rimosus* were repressed by an increased concentration of inorganic phosphate (Behal, 1983).

1.4.3.3. Regulation through ATP pool

There are some evidences that ATP pool is implicated in the regulation of antibiotic synthesis by phosphate. The addition of 10 mM phosphate resulted in an increase of the intracellular ATP level of *S. griseus*. This increase occurred before the inhibition of candicidin synthesis, which was detected 15 min after phosphate addition (Martin and Demain, 1980). Nucleotides have been found to be some inhibitors of the candicidin synthesis in *S. griseus* (Martin, 1977). Their inhibiting effect has been attributed to inorganic phosphate resulting from the cleavage of the nucleotides when they were incorporated by the cells (Martin et al., 1978).

For a few secondary metabolites, it has to be noted that cAMP could reverse the inhibition by inorganic phosphate. This was the case with *S. hygroscopicus* producing turimycin (Gersch et al., 1979; Gersch and Strun, 1980) and *S. fradiae* producing tylosin (Tata and Menawat, 1994). However, inversely, in *S. griseus* inhibition of candicidin formation by phosphate was increased in presence of cAMP (Martin and Demain, 1980).

1.4.4. Effects of ions on growth, antibiotics production and morphology in *Streptomyces*

The presence or the absence of some essential ions can affect the secondary metabolism (Behal, 2002; Masurekar, 2008). The detailed mechanisms of regulations involving ions in growth and antibiotic production are not been completely elucidated to date (Raza et al., 2010). It is generally supposed that some ions could be implicated in the cell wall permeability or as cofactors, could affect some enzyme activities and as a consequence, the antibiotics biosynthesis (Liu et al., 1974).

1.4.4.1. Iron

In *Streptomyces*, iron is required for the production of several antibiotics such as actinomycin, neomycin, streptomycin, cephamycin, viridomycin, mildiomycin and chloramphenicol (Garner et al., 1953, Kishimoto et al., 1996, Kuroban et al., 1987, Weinberg 1978; Weinberg, 1990; Weinberg, 1970). Iron acts as a cofactor for a large number of enzymes. For example, the activity of glutamate dehydrogenase (GDH) and aspartate aminotransferase (AAT) were markedly enhanced with the addition of iron in *Streptomyces rimofaciens* which promoted the production of mildiomycin (Kishimoto et al., 1997). In scarcer cases, iron may also exert a negative effect as on the production of unidentified antibiotics by *Streptomyces albidoflavus* (Narayana and Vijayalakshmi, 2008).

1.4.4.2. Magnesium

As iron, magnesium is a cofactor of several enzymes involved in the production of some antibiotics. Moreover, magnesium ions also act as ammonium ion-trapping agent, thereby eliminating nitrogen catabolite repression and then increasing antibiotic final concentration (Byrne and Greenstein, 1986; Omura et al., 1980). Magnesium ions were shown to stimulate the production of unidentified antibiotics in *S. albidoflavus* (Narayana and Vijayalakshmi, 2008), of candicidin in *S. griseus* (Liu et al., 1974), of streptomycin in *S. griseus* (Garner et al., 1953), of lincomycin in *S. lincolnensis* (Young et al., 1985), of gilvocarcin V in *S. arenae* (Byre and Greenstein, 1986) and of actinomycin in *S. antibioticus* (Mateles and Bassat, 1973). On the contrary, magnesium could reduce final titres of actinorhodin produced by *S. coelicolor* (Abbas and Edward, 1990), of rapamycin by *S. hygrosopicus* (Cheng et al., 1995) and of kanamycin by *S. kanamyceticus* (Basak and Majumdar, 1975).

1.4.4.3. Manganese

Manganese is known to be involved in cell wall synthesis and sporulation. The production of a few antibiotics is improved by the presence of manganese. For example, the production of granaticin by *Streptomyces violaceolatus* was enhanced by the addition of manganese in the culture medium (Mansour et al., 1996).

1.4.4.4. Calcium

Calcium was reported to be benefic for the production of antibiotics by complexing the inorganic phosphate to form insoluble salts (Garnier et al., 1953). However, this role is

controversial. If the addition of calcium allowed a slight increase in the candicidin production by *S. griseus* (Garnier et al., 1953), it had no effect on the production of kanamycin by *S. kanamyceticus* (Basak and Majumdar, 1975) and had a negative influence on the production of actinomycin by *S. antibioticus* (Mateles and Bassat, 1973), of rapamycin by *S. hygrosopicus* (Cheng et al., 1995) and of actinorhodin by *S. coelicolor* (Abbas and Edward, 1990).

1.4.4.5. Other ions

The influence of the addition of several ions has been tested on the production of some antibiotics. These ones are listed in Table I-9.

Table I-9. Influence of ions on the synthesis of various antibiotics in Streptomyces.

antibiotics	Microorganism	effect of ions		references
		Positive	Negative	
AK-111-81	<i>S. hygrosopicus</i>	Cu ²⁺		Gesheva et al. (2003)
FW 99608	<i>Streptomyces sp.</i>	Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺		Jiang et al. (2003)
candicidin	<i>S. griseus</i>	Zn ²⁺	Cu ²⁺ , Co ²⁺	Liu et al. (1974)
kanamycin	<i>S. kanamyceticus</i>		Cu ²⁺ , Co ²⁺	Basak and Majumdar (1975)
actinorhodin	<i>S. coelicolor</i>		Cu ²⁺ , Co ²⁺	Abbas and Edward (1990)
neomycin	<i>S. albidoflavus</i>		Zn ²⁺	Majumdar and Majumdar (1965)
streptomycin	<i>S. griseus</i>		Zn ²⁺	Shaw et al. (1960)
armentomycin	<i>S. armentosus</i>	Cl ⁻ *		He et al. (1995)

*: chloride is incorporated in armentomycin. In excess, chloride ions reduces the production of armentomycin

1.4.4.6. Effects on morphology

Very little information is available in literature about the impact of ions on morphology (Papagianni, 2004). Divalent ions like Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} were observed to induce pellet formation in submerged cultures of *Streptomyces azureus* (Okba et al., 1998). Indeed, cell surfaces bound to these divalent cations may become electrostatically unstable, aggregated and entangled, leading to pelleting (Okba et al., 1998). These results were in accordance with the findings of Braun and Vecht-Lifshitz (1991) who reported that the addition of polycations induced aggregation, whereas polyanions suppressed it. Dobson et al. (2008) have reported antagonistic effects of divalent ions Ca^{2+} and Mg^{2+} on the morphology of *S. hygroscopicus* var. *geldanus*. Moreover, addition of calcium ions in culture medium induced cell aggregation and pelleting whereas dispersed filaments were promoted in magnesium rich medium. On the contrary, Glazebrook et al. (1992) suggested that mineral nutrition was not a critical factor in mycelial aggregation in cultures of *S. akiyoshiensis*.

I.4.5. Overview of molecular mechanisms responsible for the regulation of antibiotic production in *Streptomyces*

The regulation of the antibiotic synthesis at the molecular level has been extensively studied during these last decades. It is a complex mechanism in which cascades of regulators are involved. The precise regulation of the onset of the antibiotic production is performed by a set of global and specific pathway associated regulators. Two different regulatory mechanisms may be considered. The first involves a butyrolactone and its specific receptor which is called butyrolactone receptor protein (BRP). In the second, a two-component system plays the central role (Figure I-4).

1.4.5.1. Regulation involving butyrolactone

In most *Streptomyces*, a nutritional limitation induces the synthesis of butyrolactones. To date, the signal transduction from the nutritional limitation to the butyrolactone synthesis has not been elucidated (Martin and Liras, 2010). When butyrolactones are synthesized, they may interact with a BRP. This interaction may be responsible for several physiological changes including the antibiotic production. For this reason BRP are typically considered as global regulators. BRP are DNA-binding proteins which generally act as repressors of the

antibiotic synthesis. In presence of its specific ligand, the butyrolactone-BRP complex is released from the DNA which allows the onset of the antibiotic production.

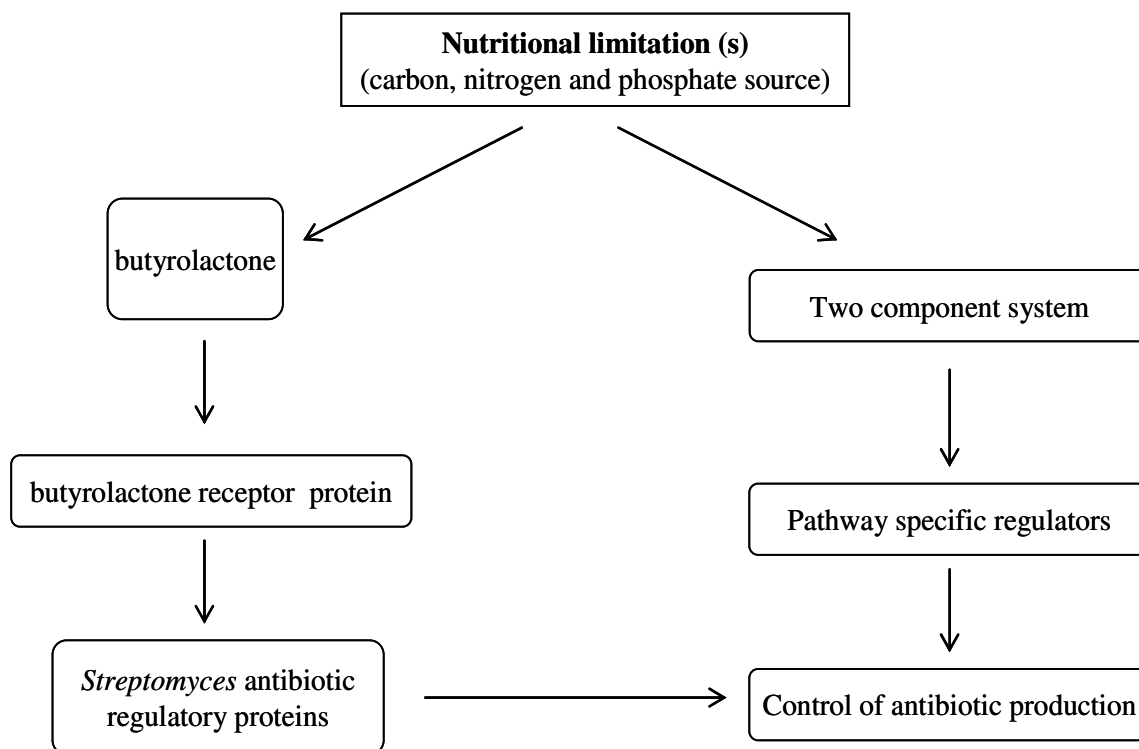


Figure I-4. Overview of the main steps responsible for the control of the onset of antibiotic production in *Streptomyces*.

Interestingly, there is an exception for the production of pristinamycins. A BRP identified in *S. pristinaespiralis*, SpbR, was shown to have a positive influence in the pristinamycins production (Folcher et al., 2001). BRP recognized some DNA sequences located upstream or close to some promoters of regulator encoding genes (Santamarta et al., 2005). Some of these regulators are involved in the regulation of the antibiotic synthesis in *Streptomyces*. They are gathered in a family called *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins (SARP). SARP are pathway specific regulators. They generally act as positive regulators. Their fixation, upstream the antibiotic biosynthetic genes, was necessary to allow the transcription of these genes in several clusters identified in *Streptomyces* such as in *S. clavuligerus* (Santamarta et al., 2002) and in *S. coelicolor* (Arias et al., 1999). Other pathway-specific regulator families have been identified in *Streptomyces*. For example, the LAL family

(large ATP-binding regulators of the LuxR family) may also be involved in the production of some antibiotics (Bibb, 2005).

1.4.5.2. Regulation involving two-component system

Two-component systems typically consist in one membrane bound protein that senses an environmental change and a corresponding regulator that mediates the micro-organism physiological response. In *Streptomyces*, one of the most studied two-component system involved in the antibiotic synthesis is the PhoP-PhoR system. In this system, PhoR, the membrane bound moiety responds to the change in inorganic phosphate extracellular concentration. The phosphate starvation induces a self-phosphorylation of PhoR which then transfers its phosphate group to the dephosphorylated form of PhoP. In this conformation, PhoP, which is a DNA binding protein, can bind to specific sequences, the PHO boxes. These ones are located in the promoter region of specific regulators or, more rarely, of antibiotic biosynthetic genes. The PhoP-PhoR systems are classified as global regulatory systems. It generally exerts a negative regulation on the antibiotic synthesis (Martin and Liras, 2010).

I.5. Bioreactor hydrodynamics and its effects on the physiology of *Streptomyces* cultures

I.5.1. Hydrodynamics description

Hydrodynamics of sparged and mixed bioreactors is still a major subject of discussion in literature. Most of the systems used operate in turbulent flow, especially at the larger scale. However, for small-scaled systems (culture volume inferior to a few liters), at lower agitation rates or with highly viscous broths, the transitional regime may be obtained. For microbial cultures, hydrodynamics complexity arises from both the turbulence generated by the impeller and from the gas phase flow (description of the bubble size distribution). The methods used today for the description of mixed reactors (with or without gas) are mainly Computational Fluid Dynamics (Delafosse et al., 2009; Mehmood et al., 2010) and Particle Image Velocimetry measurements (Huchet et al., 2009).

For bioreactor scale-up and operation, the power dissipation per unit of volume P / V ($\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$) is generally used for convenience. Sometimes, the turbulent dissipation rate $\langle \varepsilon \rangle$ ($\text{W}\cdot\text{kg}^{-1}$) could be preferred. These global parameters are known to be related to many

physical phenomena taking place in the bioreactor such as oxygen supply, carbon dioxide removal, macro- and micro-mixing, turbulence intensity, liquid phase homogeneity and hydrodynamic stress.

1.5.1.1. *Macro-mixing*

For fed-batch, pH regulated and aerated cultures, macro-mixing performance is quantified by the mixing time. For a given culture system, an increase in power dissipation is known to promote lower mixing times.

1.5.1.2. *Micro-mixing*

At the micro-scale, turbulent mixing is characterized by the Kolmogorov scale l_K and by the Batchelor scale l_B which are both related to the turbulent dissipation rate by :

$$l_K = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{0.25} \quad l_B = \left(\frac{D_{diff}^2 \nu}{\varepsilon} \right)^{0.25} \quad (I-1)$$

with ν ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) the kinematic viscosity and D_{diff} ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) the diffusivity of the molecule studied. In a homogeneous, isotropic turbulence, the Kolmogorov scale states for the dissipation scale. Under this scale, turbulent eddies can no more develop and are dissipated by viscous forces. Under the Batchelor scale, mixing is performed by diffusion only.

1.5.1.3. *Nutriments transfer.*

The mass transfer flux J ($\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$) at the biocatalysts interface is related to microorganism external area A (m^2), bulk and interfacial nutrient concentrations C_b and C_i ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$) and mass transfer coefficient k ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) by:

$$J = kA(C_b - C_i) \quad (I-2)$$

Even if the measurement of the bulk concentration is quite easy, the knowledge of the interfacial concentration is much harder. This implies that, despite a non-zero bulk concentration, nutrient limitation may occur if interfacial concentration falls to zero. On the basis of a physical approach, with filamentous micro-organisms, power dissipation is expected to influence mass flux transfer by a change of pellet diameter or of the mass transfer coefficient. Mass transfer coefficient can be related to the particle relative velocity u_{LS} using general correlations between Sherwood (Sh), Reynolds (Re) and Schmidt numbers (Sc).

$$\text{Sh} = f(\text{Re}, \text{Pr}) \quad \text{Sh} = \frac{kd_p}{D_{\text{diff}}} \quad \text{Re} = \frac{\rho_L u_{LS} d_p}{\mu} \quad \text{Sc} = \frac{\mu}{\rho D_{\text{diff}}} \quad (\text{I-3})$$

where d_p is diameter of pellet (m), μ is the dynamic viscosity of the liquid (Pa.s), D_{diff} ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) is the molecule diffusivity in the culture medium and ρ is the density of the liquid ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$). For biocatalysts smaller than the Kolmogorov scale ($l_K < d_p$), it can be considered that a diffusion layer of size l_K circles the microorganism (Morchain, 2009).

When filamentous or specially pelleted structures are encountered, transfer of nutriment inside the core is mainly governed by diffusion. Mass transfer is then related to the Fick's diffusion law:

$$\mathbf{j} = -D_{\text{diff},p} \cdot \mathbf{grad}(C) \quad (\text{I-4})$$

where \mathbf{j} is the mass flux ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), $D_{\text{diff},p}$ is the molecule diffusivity inside the pellet ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Moreover, data concerning diffusion coefficients inside pellets are rare in literature. Inside *A. niger* pellets, Hille et al. (2005) showed that the diffusion coefficients are sensibly different from the coefficients outside the pellets.

It should be noted that, theoretically, it seems quite difficult to decouple a nutritional effect investigation from bioreactor hydrodynamics as the mass flux to the biocatalyst depends on local flow.

1.5.1.4. Oxygen transfer

Because oxygen is only sparingly soluble in culture medium and in liquids in general, ensuring a sufficient oxygen transfer to *Streptomyces* is critical. Oxygen supply to liquid phase and mass transfer of oxygen to growing microbial cells can raise major technical problems affecting microbial productivity. For filamentous microorganisms, broths may exhibit a non-Newtonian rheology which increases the complexity of the oxygen mass transfer description. Mixing intensification is often chosen to enhance oxygen transfer (Makagiansar et al., 1993). Most microbial cultures have relatively high respiration rates and the k_{La} values are typically in the range 100 – 1000 h^{-1} . The quantification of oxygen transfer in microbial culture is generally described in terms of dissolved oxygen concentration (DOC), gas-liquid mass transfer coefficient (k_{La}), oxygen transfer rate (OTR) or oxygen uptake rate

(OUR). The relationship between hydrodynamic parameters, DOC, $k_L a$ and OTR has been summarized by Garcia-Ochoa et al. (2009) (Figure I-5).

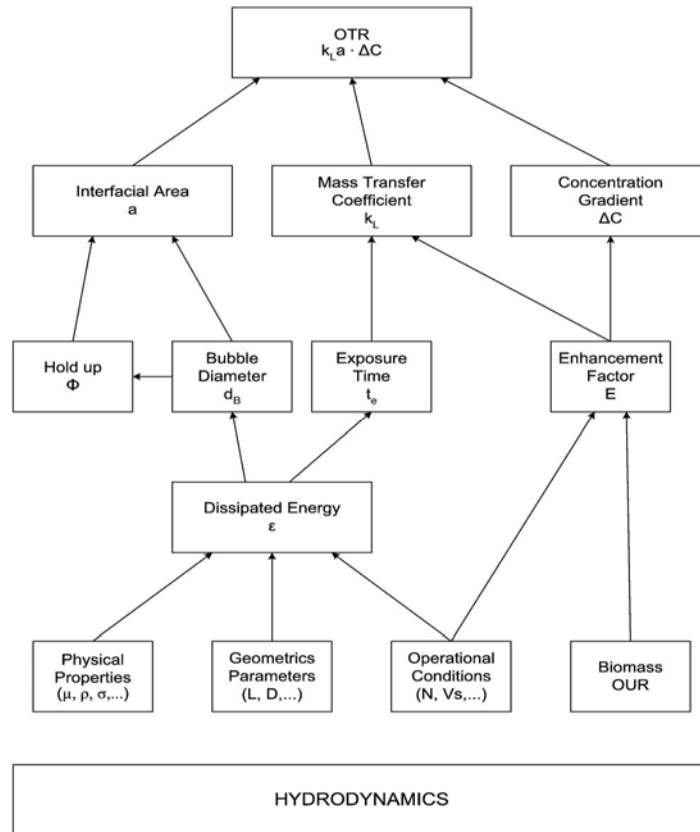


Figure I-5 Relationships between hydrodynamic parameters, gas-liquid mass transfer coefficient ($k_L a$), oxygen transfer rate (OTR) and dissolved oxygen concentration (DOC) (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009).

During aerobic bioprocesses, oxygen is transferred from a rising gas bubble into a liquid phase and ultimately to the site of oxidative reaction inside the cell. The transport of oxygen from air bubbles to the cells may be described into several steps characterized by specific transfer resistances, as shown in Figure I-6.

Oxygen is transferred successively in three “phases”:

- i. Gas phase (bulk, film)
- ii. Liquid phase (film, bulk, film)
- iii. Microbial phase (film + pellet core)

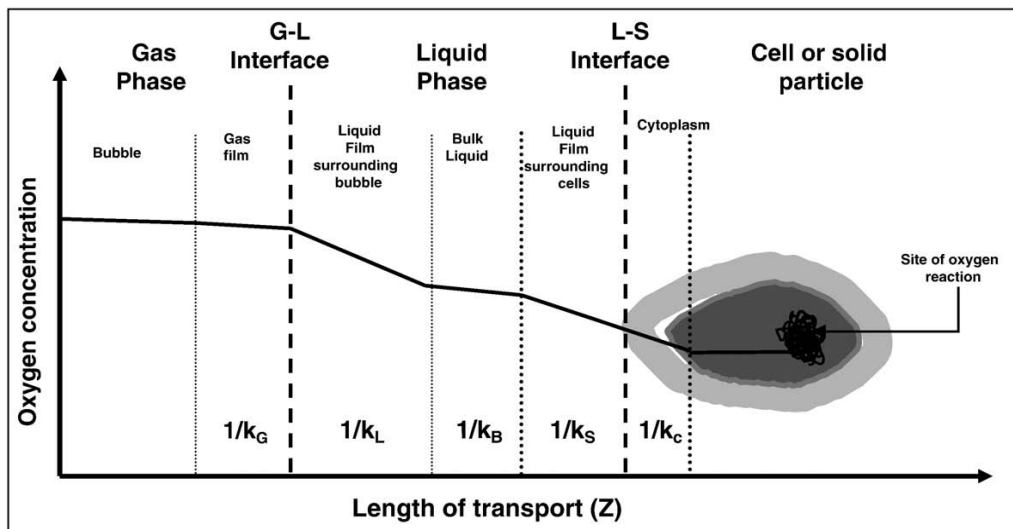


Figure I-6. Different steps involved in oxygen transfer from the gas bubble to the cell or the site of oxygen reaction (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009).

In the first phase the oxygen of the bubble is transferred to the gas film. The gas moves towards gas-liquid interface and then to bulk liquid and liquid around the cell. Finally, the oxygen is transported to the liquid-cell interface and finally transferred inside the pellet or the clump and then to the cytoplasm of cell for biochemical reaction. The liquid film resistances around bubbles usually control the overall transfer rate outside the microbial pellet (Garcia-Ochoa et al., 2009). Nevertheless, for microbial pellets and filamentous clumps, transfer of oxygen in the pellet core can be considered as a limiting step too.

Beside nutrients regulation, the production of antibiotics is strongly affected by the DOC. Indeed, the DOC can affect the growth, concentration of antibiotics, induction of antibiotic synthesis, enzyme activities as well as morphology of *Streptomyces* as detailed in paragraph I.5.3.

For bubbly systems, interfacial transfer takes place at the bubble interface while for surface-aerated reactors like shaking flasks, gas-liquid mass transfer takes place at the gas-liquid free surface. In both cases, the volumetric mass transfer coefficient k_La can be related to power dissipation or mixing. For mixed and sparged reactors, an estimation of k_La can be given by the general equation of Van't Riet:

$$k_L a = A \left(\frac{P}{V} \right)^\alpha U_g^\beta \quad (\text{I-5})$$

with A , α and β constants depending on bioreactor design and physico-chemical properties of the culture medium and U_g ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) the superficial gas velocity. For shaking flasks and low-viscosity media, $k_L a$ is given by Maier (2002):

$$k_L a = 6.67 \cdot 10^{-6} N^{1.16} V_L^{-0.83} d_0^{0.38} d^{1.92} \quad (\text{I-6})$$

where $k_L a$ is the volumetric gas-liquid mass transfer coefficient (s^{-1}), N the shaking frequency (min^{-1}), V_L (mL) the filling volume, d_0 (cm) the shaking diameter and d (cm) the maximum shake flask diameter.

The oxygen transfer rate (OTR) is then given by:

$$OTR = k_L a ([O_2]^* - [O_2]) \quad (\text{I-7})$$

Secondly, oxygen transfer takes place in the vicinity of the microorganism-liquid interface. This transfer may be quantified by similar relations to nutriment transfer (I-2, I-4). Thus, the same conclusions regarding effects of power dissipation on oxygen transfer at the microorganism interface can be transposed to oxygen (see paragraph I.5.1.3).

1.5.1.5. Hydrodynamic stress

Interactions between bioreactor hydrodynamics, turbulence and biocatalysts, which are abusively called 'shear stress', have been generally less studied than nutritional stress. When cultured in bioreactors, *Streptomyces* can exhibit various morphological forms as described in paragraph I.2. The relationships between *Streptomyces* morphology and reactor hydrodynamics is particularly complex. Indeed:

- A change of hydrodynamics can promote cellular shocks and thus possibly clumps interconnections, aggregations and formation of larger clumps or pellet.
- An increase in power dissipation is expected to entail a decrease of pellet diameters due to tangential and normal hydrodynamic stress.
- Depending on the pellet or hyphae size d_p , the microorganisms state either in the inertial ($l_K < d_p$) or in the viscous subrange of turbulence ($d_p < l_K$).

Detailed description of the hydrodynamic stress affecting particles in a turbulent fluid flow can be found in Bouyer et al. (2005), Barbouche (2008) and Douaire (2010).

I.5.2. Mixing effects

The intensity of the agitation applied during fermentation may have an impact on

- Growth rate and product synthesis,
- metabolism through transport of nutrients and enzyme activities,
- cell damage,
- morphology,
- DOC,
- broth viscosity in the case of a non-Newtonian rheology.

The intercorrelation between these parameters is summarized in Figure I-7. The production of many secondary metabolites produced by *Streptomyces* may be affected by agitation intensity and thus power dissipation. For each of these metabolites, an optimal agitation level seems to exist but, in aerobic submerged fermentations, literature reports on the physiological response to mixing effects only, remain ambiguous.

1.5.2.1. Effects of agitation intensity on growth

The increase in agitation velocities globally promoted higher *Streptomyces* biomass concentrations (Tough and Prosser, 1996). Mehmood et al. (2010) and El-Enshasy et al. (2000) reported that an increase in power dissipation promoted a higher biomass concentration with *S. pristinaespiralis* and *S. natalensis*, respectively, in shaking flasks. On the contrary, in *S. clavuligerus*, the overall biomass yield reduced, when the gassed power input was set above 1.1, 1.7, or 2.0 kW.m⁻³ (Roubos et al., 2001) or when the tip speed was above 2.83 m s⁻¹ (Large et al., 1998). The high agitation speeds at the initial stage of fermentation also inhibited the cell growth of *Streptomyces sp.* P6621-RS1726 (Okabe et al., 1992).

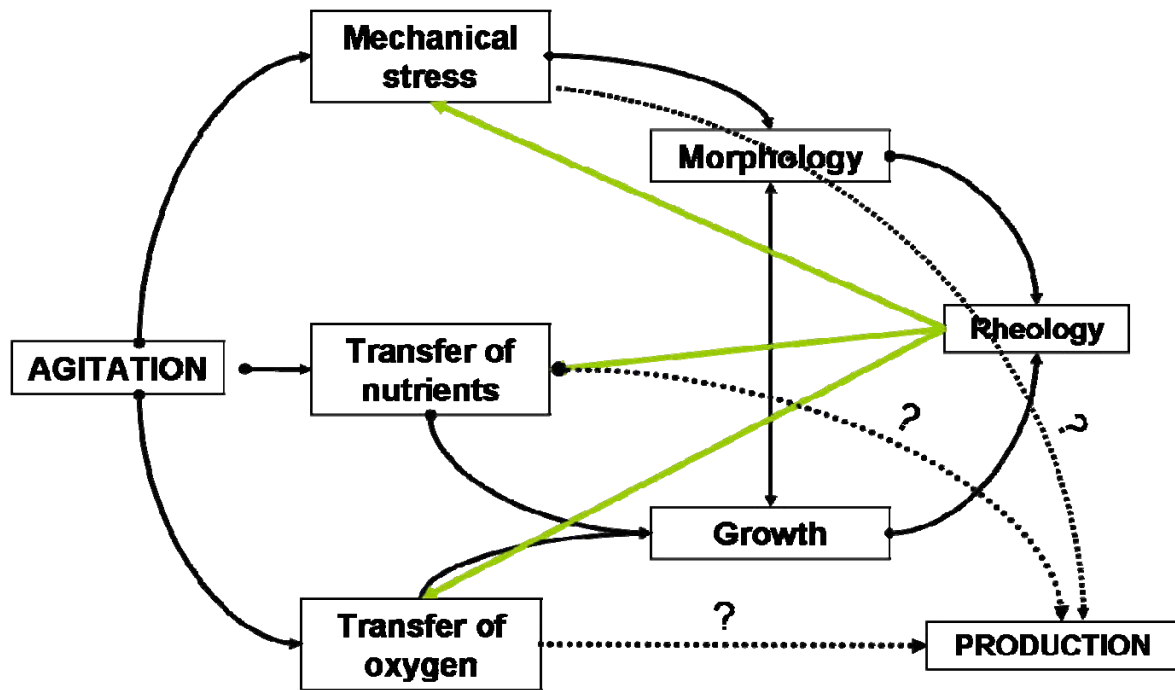


Figure I-7. Coupling between phenomena related to bioreactor hydrodynamics.

1.5.2.2. *Effects of agitation intensity on substrates consumption*

The increase in agitation can also affect the consumption of substrates. The increase in power dissipation resulted in faster consumption of oil in *S. fradiae* (Ohta et al., 1995) while this effect was less marked for lipid consumption in *S. clavuligerus* (Large et al., 1998).

1.5.2.3. *Effects of agitation intensity on antibiotics production*

The increase in agitation is known to modulate the production of antibiotics but the results referenced in literature do not permit to draw a general trend. Rosa et al. (2004) have reported that the production of clavulanic acid increased with stirrer speed using *S. clavuligerus* but this was not observed by Belmer-Beiny and Thomas (1990). It was concluded that agitation speed affected the virginiamycin production in *S. virginiae* independently of dissolved oxygen level (Shioya et al., 1999). Natamycin production was multiplied by a factor 7 between 50 rpm and 250 rpm (El-Enshasy et al., 2000) but this was limited to intermediate dissipations. Indeed, an inverse trend has been reported for the highest power dissipations by Ohta et al. (1995) by testing various agitation speeds from 200 to 800 rpm on the production of neomycin by *S. fradiae* in stirred bioreactor. The neomycin

concentration increased up to 600 rpm while thereafter the concentration of antibiotic sensibly decreased.

1.5.2.4. Cell damage

Although agitation is beneficial in most sparged bioreactors, excessive agitation may cause an inhibition of microbial growth, metabolism and an alteration of morphology generally termed as turbohypobiosis. Turbohypobiosis state is the interaction of a medium flow with living cells and depends upon the bioreactor hydrodynamics (Rikamanis et al., 2007). Turbohypobiosis should be considered in the design and operation of bioreactors because it can lead to decreased productivity (Toma et al., 1991). Intense agitation can cause hyphae breaking into fragments and is likely to result in the formation of short, branched hyphae and in some cases the release of intracellular substances. Under mild agitation conditions, on the other hand, the individual hyphae tend to become longer and less branched.

For the dispersed form of filamentous micro-organisms, the independent effects of agitation are difficult to quantify as it is coupled with various other parameters (Figure I-7). In many cases improved microbial growth due to improved oxygen transfer is claimed as a positive effect of agitation and also possibly compensating shear damage. The effect of mechanical agitation on cell growth is hard to describe in culture media due to the possible presence of additives and toxic compounds which can affect cell wall strength, and hence the susceptibility of cells to rupture (Ayazi-Shamlou et al., 1994). An understanding of how mixing affects mycelial morphology and productivity would be valuable in optimizing the design and operation of large-scale fermentations for the production of antibiotics and other metabolites (Amanullah et al., 2000). Cell damage study is a hard task as:

- Microorganisms exposed to high stresses and possibly damaged may recover their metabolic activity. This ability to recover will depend on the level of damage and of the recovery rate;
- the exposure to a high shear zone will not necessarily cause instantaneous damage but so will the chronic exposure to those high stresses;
- the age of the cell, generally quantified by its instantaneous growth rate, impacts cell resistance.

High energy input promotes small, smooth and compact pellets, while under low stress, pellets are larger and more hairy (Bellgardt, 1998; Tough and Prosser, 1996). Stress of pellets

via collision or interaction with impeller can cause fragmentation of aggregates and finally pellet break up and dispersion. Pellets normally do not form in bioreactors because of the high aeration and vigorous agitation, and dispersed mycelial growth is usually the predominant form (Whitaker, 1992). Conversely, in shaking flask cultures, maximal shear levels are lower, promoting the development of pellet morphology. Kahar et al. (2002) have reported that at high power dissipation (8.0 kW.m^{-3}), the morphology of *S. albulus* changed from the pellet to the filamentous form due to the extensive shear stress. Tamura et al. (1997) have studied the effects of various agitation rate ($N = 250, 400, 550, 700$ and 900 rpm) in stirred bioreactor on the forms of *S. fradiae* morphology during a culture. These cultures were then compared with cultures operated in an airlift bioreactor. At 900 rpm , the microorganism was mainly in the form of filament and entangled filaments while at 400 rpm , the respective morphology proportions of filamentous, entangled filaments and pellets evolved during the culture till 13, 47 and 40 %, respectively. On the other hand, in the air-lift reactor, the pellet ratio in the airlift reactor increased to 80 % after 160 h of culture. Under the low shear conditions of the air-lift reactor, the pellet area was 100 times larger than under high shear conditions.

Most of the studies found in the literature are dedicated to fungal pellets, which are bigger than *Streptomyces* pellets. Clumps diameters were found to be mainly determined by interactions between fluid eddies and hyphae. Rocha-Valdez et al. (2007) found that, during their cultures in bioreactors, *Trichoderma harzianum* pellets remained in the viscous subrange and proposed the following correlation between pellet diameter and Kolmogorov scale:

$$d_p = 0.53l_K + 109.5 \quad (\text{I-8})$$

I.5.3. Oxygen transfer

I.5.3.1. Effect of oxygen transfer on biomass growth

Increased DOC resulted in better growth in *S. globisporus* S186 (Liu et al., 2000), *S. virginiae* (Shioya et al., 1999), *S. parvulus* (Kaiser et al., 1994) and *S. griseoflavus* (Dick et al., 1994). Chen and Wild (1991) observed that cellular growth rates of *S. fradiae* were severely reduced when DOC fell below 25 % of air saturation, but these rates resumed to initial rates when DOC was raised back to saturation. On the contrary, Rollins et al. (1988) reported that a DOC at either 50 % or 100 % of air saturation had no impact on the specific growth rate of *S. clavuligerus*. The DOC also affected the morphology of *Streptomyces*. High

DOC promoted pellet morphology while filamentous form was dominant at low DOC (Vecht-Lifshitz et al., 1990; Braun and Vecht-Lifshitz, 1991; Cui et al., 1997; Yin et al., 2008).

1.5.3.2. Effect of oxygen transfer on antibiotics production

Studies that are dedicated to the effects of DOC on the concentration of antibiotics show that higher DOC generally promotes an enhanced production (see the examples given in Table I-10).

1.5.3.3. Mechanisms linking oxygen transfer and antibiotic production

Various studies indicate that DOC plays an important role in regulating the activities of the biosynthetic enzymes and thus possibly affects antibiotic production (Ozergin-Ulgen and Mavituna, 1998). In *S. clavuligerus*, the specific activities of deacetoxycephalosporin C synthase and isopenicillin N synthase, two enzymes of the cephamycin C biosynthetic pathway, increased 2.3 and 1.3 times respectively, when the DOC was maintained at 100 % of air saturation in the cultures (Rollins et al., 1991). On the contrary, DOC had no effect on the formation of L- α -aminoadipyl-L-cysteine-D-valine (ACV) synthetase, which is the first enzyme in the biosynthetic pathway for all natural penicillins and cephalosporins (Zhang and Demain, 1991).

Besides studies showing the effects of DOC on antibiotics titer, very few studies have correlated the onset of antibiotic production with DOC. Clark et al. (1995) have observed that erythromycin could be produced in both oxygen limiting and non-limiting conditions by *Saccharopolyspora erythraea*, while vancomycin was only produced in oxygen-sufficient cultures of *Amycolatopsis orientalis*. However, when *A. orientalis* was transferred from limiting to non-limiting oxygen conditions, production of vancomycin still occurred, indicating that the biosynthetic enzymes necessary for the synthesis of antibiotics were even present in oxygen limiting conditions (Dunstan et al., 2000). The authors suggested that, at low oxygen condition, the oxygen was preferentially transferred for biomass biosynthesis and no oxygen was remaining for antibiotic biosynthesis. The lack of oxygen under these conditions may also have prevented the induction of the enzymes needed for the final biosynthetic steps.

Chapitre I. Revue bibliographique

Table I-10. Effects of DOC on antibiotic production by various *Streptomyces*.

Antibiotics	Microorganism	Conditions of oxygen transfer tested	Effects on growth and production	References
ratamycin	<i>S. olindensis</i>	dissolved oxygen was controlled at 100 % of air saturation during the growth phase compared to experiments without DOC control	Two-fold increase of ratamycin concentration	Martins et al. (2004)
virginiamycin	<i>S. virginiae</i>	DOC varying between 10 and 80 % of air saturation	Linear increase of antibiotic concentration	Shioya et al. (1999)
cephamycin C	<i>S. clavuligerus</i>	DOC controlled at air saturation 100 % during growth phase	3 fold increase in the maximum cephamycin C	Yegneswaran and Gray (1991)
chlortetracycline	<i>S. aureofaciens</i>	increase in the level of aeration	Progressive increase in chlortetracycline yield	Jensen et al. (1966)
tylosin and macrosin	<i>S. fradiae</i>	increased aeration	Increased yields of tylosin and macrosin	Chen and Wilde (1991)
avermectin	<i>S. avermitilis</i>	DOC below 20 % of the saturation	Dramatic reduction of production	Magolo et al. (1991)
cephalosporin C	<i>S. clavuligerus</i>	reduced oxygen (air plus N ₂ in the inlet gas)	The antibiotic concentration remained stable when air was used to supply oxygen. However, under reduced oxygen concentration antibiotic concentration dropped to one third of its highest value.	Yegneswaran et al. (1988)
cephamycin C	<i>S. clavuligerus</i>	DOC dropped to almost zero	Delay of the onset of production and the lowered Cephamycin C concentration	Rollins et al. (1988)
cephamycin C and capreomycin	<i>S. tendae</i>	critical DOC required for the production		Feren and Squires (1969)
mutanolysin	<i>S. globisporus</i> S186	critical DOC required for the production		Liu et al. (2000)
tylosin	<i>S. fradiae</i>			Chen et al. (1991)

To improve the oxygen solubility and thus oxygen transfer in the fermentation medium, various oxygen carriers such as perfluorocarbon (PFC) have been tested. Elibol and Mavituna (1998) and Elibol and Mavituna (1995) reported that by adding PFC, the oxygen transfer capacities of fermentation medium sensibly increased. In these experiments 10 to 50 % of PFC were added and tested on the actinorhodin production by *S.coelicolor*. The inclusion of 50 % (v/v) PFC in the fermentation medium has improved the dissolved oxygen profile and resulted in a five-fold increase in the maximum actinorhodin concentration as well as remarkable increases in glucose and oxygen consumption rates. Actinorhodin concentrations were linearly related to the volumetric oxygen uptake rates.

1.5.3.4. Oxygen uptake rate (OUR) of *Streptomyces* cultures

In the literature, the information concerning the oxygen uptake rate of *Streptomyces* cultures is scarce despite the industrial significance of these bacteria. Ozergin-Ulgen and Mavituna (1998) have reported that the OUR of *S. coelicolor* producing actinorhodin was in the range of 5 to 6 mmol.L⁻¹.h⁻¹ during the growth phase. The maximum specific OUR was 7.44 mmol.g⁻¹.h⁻¹, the specific oxygen maintenance demand was 1.88 mmol O₂.g⁻¹.h⁻¹. The OUR of *S. alboniger* was reported as 14.5 mmol.L⁻¹.h⁻¹ (Jensen et al., 1966). The specific OUR of *S. aureofaciens* (Jensen et al., 1966) was between 2 and 3 mmol.g⁻¹.h⁻¹, that of *S. clavuligerus* was 10 mmol.g⁻¹.h⁻¹ (Yegneswaran et al., 1991) and that of *S. lividans* was 0.09 mmol.g⁻¹.h⁻¹ (Magnolo et al., 1991).

1.6. Conclusion

Today, industrial cultures of *Streptomyces* still play a major role regarding key medical use of antibiotics. Different process parameters like medium composition, temperature, pH and hydrodynamics can affect mass transfer, mixing performance, oxygen transfer, heat transfer, morphology, growth, rheology and ultimately antibiotics production. The physiological response to these various parameters is strain-dependent, which may hard the proposal of general laws concerning optimal process parameters. It is thus quite difficult to optimize fermentation medium without a good knowledge of the antibiotics structure, of the precursors required for antibiotics synthesis as well as of the physiology and of the morphology of the *Streptomyces* strain used. While numerous works have been dedicated to the effects of nutritional “stress” on the production of antibiotics, very few works have correlated hydrodynamic stresses with antibiotic production although those two stresses are

strongly coupled in bioreactors. The impact of hydrodynamic stresses on morphology and production of antibiotics as well as optimum levels of oxygen transfer rate, gas-liquid mass transfer coefficient required for the production of antibiotics are still missing in literature. A better description of the coupling between hydrodynamic stress, morphology, and mass transfer encountered in *Streptomyces* cultures appears thus as a pre-requisite to a better description of antibiotics synthesis in bioreactors.

I.7. References

- Abbas AS, Edwards C. 1990. Effects of metals on *Streptomyces coelicolor* growth and actinorhodin production. Appl. Environ. Microbiol. 56(3):675-680.
- Abou Zeid AZ. 1972. Production of cycloheximide by *Streptomyces* sp. Acta microbiologica Polonica. Series B: Microbiologia applicata 4(2):83-88.
- Abou-Zeid AA, El-Diwany AI, Shaker HM, Salem HM. 1981. Role of nitrogen sources in fermentative production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus* 93060. Agricultural Wastes 3(4):257-265.
- Abou-Zeid AZA, Baeshin NA. 1992. Utilization of date seed lipid and hydrolysate in the fermentative formation of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. Bioresour. Technol. 41(1):41-43.
- Aharonowitz Y, Demain AL. 1977. Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. Arch. Microbiol. 115(2):169-173.
- Aharonowitz Y, Demain AL. 1978. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents Chemother. 14(2):159-164.
- Aharonowitz Y, Demain AL. 1979. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol. 25(1):61-67.
- Aharonowitz Y, Friedrich CG. 1980. Alanine dehydrogenase of the β -lactam antibiotic producer *Streptomyces clavuligerus*. Arch. Microbiol. 125(1-2):137-142.
- Aharonowitz Y. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. Annu. Rev. Microbiol. 34:209-233.
- Amanullah A, Justen P, Davies A, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. Biochem. Eng. J. 5(2):109-114.
- Arias P, Fernandez-Moreno MA, Malpartida F. 1999. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. J. Bacteriol. 181(22):6958-6968.
- Ashy MA, Abou-Zeid AA, El-Diwany AI, Gad MR. 1982. Fermentative production of spiramycins. Enzyme Microb. Technol. 4(1):20-24.
- Atkinson DE, Walton GM. 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. J. Biol. Chem. 242(13):3239-3241.
- Ayazi Shamlou P, Makagiansar HY, Ison AP, Lilly MD, Thomas CR. 1994. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. Chem. Eng. Sci. 49(16):2621-2631.

Chapitre I. Revue bibliographique

- Bandyopadhyay SK, Majumdar SK. 1974. Regulation of the formation of alkaline phosphatase during neomycin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5(4):431-434.
- Barbouche N. 2008. Réponse biologique de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques: simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire. PhD thesis. Nancy-Université, Nancy, France.
- Basak K, Majumdar SK. 1973. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4(1):6-10.
- Basak K, Majumdar SK. 1975. Mineral nutrition of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8(4):391-395.
- Behal V, Neuzil J, Hostalek Z. 1983. Effect of tetracycline derivatives and some cations on the activity of anhydrotetracycline oxygenase. *Biotechnol. Lett.* 5(8):537-542.
- Behal V. 2002. Antibiotics. *Biotechnology Annual Review.* p 227-265.
- Behrman I, Hillemann D, Puhler A, Strauch E, Wohlleben W. 1990. Overexpression of a *Streptomyces viridochromogenes* gene (*glnII*) encoding a glutamine synthetase similar to those of eucaryotes confers resistance against the antibiotic phosphinothricyl-alanyl-alanine. *J. Bacteriol.* 172(9):5326-5334.
- Bellgardt KH. 1998. Process models for production of beta-lactam antibiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 60:153-194.
- Belmar-Beiny MT, Thomas CR. 1991. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: Effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 37(5):456-462.
- Belousova II, Lishnevskaja EB, Elgart RE, Tereshin IM. 1970. Comparative study of synthesis of levorin and fatty acids by the mycelium of *Actinomyces levoris* Krass 26-I during its growth in native solutions of different times of fermentation. *Antibiotiki.* 15(9):779-782.
- Berdy J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J Antibiot* 58(1):1-26.
- Bhatnagar RK, Doull JL, Vining LC. 1988. Role of the carbon source in regulating chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae*: studies in batch and continuous cultures. *Can. J. Microbiol.* 34(11):1217-1223.
- Bhattacharyya BK, Pal SC, Sen SK. 1998. Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1.5. Cultural effect. *Rev. Microbiol.* 29(3):167-169.
- Bhattacharyya BK, Sen SK. 2002. Ester antibiotic accumulation by *Streptomyces hygroscopicus*. *New Microbiol.* 25(4):477-484.
- Bibb MJ. 2005. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* 8(2):208-215.
- Biffi G, Boretti G, Di Marco A, Pennella P. 1954. Metabolic behavior and chlortetracycline production by *Streptomyces aureofaciens* in liquid culture. *Appl. Microbiol.* 2(5):288-293.
- Bouyer D, Coufort C, Line A, Do-Quang Z. 2005. Experimental analysis of floc size distributions in a 1-L jar under different hydrodynamics and physicochemical conditions. *J. Colloid Interface Sci.* 292(2):413-428.
- Brana AF, Demain AL. 1988. Nitrogen control of antibiotic biosynthesis in actinomycetes. *Nitrogen Source Control of Microbial Processes*: Edited by S. Sanchez-Esquivel. Boca Raton, FL: CRC Press. p 99-119.
- Brana AF, Paiva N, Demain AL. 1986. Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Gen. Microbiol.* 132(5):1305-1317.

- Brana AF, Wolfe S, Demain AL. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol. 31(8):736-743.
- Braun S, Vecht-Lifshitz SE. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. Trends Biotechnol. 9(2):63-68.
- Brown DD, Hitchcock MJM, Katz E. 1980. Evidence for a constitutive and inducible form of kynurenine formamidase in an actinomycin-producing strain of *Streptomyces parvulus*. Arch. Biochem. Biophys. 202(1):18-22.
- Bulchandani BD, Parvateesam M. 2007. Antibiotic production by *Streptomyces* sp. and influence of various C and N sources on its production. Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci. 9(1):123-128.
- Byrne KM, Greenstein M. 1986. Nitrogen repression of gilvocarcin V production in *Streptomyces arenae* 2064. J. Antibiot. 39(4):594-599.
- Bystrykh LV, Fernandez-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA, Dijkhuizen L. 1996. Production of actinorhodin-related blue pigments by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). J. Bacteriol. 178(8):2238-2244.
- Cai P, Kong F, Fink P, Ruppen ME, Williamson RT, Keiko T. 2007. Polyene antibiotics from *Streptomyces mediocidicus*. J. Nat. Prod. 70(2):215-219.
- Castro JM, Liras P, Cortes J, Martín JF. 1985. Regulation of α -aminoadipyl-cysteinyl-valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in *Streptomyces lactamdurans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22(1):32-40.
- Charles M. 1985. Fermentation design and scale-up. In: Moo-Young M (ed) Comprehensive biotechnology, vol. 2. Pergamon Press, Oxford. 57-75 p.
- Chattopadhyay D, Sen SK. 1997. Optimisation of cultural conditions for antifungal antibiotic accumulation by *Streptomyces rochei* G164. Hindustan Antibiot. Bull. 39(1-4):64-71.
- Chen C, Si S, He Q, Xu H, Lu M, Xie Y, Wang Y, Chen R. 2008. Isolation and characterization of antibiotic NC0604, a new analogue of bleomycin. J. Antibiot. 61(12):747-751.
- Chen HC, Wilde F. 1991. The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae*. Biotechnol. Bioeng. 37(6):591-595.
- Chen K-C, Lin Y-H, Wu J-Y, Hwang S-CJ. 2003. Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. Enzyme Microb. Technol. 32(1):152-156.
- Chen Y, Krol J, Sterkin V, Fan W, Yan X, Huang W, Cino J, Julien C. 1999. New process control strategy used in a rapamycin fermentation. Process Biochem. 34(4):383-389.
- Cheng YR, Hauck L, Demain AL. 1995. Phosphate, ammonium, magnesium and iron nutrition of *Streptomyces hygroscopicus* with respect to rapamycin biosynthesis. J. Ind. Microbiol. 14(5):424-427.
- Chipeva V, Dumanova E, Todorov T, Ivanova I. 1991. Impact of nitrogen assimilation on regulation of antibiotic production in *Streptomyces hygroscopicus* 155. Antibiotiki i Khimioterapiya 36(3):5-8.
- Choi D, Choi OY, Shin HJ, Chung DO, Shin DY. 2007. Tylosin production by *Streptomyces fradiae* using raw cornmeal in airlift bioreactor. J. Microbiol. Biotechnol. 17(7):1071-1078.
- Choi DB, Park EY, Okabe M. 2000. Dependence of apparent viscosity on mycelial morphology of *Streptomyces fradiae* culture in various nitrogen sources. Biotechnol. Prog. 16(4):525-532.

- Cimburkova E, Zima J, Novak J, Vanek Z. 1988. Nitrogen regulation of avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* in a chemically defined medium. *J. Basic Microbiol.* 28(8):491-499.
- Clark GJ, Langley D, Bushell ME. 1995. Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: Investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology* 141(3):663-669.
- Corvini PFX, Delaunay S, Maujean F, Rondags E, Vivier H, Goergen JL, Germain P. 2004. Intracellular pH of *Streptomyces pristinaespiralis* is correlated to the sequential use of carbon sources during the pristinamycins-producing process. *Enzyme Microb. Technol.* 34(2):101-107.
- Cruz R, Arias ME, Soliveri J. 1999. Nutritional requirements for the production of pyrazoloisoquinolinone antibiotics by *Streptomyces griseocarneus* NCIMB 40447. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53(1):115-119.
- Cui YQ, Van Der Lans RGJM, Luyben KCAM. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 55(5):715-726.
- Curdova E, Jechova V, Zima J, Vanek Z. 1989. The effect of inorganic phosphate on the production of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *J. Basic Microbiol.* 29(6):341-346.
- Deeble VJ, Lindley HK, Fazell MR, Cove JH, Baumberg S. 1995. Depression of streptomycin production by *Streptomyces griseus* at elevated growth temperature: Studies using gene fusions. *Microbiology* 141(10):2511-2518.
- Deianova OA, Vinogradova KA, Polin AN. 1988. Kinetic aspects of the relation of the growth of the producer and the biosynthesis of heliomycin depending on the carbon source in the medium. *Antibiot. Khimioter.* 33(4):253-257.
- Dekleva ML, Titus JE, Strohl WR. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peuceitius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* 31(3):287-294.
- Delafosse A, Morchain J, Guiraud P, Line A. 2009. Trailing vortices generated by a Rushton turbine: Assessment of URANS and large Eddy simulations. *Chem. Eng. Res. and Des.* 87(4):401-411.
- Demain AL, Inamine E. 1970. Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (alpha-D-mannosidase) formation. *Bacteriol. Rev.* 34(1):1-19.
- Demain AL. 1989. Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes. Shapiro S Ed. Boca Raton F, editor: CRC Press. 127-134 p.
- Demain AL. 2009. Antibiotics: Natural products essential to human health. *Med. Res. Rev.* 29(6):821-842.
- Deutscher J. 2008. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 11(2):87-93.
- D'Huys PJ, Lule I, Van Hove S, Vercammen D, Wouters C, Bernaerts K, Anne J, Van Impe JFM. 2010. Amino acid uptake profiling of wild type and recombinant *Streptomyces lividans* TK24 batch fermentations. *J. Biotechnol.* Article in press.
- Dick O, Onken U, Sattler I, Zeeck A. 1994. Influence of increased dissolved oxygen concentration on productivity and selectivity in cultures of a colabomycin-producing strain of *Streptomyces griseoflavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41(4):373-377.
- Dobson LF, O'Cleirigh CC, O'Shea DG. 2008. The influence of morphology on geldanamycin production in submerged fermentations of *Streptomyces hygroscopicus* var. geldanus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79(5):859-866.
- Douaire M. 2010. Etude expérimentale et numérique de la réponse de *Lactococcus Lactis* NCDO2118 aux conditions hydrodynamiques locales en réacteur Couette. PhD Thesis. INSA, Toulouse, France.

- Doull JL, Vining LC. 1989. Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2). FEMS Microbiol. Lett. 65(3):265-268.
- Doull JL, Vining LC. 1990. Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): Suppressive effects of nitrogen and phosphate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32(4):449-454.
- Drouin JF, Louvel L, Vanhoutte B, Vivier H, Pons MN, Germain P. 1997. Quantitative characterization of cellular differentiation of *Streptomyces ambofaciens* in submerged culture by image analysis. Biotechnol. Tech. 11(11):819-824.
- Dulaney EL. 1948. Observations on *Streptomyces griseus*: II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. J. Bacteriol. 56(3):305-13.
- Dunstan GH, Avignone-Rossa C, Langley D, Bushell ME. 2000. The Vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen-limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC 19795) cultures that do not produce antibiotic. Enzyme Microb. Technol. 27(7):502-510.
- Efthimiou G, Thumser AE, Avignone-Rossa CA. 2008. A novel finding that *Streptomyces clavuligerus* can produce the antibiotic clavulanic acid using olive oil as a sole carbon source. J. Appl. Microbiol. 105(6):2058-2064.
- El-Enshasy HA, Farid MA, El-Sayed ESA. 2000. Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. J. Basic Microbiol. 40(5-6):333-342.
- Elibol M, Mavituna F. 1995. Effect of perfluorodecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Appl. Microbiol. Biotechnol. 43(2):206-210.
- Elibol M, Mavituna F. 1997. Effect of sucrose on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Process Biochem. 33(3):307-311.
- Elibol M, Mavituna F. 1998. A remedy to oxygen limitation problem in antibiotic production: Addition of perfluorocarbon. Biochem. Eng. J. 3(1):1-7.
- Elibol M, Ulgen K, Kamaruddin K, Mavituna F. 1995. Effect of inoculum type on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). Biotechnol. Lett. 17(6):579-582.
- Elibol M. 2002. Product shifting by controlling medium pH in immobilised *Streptomyces coelicolor* A3(2) culture. Process Biochem. 37(12):1381-1386.
- El-Shirbmy SA, Ghaly MF, El-Ayoty YM, Fleafil NS. 2007. Niromycin A: An antialgal substance produced by *Streptomyces endus* N40. Res. J. Microbiol. 2(8):606-618.
- Erban V, Novotna J, Běhal V, Hostalek Z. 1983. Growth rate, sugar consumption, chlortetracycline production and anhydrotetracycline oxygenase activity in *Streptomyces aureofaciens*. Folia Microbiol. 28(4):262-267.
- Escalante L, Lopez H, Del Carmen R. 1982. Transient repression of erythromycin formation in *Streptomyces erythraeus*. J. Gen. Microbiol. 128(9):2011-2015.
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E, Sanchez S. 1999. Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. caesius. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52(4):572-578.
- Farid MA, El-Enshasy HA, El-Diwany AI, El-Sayed ESA. 2000. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. J. Basic Microbiol. 40(3):157-166.
- Fazeli MR, Cove JH, Baumberg S. 1995. Physiological factors affecting streptomycin production by *Streptomyces griseus* ATCC 12475 in batch and continuous culture. FEMS Microbiol. Lett. 126(1):55-61.

- Feren CJ, Squires RW. 1969. The relationship between critical oxygen level and antibiotic synthesis of capreomycin and cephalosporin C. *Biotechnol. Bioeng.* 11(4):583-592.
- Flores ME, Sanchez S. 1985. Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 26(2):191-194.
- Folcher M, Gaillard H, Nguyen LT, Nguyen KT, Lacroix P, Bamas-Jacques N, Rinkel M, Thompson CJ. 2001. Pleiotropic functions of a *streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 276(47):44297-44306.
- Fourati-Ben Fguira L, Fotso S, Ben Ameer-Mehdi R, Mellouli L, Laatsch H. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Res. Microbiol.* 156(3):341-347.
- Gallo M, Katz E. 1972. Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.* 109(2):659-667.
- Gao H, Liu M, Liu J, Dai H, Zhou X, Liu X, Zhuo Y, Zhang W, Zhang L. 2009. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 100(17):4012-4016.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.* 27(2):153-176.
- Garner HR, Koffler H, Tetrault PA, Fahmy M, Mallett MV, Faust RA, Phillips RL, Bohonos N. 1953. Factors affecting streptomycin yield. *Am. J. Bot.* 40(5):289-296.
- Gersch D, Skurk A, Römer W. 1979. Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Streptomyces hygroscopicus* and its reversal by cyclic AMP. *Arch. Microbiol.* 121(1):91-96.
- Gersch D, Strunk C. 1980. Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate as "first messenger" in *Streptomyces hygroscopicus* - Bimodal regulation of germination and growth. *Curr. Microbiol.* 4(5):271-275.
- Gesheva V, Ivanova V, Gesheva R. 2005. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.* 160(3):243-248.
- Ghonaim SA, Khalil AM, Abou-Zeid AA, El-Diwany AI. 1980. Factors affecting fermentative production of magnamycin by *Streptomyces halsted* II. *Agricultural Wastes* 2(1):31-36.
- Glazebrook MA, Vining LC, White RL. 1992. Growth morphology of *Streptomyces akiyoshiensis* in submerged culture: Influence of pH, inoculum, and nutrients. *Can. J. Microbiol.* 38(2):98-103.
- Görke B, Stülke J. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(8):613-624.
- Gouveia ER, Baptista-Neto A, Badino Jr AC, Hokka CO. 2001. Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Lett.* 23(2):157-161.
- Grafe U, Bocker H, Thrum H. 1977. Regulative influence of o-aminobenzoic acid on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of *Streptomyces noursei* JA 3890b. II. Regulation of glutamine synthetase and the role of glutamine synthetase/glutamyl synthase pathway. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 17:201-209.
- Guimaraes LM, De Araujo Furlan RL, Garrido LM, Ventura A, Padilla G, Facciotti MCR. 2004. Effect of pH on the production of the antitumor antibiotic retamycin by *Streptomyces olindensis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40(1):107-111.

- Gupte MD, Kulkarni PR. 2002. A study of antifungal antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design. *Lett. Appl. Microbiol.* 35(1):22-26.
- Gupte TE, Naik SR. 1998. Optimisation of nutritional requirements and process control parameters for the production of HA-2-91, a new tetraene polyene antibiotic. *Hindustan antibiotics bulletin.* 40(1-4):5-13.
- Hall MJ, Hassall CH. 1970. Production of the monamycins, novel depsipeptide antibiotics. *Appl. Microbiol.* 19(1):109-112.
- Haque SF, Sen SK, Pal SC. 1995. Nutrient optimization for production of broad spectrum antibiotic by *Streptomyces antibioticus* SR15.4. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 42(2):155-162.
- Hassan MA, El-Naggar MY, Said WY. 2001. Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. *Egypt. J. Biol.* 3:1-10.
- He JY, Vining LC, White RL, Horton KL, Doull JL. 1995. Nutrient effects on growth and armentomycin production in cultures of *Streptomyces armentosus*. *Can. J. Microbiol.* 41(2):186-193.
- Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H. 2009. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnol. Bioeng.* 103(6):1202-1213.
- Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Flett F, Oliver SG. 1990. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): Kinetics and the influence of nutrients. *J. Gen. Microbiol.* 136(11):2291-2296.
- Hobbs G, Obanye AIC, Petty J, Mason JC, Barratt E, Gardner DCJ, Flett F, Smith CP, Broda P, Oliver SG. 1992. An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 174(5):1487-1494.
- Hoeksema H, Smith CG. 1961. Novobiocin. *Prog. Ind. Microbiol.* 3:91-139.
- Hohmann C, Schneider K, Bruntner C, Irran E, Nicholson G, Bull AT, Jones AL, Brown R, Stach JEM, Goodfellow M and others. 2009. Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *J. Antibiot.* 62(2):99-104.
- Hostallek Z, Tinterova M, Jechova V, Blumauerova M, Suchy J, Vanek Z. 1969. Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. I. Biosynthesis of chlortetracycline and tricarboxylic acid cycle activity. *Biotechnol. Bioeng.* 11(4):539-548.
- Huang JW, Shih HD, Huang HC, Chung WC. 2007. Effects of nutrients on production of fungichromin by *Streptomyces padanus* PMS-702 and efficacy of control of *Phytophthora infestans*. *Can. J. Plant. Pathol.* 29(3):261-267.
- Huchet F, Line A, Morchain J. 2009. Evaluation of local kinetic energy dissipation rate in the impeller stream of a Rushton turbine by time-resolved PIV. *Chem. Eng. Res. Des.* 87(4):369-376.
- Hunt G, Stieber R. 1986. Inoculum development. In: Solon AL. (ed.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Washington 32-40.
- Hurley LH, Bialek D. 1974. Regulation of antibiotic production: catabolite inhibition and the dualistic effect of glucose on indolmycin production. *J. Antibiot.* 27(1):49-56.
- Ilic SB, Konstantinovic SS, Veljkovic VB, Savic DS, Lazic ML, Gojgic-Cvijovic G. 2008. Impact of carboxymethylcellulose on morphology and antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus*. *Curr. Microbiol.* 57(1):8-11.
- Inoue OO, Netto WS, Padilla G, Facciotti MCR. 2007. Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Braz. J. Microbiol.* 38(1):58-61.

- Jakeman DL, Graham CL, Young W, Vining LC. 2006. Culture conditions improving the production of jadomycin B. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(9):767-772.
- James PDA, Edwards C, Dawson M. 1991. The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat. *J. Gen. Microbiol.* 137(7):1715-1720.
- James PDA, Edwards C. 1989. The effects of temperature on growth and production of the antibiotic granaticin by a thermotolerant streptomycete. *J. Gen. Microbiol.* 135(7):1997-2003.
- Jensen AL, Schultz JS, Shu P. 1966. Scale-up of antibiotic fermentations by control of oxygen utilization. *Biotechnol. Bioeng.* 8(4):525-537.
- Jhang J, Wolfe S, Demain AL. 1989. Phosphate regulation of ACV synthetase and cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 57(2):145-150.
- Jiang H, Jiang HL, Lin R, Zheng W, Cheng YR. 2003. Effect of metal ions and phosphate salts on a lipopeptide antibiotic FW99608 biosynthesis by *Streptomyces* sp. FIM99608. *Chin. J. Antibiot.* 28(9):513-516.
- Jones GH. 1985. Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* 163(3):1215-1221.
- Jonsbu E, Christensen B, Nielsen J. 2001. Changes of in vivo fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(1-2):93-100.
- Jonsbu E, Ellingsen TE, Nielsen J. 2000. Effect of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by *Streptomyces noursei*. *J. Antibiot.* 53(12):1354-1362.
- Kahar P, Kobayashi K, Iwata T, Hiraki J, Kojima M, Okabe M. 2002. Production of alpha-polylysine in an airlift bioreactor (ABR). *J. Biosci. Bioeng.* 93(3):274-280.
- Kaiser D, Onken U, Sattler I, Zecek A. 1994. Influence of increased dissolved oxygen concentration on the formation of secondary metabolites by manumycin-producing *Streptomyces parvulus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41(3):309-312.
- Katz E, Pienta P, Sivak A. 1958. The role of nutrition in the synthesis of actinomycin. *Appl. Microbiol.* 6(4):236-241.
- Kavitha A, Vijayalakshmi M. 2009. Influence of cultural conditions on the production of bioactive metabolites by *Streptomyces tendae* TK-VL-333. *Res. J. Biotechnol.* 4(4):56-64.
- Khaoua S, Lebrihi A, Germain P, Lefebvre G. 1991. Cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces cattleya*: Nitrogen source regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35(2):253-257.
- Kim ES, Hong HJ, Choi CY, Cohen SN. 2001. Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of afsR2 gene transcription. *J. Bacteriol.* 183(7):2198-2203.
- Kim JH, Hancock IC. 2000. Pellet forming and fragmentation in liquid culture of *Streptomyces griseus*. *Biotechnol. Lett.* 22(3):189-192.
- Kimura A. 1967. Biochemical studies on *Streptomyces sioyanensis* II. Mechanism of the inhibitory effect of glucose on siomycin formation. *Agric. Biol. Chem.* 31:845-852.
- Kishimoto K, Park YS, Okabe M, Akiyama SI. 1996. Effect of ferrous ion on mildiomycin production by *Streptoverticillium rimofaciens*. *J. Antibiot.* 49(8):770-774.
- Kishimoto K, Park YS, Okabe M, Akiyama SI. 1997. Effect of ferrous ion on amino acid metabolism in mildiomycin production by *Streptoverticillium rimofaciens*. *J. Antibiot.* 50(3):206-211.

- Kojima I, Cheng YR, Mohan V, Demain AL. 1995. Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 14(6):436-439.
- Kominek LA. 1972. Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. Antimicrob. Agents Chemother. 1(2):123-134.
- Kudo K, Suto T, Yoshida Y, Edo K, Ishida N. 1993. Improved production of a chromophore component of antitumor antibiotic neocarzinostatin (NCS) by addition of threonine in a chemically defined medium. J. Ferment. Bioeng. 75(3):223-225.
- Kumada Y, Takano E, Nagaoka K, Thompson CJ. 1990. *Streptomyces hygroscopicus* has two glutamine synthetase genes. J. Bacteriol. 172(9):5343-5351.
- Kurobane I, Dale PL, Vining LC. 1987. Characterization of new viridomycins and requirements for production in cultures of *Streptomyces griseus*. J. Antibiot. 40(8):1131-1139.
- Laakel M, Lebrihi A, Khaoua S, Schneider F, Lefebvre G, Germain P. 1994. A link between primary and secondary metabolism: Malonyl-CoA formation in *Streptomyces ambofaciens* growing on ammonium ions or valine. Microbiology 140(6):1451-1456.
- Lamsaif D. 1992. Effets des sources d'azote sur la biosynthese de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Etude des enzymes impliquees dans l'assimilation des ions ammonium. PhD Thesis. National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France.
- Lara AR, Galindo E, Ramirez OT, Palomares LA. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors: Understanding the effects of environmental gradients on cells. Mol. Biotechnol. 34(3):355-381.
- Large KP, Ison AP, Williams DJ. 1998. The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. J. Biotechnol. 63(2):111-119.
- Lebrihi A, Germain P, Lefebvre G. 1988. Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26(2):130-135.
- Lebrihi A, Lamsaif D, Lefebvre G, Germain P. 1992. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37(3):382-387.
- Lee H-N, Im J-H, Lee M-J, Lee SY, Kim E-S. 2009. A putative secreted solute binding protein, SCO6569 is a possible AfsR2-dependent down-regulator of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. Process Biochem. 44(3):373-377.
- Lee MS, Kojima I, Demain AL. 1997. Effect of nitrogen source on biosynthesis of rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19(2):83-86.
- Lee SD, Park SW, Oh KK, Hong SI, Kim SW. 2002. Improvement for the production of clavulanic acid by mutant *Streptomyces clavuligerus*. Lett. Appl. Microbiol. 34(5):370-375.
- Lee SH, Lee KJ. 1993. Aspartate aminotransferase and tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. Appl. Environ. Microbiol. 59(3):822-827.
- Liao Y, Wei ZH, Bai L, Deng Z, Zhong JJ. 2009. Effect of fermentation temperature on validamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. J. Biotechnol. 142(3-4):271-274.
- Liu CM, McDaniel LE, Schaffner CP. 1974. Factors affecting the production of candididin. Antimob.Agents Chemother. 7(2):196-202.

- Liu TJ, Xu WL, Sun WB, Zhang YZ. 2000. Effect of dissolved oxygen on mutanolysin fermentation. *Chin. J. Biotechnol.* 16(2):229-231.
- Lounes A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1995a. Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. *Can. J. Microbiol.* 41(9):800-808.
- Lounes A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1995b. Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.* 31(5):304-311.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1996. Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effects of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45(1-2):204-211.
- Luo JM, Jin ZH, Cen PL. 2005. Effects of cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces gilvosporeus*. *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)* 39(2):296-300.
- Lyui H, Nefelova MV, Zakharchuk LM. 2000. Heat shock effect on production and composition of actinomycins. *Antibiotiki i Khimioterapiya* 45(2):5-9.
- Magnolo SK, Leenutaphong DL, DeModena JA, Curtis JE, Bailey JE, Galazzo JL, Hughes DE. 1991. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of bacterial hemoglobin. *Nat. Biotechnol.* 9(5):473-476.
- Maier U. 2002. Gas-Flüssigkeits-Stofftransfer im Schüttelkolben. PhD thesis. RWTH Aachen University. Aachen, Germany.
- Majumdar MK, Majumdar SK. 1971. Synthesis of neomycin by washed mycelium of *Streptomyces fradiae* and some physiological considerations. *Folia Microbiol.* 16(4):285-292.
- Makagiansar HY, Ayazi Shamlou P, Thomas CR, Lilly MD. 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess Eng.* 9(2-3):83-90.
- Makarevich VG, Upiter GD, Slugina MD. 1975. Effect of phosphate on growth rate tetracycline biosynthesis of *Actinomyces aureofaciens*. *Antibiotiki.* 20(4):295-299.
- Mansour FA, El-Shirbiny SA, El-Metwaly NA. 1996. Demethyltetracycline biosynthesis by *Streptomyces aureofaciens* Sub-species viridulans as influenced by medium composition. *Egypt. J. Microbiol.* 31:221-235.
- Mansour FA, El-Shirbiny SA, El-Metwaly NA. 1996. Demethyltetracycline biosynthesis by *Streptomyces aureofaciens* Sub-species viridulans as influenced by medium composition. *Egypt. J. Microbiol.* 31:221-235.
- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(12):3877-3886.
- Mao X, Wang F, Zhang J, Chen S, Deng Z, Shen Y, Wei D. 2009. The pH Shift and Precursor Feeding Strategy in a Low-Toxicity FR-008/Candicidin Derivative CS103 Fermentation Bioprocess by a Mutant of *Streptomyces* sp. FR-008. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159(3):673-686.
- Martín J. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Eng.* 6. p 105-127.
- Martin JF, Demain AL. 1977. Control by phosphate of candicidin production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71(4):1103-1109.
- Martin JF, Demain AL. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44(2):230-251.
- Martin JF, Liras P, Demain AL. 1978. ATP and adenylate energy charge during phosphate-mediated control of antibiotic synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83(3):822-828.

- Martín J-F, Liras P. 2010. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* 13(3):263-273.
- Martins RA, Guimaraes LM, Pamboukian CR, Tonso A, Facciotti MCR, Schmidell W. 2004. The effect of dissolved oxygen concentration control on cell growth and antibiotic retamycin production in *Streptomyces olindensis* So20 fermentations. *Braz. J. Chem. Eng.* 21(2):185-192.
- Masuma R, Tanaka Y, Omura S. 1983. Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthetic regulation of the antibiotic. *J. Ferment. Technol.* 61(6):607-614.
- Masuma R, Tanaka Y, Tanaka H, Omura S. 1986. Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. *J. Antibiot.* 39(11):1557-1564.
- Masurekar PS. 2008. Nutritional and engineering aspects of microbial process development. *Prog. Drug Res.* p 292-328.
- Mateles RI, Ben Bassat A. 1973. Production of actinomycin D in complex media. Part I. The influence of metal ions. *Agric. Biol. Chem.* 37(10):2215-2217.
- Mehmood N, Olmos E, Marchal P, Goergen JL, Delaunay S. 2010. Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_La . *Process Biochem.* 45(11):1779-1786.
- Mertz FP, Doolin LE. 1973. The effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of vancomycin. *Can. J. Microbiol.* 19(2):263-270.
- Miller AL, Walker JB. 1970. Accumulation of streptomycin-phosphate in cultures of streptomycin producers grown on a high-phosphate medium. *J. Bacteriol.* 104(1):8-12.
- Morchain J. 2009. Instantaneous substrate uptake rate calculation from dynamic simulation of mass transfer around a living cell. *Congrès de la SFGP, Marseille, 14-16 octobre 2009*
- Motkova MO, Gladkikh EG, Korobkova TP. 1981. Inoculum effect on biosynthesis of tobramycin. *Antibiotiki* 26(7):492-496.
- Muramatsu Y, Arai M, Sakaida Y, Takamatsu Y, Miyakoshi S, Inukai M. 2006. Studies on novel bacterial translocase I inhibitors, A-500359s: V. Enhanced production of capuramycin and A-500359 A in *Streptomyces griseus* SANK 60196. *J. Antibiot.* 59(9):601-606.
- Narayana KJP, Vijayalakshmi M. 2008. Optimization of antimicrobial metabolites production by *Streptomyces albidoflavus*. *Res. J. Pharmacol.* 2(1):4-7.
- Nielsen J, Johansen CL, Jacobsen M, Krabben P, Villadsen J. 1995. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnol. Prog.* 11(1):93-98.
- Nielsen J. 1996. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. *Trends Biotechnol.* 14(11):438-443.
- Nienow AW. 1990. Agitators for mycelial fermentations. *Trends Biotechnol.* 8(8):224-233.
- Nienow AW. 1996. Gas-liquid mixing studies : A comparison of rushton turbines with some modern impellers. *Chem. Eng. Res. Des.* 74(4):417-423.
- Novak J, Kopecka J, Vanak Z. 1997. Nitrogen source regulates expression of alanine dehydrogenase isoenzymes in *Streptomyces avermitilis* in a chemically defined medium. *Can. J. Microbiol.* 43(2):189-193.

- O'Cleirigh C, Casey JT, Walsh PK, O'Shea DG. 2005. Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus* var. geldanus: Regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(3):305-310.
- Ohta N, Yong Soo P, Yahiro K, Okabe M. 1995. Comparison of neomycin production from *Streptomyces fradiae* cultivation using soybean oil as the sole carbon source in an air-lift bioreactor and a stirred-tank reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 79(5):443-448.
- Okabe M, Kuwajima T, Satoh M, Kimura K, Okamura K, Okamoto R. 1992. Preferential and high-yield production of a cephamycin C by dissolved oxygen controlled fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 73(4):292-296.
- Okba AK, Ogata T, Matsubara H, Matsuo S, Doi K, Ogata S. 1998. Effects of bacitracin and excess Mg^{2+} on submerged mycelial growth of *Streptomyces azureus*. *J. Ferment. Bioeng.* 86(1):28-33.
- Omura S, Tanaka Y, Kitao C. 1980. Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18(5):691-695.
- Omura S, Tanaka Y, Mamada H, Masuma R. 1984. Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids on the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot.* 37(5):494-502.
- Ortiz SCA, Hokka CO, Badino AC. 2007. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme Microb. Technol.* 40(5):1071-1077.
- Oskay M, Tamer AU, Karaboz I. 2010. Isolation and screening for antimicrobial activities of culturable mesophilic *Streptomyces* strains from north cyprus soils. *Fresenius Environ. Bull.* 19(2):154-163.
- Oskay M. 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *Afr. J. Biotechnol.* 8(13):3007-3017.
- Ozergin-Ulgen K, Mavituna F. 1998. Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) culture in a batch bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73(3):243-250.
- Pamboukian CRD, Facciotti MCR. 2005. Rheological and morphological characterization of *Streptomyces olindensis* growing in batch and fed-batch fermentations. *Braz. J. Chem. Eng.* 22(1):31-40.
- Pandey A, Shukla A, Majumdar SK. 2005. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an anti bacterial antibiotic. *Afr. J. Biotechnol.* 4(9):909-910.
- Pandolfi D, Pons MN, Motta MD. 2007. Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis. *Biotechnol. Lett.* 29(8):1263-1269.
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22(3):189-259.
- Paquet V. 1990. Mise en évidence de facteurs d'induction de la production de pristinamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis*. PhD Thesis, INSA, Toulouse, France.
- Park YS, Momose I, Tsunoda K, Okabe M. 1994. Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40(6):773-779.
- Park, Y, Tamura, S, Koike, Y, Toriyama, M, Okabe, M. 1997. Mycelial pellet intrastucture visualization and viability prediction in a culture of *Streptomyces fradiae* using confocal scanning laser microscopy. *J. Ferment. Bioeng.* 84(5):483-486.
- Pass L, Racznska-Bojanowska K. 1968. On the inhibition mechanisms of viomycin synthesis by inorganic phosphate. *Acta Biochim. Pol.* 15(4):355-367.

- Paul A, Banerjee A. 1983. Determination of optimum conditions for antibiotic production by *Streptomyces galbus*. *Folia Microbiol.* 28(5):397-405.
- Paul GC, Priede MA, Thomas CR. 1999. Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. *Biochem. Eng. J.* 3(2):121-129.
- Paul GC, Thomas CR. 1998. Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 60:1-59.
- Peacock L, Ward J, Ratledge C, Dickinson FM, Ison A. 2002. How *Streptomyces lividans* uses oils and sugars as mixed substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 32(1):157-166.
- Pearson AP, Glennon B, Kieran PM. 2003. Comparison of morphological characteristics of *Streptomyces natalensis* by image analysis and focused beam reflectance measurement. *Biotechnol. Prog.* 19(4):1342-1347.
- Perlman D, Wagman GH. 1952. Studies on the utilization of lipids by *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 63(2):253-262.
- Pinto LS, Vieira LM, Pons MN, Fonseca MMR, Menezes JC. 2004. Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. *Bioprocess Biosys. Eng.* 26(3):177-184.
- Raytapadar S, Paul AK. 2001. Production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces aburaviensis* 1DA-28. *Microbiol. Res.* 155(4):315-323.
- Raza W, Yang X, Wu H, Huang Q, Xu Y, Shen Q. 2010. Evaluation of metal ions (Zn^{2+} , Fe^{3+} and Mg^{2+}) effect on the production of fusaricidin type antifungal compounds by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Bioresour. Technol.* 101(23):9264-9271
- Reichl U, King R, Gilles ED. 1992. Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 39(2):164-170.
- Reitzer LJ. 1996. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, L-alanine and D-alanine. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology: Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology. 391-407 p.
- Rikmanis M, Berzins A, Viesturs U. 2007. Excess turbulence as a cause of turbohypobiosis in cultivation of microorganisms. *Cent. Eur. J. Biol.* 2(4):481-501.
- Rocha-Valadez JA, Albiter V, Caro MA, Serrano-Carreoñ n L, Galindo E. 2007. A fermentation system designed to independently evaluate mixing and/or oxygen tension effects in microbial processes: Development, application and performance. *Bioprocess Biosys. Eng.* 30(2):115-122.
- Rokem JS, Lantz AE, Nielsen J. 2007. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 24(6):1262-1287.
- Rollins MJ, Jensen SE, Westlake DWS. 1988. Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. *J. Ind. Microbiol.* 3(6):357-364.
- Rollins MJ, Jensen SE, Westlake DWS. 1991. Effect of dissolved oxygen level on ACV synthetase synthesis and activity during growth of *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35(1):83-88.
- Rosa JC, Neto AB, Hokka CO, Badino AC. 2005. Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioprocess Biosystems Eng.* 27(2):99-104.

Chapitre I. Revue bibliographique

- Roszkowski J, Rafalski A, Raczyni ska-Bojanowska K. 1969. Alanine and alanine dehydrogenase in *Streptomyces erythreus*. Acta microbiologica Polonica. Series B: Microbiologia applicata 1(2):59-68.
- Roubos JA, Krabben P, Luiten RGM, Verbruggen HB, Heijnen JJ. 2001. A quantitative approach to characterizing cell lysis caused by mechanical agitation of *Streptomyces clavuligerus*. Biotechnol. Prog. 17(2):336-347.
- Ruiz B, Chavez A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanchez M, Rocha D, Sanchez B, Rodriguez-Sanoja R, Sanchez S and others. 2010. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. Crit. Rev. Microbiol. 36(2):146-167.
- Saffroy S. 2006. Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. PhD Thesis. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France.
- Sanchez L, Brana AF. 1996. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. Microbiology 142(5):1209-1220.
- Sanchez S, Chavez A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanchez M, Rocha D, Sanchez B, Valos M, Guzman-Trampe S and others. 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. J. Antibiot. 63(8):442-459.
- Sanchez S, Demain AL. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. Enzyme Microb. Technol. 31(7):895-906.
- Sanchez S, Olson B. 2005. Ecology and industrial microbiology: Microbial diversity -- the bright and promising future of microbial manufacturing. Curr. Opin. Microbiol. 8(3):229-233.
- Sankaran L, Pogell BM. 1975. Biosynthesis of puromycin in *Streptomyces alboniger*: Regulation and properties of O demethylpuromycin O methyltransferase. Antimicrob. Agents Chemother. 8(6):721-732.
- Santamarta I, Perez-Redondo R, Lorenzana LM, Martin JF, Liras P. 2005. Different proteins bind to the butyrolactone receptor protein ARE sequence located upstream of the regulatory ccaR gene of *Streptomyces clavuligerus*. Mol. Microbiol. 56(3):824-835.
- Santamarta I, Rodriguez-Garcia A, Perez-Redondo R, F. MJ, Liras P. 2002. CcaR is an autoregulatory protein that binds to the ccaR and cefD-cmeI promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. J. Bacteriol. 184(11):3106-3113.
- Sarra M, Casas C, Poch M, Gòdia F. 1999. A simple structured model for continuous production of a hybrid antibiotic by *Streptomyces lividans* pellets in a fluidized-bed bioreactor. Appl. Biochem. Biotechnol. 80(1):39-50.
- Schimana J, Walker M, Zeeck A, Fiedler HP. 2001. Simocyclinones: diversity of metabolites is dependent on fermentation conditions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27(3):144-148.
- Schimana J, Walker M, Zeeck A, Fiedler HP. 2001. Simocyclinones: diversity of metabolites is dependent on fermentation conditions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27(3):144-148.
- Schreier HJ. 1993. Biosynthesis of glutamine and glutamate and the assimilation of ammonia. Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick: Washington, DC: American Society for Microbiology. 281-298 p.
- Shapiro S, Vining LC. 1983. Nitrogen metabolism and chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*. Can. J. Microbiol. 29(12):1706-1714.
- Shapiro S, Vining LC. 1984. Suppression of nitrate utilization by ammonium and its relationship to chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*. Can. J. Microbiol. 30(6):798-804.

- Shapiro S, Vining LC. 1985. Effect of ammonium on chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae* in batch and continuous cultures. *Can. J. Microbiol.* 31(2):119-123.
- Shaw RK, Henderson RD, Seagers WJ. 1960. Effect of cations on mannosidostreptomycinase and streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol.* 8:12-15.
- Shioya S, Morikawa M, Kajihara Y, Shimizu H. 1999. Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(2):164-169.
- Singh LS, Mazumder S, Bora TC. 2009. Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *J. Med. Mycol.* 19(4):225-233.
- Suetsuna K, Osajima Y. 1990. Cultural conditions for production of griseorhodin by a culture of *S. californicus* JCM 6910. *Suisan Diagakkakenkyn Hokoku* 38:17-22.
- Sujatha P, Bapi Raju KVVS, Ramana T. 2005. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 160(2):119-126.
- Takahashi J, Yamada K, Aasai T. 1958. Studies on the effect of some physical conditions on the submerged mold culture. Part I. The process of pellet formation of *Asp. niger* under the shaking culture, and the effect of the inoculum size on the shape of pellet. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 32:501-506.
- Takahashi J, Yamada K. 1959. Studies on the effect of some physical conditions on the submerged mold culture. Part II. On the two types of pellet formation in the shaking culture. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 33:707-709.
- Tamura S, Park Y, Toriyama M, Okabe M. 1997. Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 83(6):523-528.
- Tanaka Y, Taki A, Masuma R, Omura S. 1985. Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* 39(6):813-821.
- Tang L, Zhang YX, Hutchinson CR. 1994. Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: Valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 176(19):6107-6119.
- Tata M, Menawat AS. 1994. Cyclic AMP regulation of tylosin biosynthesis and secondary metabolism in *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 44(3):283-290.
- Teodoro J, Baptista-Neto A, Cruz-Hernández I, Hokka C, Badino A. 2006. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72(3):450-455.
- Tereshin IM. 1976. *Polyene Antibiotics. Present and Future.* Tokyo: University of Tokyo press.
- Thakur D, Bora TC, Bordoloi GN, Mazumdar S. 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *J. Mycol. Med.* 19(3):161-167.
- Theobald U, Schimana J, Fiedler HP. 2000. Microbial growth and production kinetics of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 78(3-4):307-313.
- Toma MK, Ruklisha MP, Vanags JJ, Zeltina MO, Leite MP, Galinina NI, Viesturs UE, Tengerdy RP. 1991. Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. *Biotechnol. Bioeng.* 38(5):552-556.
- Torbochkina LI, Dormidoshina TA, Navolneva IN. 1965. The path of pyruvic acid synthesis in *Act. erythreus* and *Act. antibioticus* strains producing macrolid antibiotics. *antibiotiki.* 30(2):388-394.

- Tough AJ, Prosser JI. 1996. Experimental verification of a mathematical model for pelleted growth of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in submerged batch culture. *Microbiology* 142(3):639-648.
- Untrau S, Lebrihi A, Lefebvre G, Germain P. 1994. Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.* 28(2):111-118.
- Valentine BP, Bailey CR, Doherty A, Morris J, Elson SW, Baggaley KH, Nicholson NH. 1993. Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (15):1210-1211.
- Vasavada SH, Thumar JT, Singh SP. 2006. Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Curr. Sci.* 91(10):1393-1397.
- Vecht-Lifshitz SE, Magdassi S, Braun S. 1989. Effects of surface active agents on pellet formation in submerged fermentations of *Streptomyces tendae*. *J. Dispersion Sci. Technol.* 10(3):265-275.
- Vecht-Lifshitz SE, Magdassi S, Braun S. 1990. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Bioeng.* 35(9):890-896.
- Vecht-Lifshitz SE, Sasson Y, Braun S. 1991. Nikkomycin production in pellets of *Streptomyces tendae*. *J. Appl. Bacteriol.* 72(3):195-200.
- Viana D, Carneiro-Cunha M, Araújo J, Barros-Neto B, Lima-Filho J, Converti A, Pessoa-Júnior A, Porto A. 2010. Screening of Variables Influencing the Clavulanic Acid Production by *Streptomyces DAUFPE 3060* Strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160(6):1797-1807.
- Vilches C, Mendez C, Hardisson C, Salas JA. 1990. Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: Influence of nutritional conditions and development of resistance. *J. Gen. Microbiol.* 136(8):1447-1454.
- Visser-Luirink G, De Laat WTA, Klop JM. 2006. Fermentation of clavulanic acid at a Controlled level of ammonia. USP 6,991,925.
- Voelker F, Altaba S. 2001. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology* 147(9):2447-2459.
- Vu-Trong K, Bhuwathanapun S, Gray PP. 1981. Metabolic regulation in tylosin-producing *Streptomyces fradiae*: phosphate control of tylosin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19(2):209-212.
- Walker MS, Walker JB. 1971. Streptomycin biosynthesis. Separation and substrate specificities of phosphatases acting on guanidinodeoxy-scylo-inositol phosphate and streptomycin-(streptidino)phosphate. *J. Biol. Chem.* 246(22):7034-7040.
- Wallace KK, Payne GF, Speedie MK. 1990. Ammonium effects on streptonigrin biosynthesis by *Streptomyces flocculus*. *J. Ind. Microbiol.* 6(1):43-48.
- Webb C, Kamat SP. 1993. Improving fermentation consistency through better inoculum preparation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9(3):308-312.
- Weinberg D. 1978. Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. *Folia Microbiol.* 23(6):496-504.
- Weinberg ED. Biosynthesis of Secondary Metabolites: Roles of Trace Metals. In A. H. Rose and J. F. Wilkinson (ed), *Advances in microbial physiology*, vol.4. Academic Press Inc., New York. p 1-44.
- Weinberg ED. 1990. Roles of trace metals in transcriptional control of microbial secondary metabolism. *BioMetals* 2(4):191-196.

- Whitaker A. 1992. Actinomycetes in submerged culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 32(1-3):23-35.
- Xiong L, Li J, Kong F. 2004. *Streptomyces* sp. 173, an insecticidal micro-organism from marine. *Lett. Appl. Microbiol.* 38(1):32-37.
- Yan QH, Chen B, Zhang SL, Liu ZZ, Gao YS, Tu GQ. 2002. A diverse temperature control in meilingmycin fermentation. *Chin. J. Antibiot.* 27(1):18-20+54.
- Yang YK, Morikawa M, Shimizu H, Shioya S, Suga KI, Nihira T, Yamada Y. 1996. Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*. *J. Ferment. Bioeng.* 81(1):7-12.
- Yegneswaran PK, Gray MR, Thompson BG. 1991. Experimental stimulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: Effect on *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Bioeng.* 38(10):1203-1209.
- Yegneswaran PK, Gray MR, Westlake DWS. 1988. Effects of reduced oxygen on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Lett.* 10(7):479-484.
- Yegneswaran PK, Gray MR. 1991. Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentations. *Biotechnol. Prog.* 7(3):246-250.
- Yin P, Wang YH, Zhang SL, Chu J, Zhuang YP, Chen N, Li XF, Wu YB. 2008. Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* 39(6):609-615.
- Yocheva L, Staneva L, Antonova-Nikolova S. 2003. Effect of the exogenous added amino acids on the component composition of the actinomycin complex 695. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 17(2 Supp.): 136-143.
- Young MD, Kempe LL, Bader FG. 1985. Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media. *Biotechnol. Bioeng.* 27(3):327-333.
- Yu J, Liu Q, Liu Q, Liu X, Sun Q, Yan J, Qi X, Fan S. 2008. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresour. Technol.* 99(6):2087-2091.
- Zhang J, Demain AL. 1991. Regulation of ACV synthetase in penicillin- and cephalosporin-producing microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 9(4):623-641.
- Zhinan X, Peilin C. 1999. Enhanced production of avermectin B1a by medium optimization and glucose feeding with *Streptomyces avermilitis*. *Bioprocess Eng.* 20(1):67-71.
- Zhu CH, Lu FP, He YN, Han ZL, Du LX. 2007. Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: Effects of glucose, ammonium ion, and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73(5):1031-1038.
- Zygmunt WA. 1964. Influence of inorganic phosphorus on oxytetracycline formation by *Streptomyces rimosus*. *Appl. Microbiol.* p 195-196.

I.8. Les pristinamycines

I.8.1. Micro-organisme producteur

Streptomyces pristinaespiralis est une espèce isolée à partir d'un échantillon de terre prélevé à San Carlos (Argentine). Elle est utilisée à l'échelle industrielle pour la production de molécules antibactériennes, les pristinamycines (Jolles et al., 1965).

Le chromosome de *S. pristinaespiralis* a une forme linéaire semblable aux autres espèces de *Streptomyces* et a une taille d'environ 7580 kb (Bamas-Jacques et al., 1999). Comme c'est le cas pour de nombreux antibiotiques produits par les *Streptomyces*, un même cluster réunit les gènes de biosynthèse des différentes pristinamycines ainsi que les gènes de résistance spécifique à ces molécules. Ce cluster couvre un peu moins de 200 kb soit 6 % du génome et fait partie des plus grands découverts parmi les différentes espèces de *Streptomyces* (Bamas-Jacques et al., 1999).

Le procédé de production de pristinamycines a fait l'objet d'un dépôt de brevet en 1961 sous le numéro 1-301-857 (Rhône-Poulenc, 1961). La production des pristinamycines a lieu en milieu complexe composé de farine de soja, de glucose et de sels minéraux, à 27°C, sous aération et agitation contrôlées et sans régulation de pH. Les pristinamycines sont commercialisées sous forme de comprimés par le groupe Sanofi-Aventis, sous le nom de PYOSTACINE®.

I.8.2. Classification

Les pristinamycines sont répertoriées dans le groupe des synergistines, streptogramines ou encore peptolides. Les composés de cette famille d'antibiotiques contiennent deux structures de base : A (lactones macrocycliques de nature neutre) et B (molécules cycliques de nature depsipeptidiques à caractère amphotère), sur lesquelles différents groupes fonctionnels s'ajoutent en fonction de l'antibiotique (Cocito, 1979). Les synergistines appartiennent à la famille des Macrolides, Lincosamines, Synergistines (MLS) qui regroupe trois catégories d'antibiotiques de structures et compositions chimiques très différentes (Larparent et Sanglier, 1989).

Les synergistines sont principalement produites par le genre *Streptomyces*. Le nom de la molécule diffère en fonction de l'organisme de production; par exemple la pristinamycine I_A est identique à la virginiamycine S, la mikamycine B et l'ostréogramine B (Prud'homme et al., 1965).

Les antibiotiques appartenant au groupe des synergistines sont constitués de deux composants (A et B) sécrétés par un même micro-organisme. Ces deux composants montrent une synergie marquée. En effet, lorsqu'on les associe, on obtient une activité antibiotique plusieurs fois supérieure à celle des composants isolés. *In vitro*, une activité optimale est observée pour 30 % de composés de type I et 70 % de type II. *In vivo*, ces proportions s'inversent en raison de la pharmacocinétique défavorable du composant de type II. Par exemple, les pristinamycines I (appartenant aux streptogramines B) et les pristinamycines II (appartenant aux streptogramines A) ont séparément une activité bactériostatique, alors qu'ensemble elles ont une activité bactéricide (Preud'homme et al., 1965; Preud'homme et al., 1968). Ce sont des inhibiteurs de la synthèse protéique, au niveau de la fraction 50 S des ribosomes (Lissac et Avril, 1977).

I.8.3. Description des pristinamycines

Les pristinamycines commerciales sont un mélange en poudre micro-cristalline de pristinamycines I et de pristinamycines II. Les pristinamycines I représentent 20 à 30 % du total des pristinamycines contre 70 à 80 % pour les pristinamycines II. Les pristinamycines sont peu solubles dans l'eau (0,1 g.L⁻¹) ce qui limite leur prise *per os* mais ont une bonne diffusion tissulaire, en particulier osseuse. Les solubilités peuvent être augmentées à 1 g.L⁻¹ en abaissant le pH à 3. Les pristinamycines I sont très solubles dans l'acétone (170 g.L⁻¹) et dans l'acétate d'éthyle (250 g.L⁻¹) tandis que les pristinamycines II le sont dans le diméthyle formamide (100 g.L⁻¹) et dans le diméthylsulfoxyde (100 g.L⁻¹).

I.8.3.1. Les pristinamycines I

Les pristinamycines I se composent de molécules de type hexadepsipeptides cycliques dont masse moléculaire est d'environ 850 Da. Ces molécules résultent de la condensation de 7 résidus analogues d'acides aminés (3-hydroxypicolinate, α amino butyrate, 4-oxopipécolate, Phénylglycine, DMPAPA, proline et thréonine) (Cocito, 1979). 9 pristinamycines I existent (de PI_A à PI_I). Leurs différences majeures sont des alkylations ou méthylation de groupements

hydroxyles. Le composé majoritaire de ce mélange est la PIA (94 %). Les 8 molécules restantes étant très minoritaires (Figure I-8).

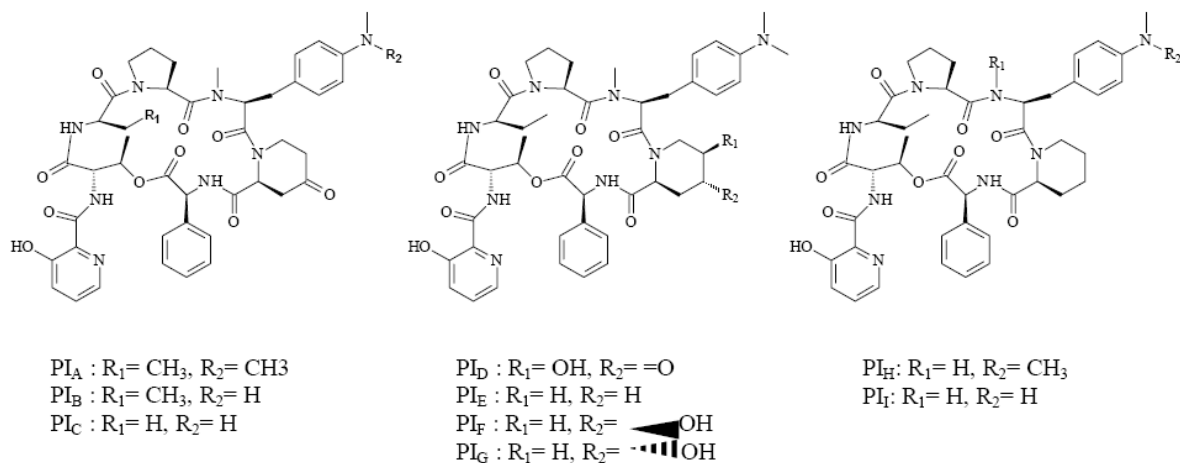


Figure I-8. Les constituants du groupe des pristinamycines I.

1.8.3.2. Les pristinamycines II

Les pristinamycines II sont des lactones macrocycliques polyinsaturées neutres. Ces composés ont un poids moléculaire d'environ 500 Da. Ces molécules se composent de 7 acétates et 4 acides aminés (valine, glycine, serine, proline) (Cocito, 1979). Deux molécules sont produites simultanément, la PII_A et la PII_B (Figure I-9). La PII_A représente entre 45 et 60 % des pristinamycines totales.

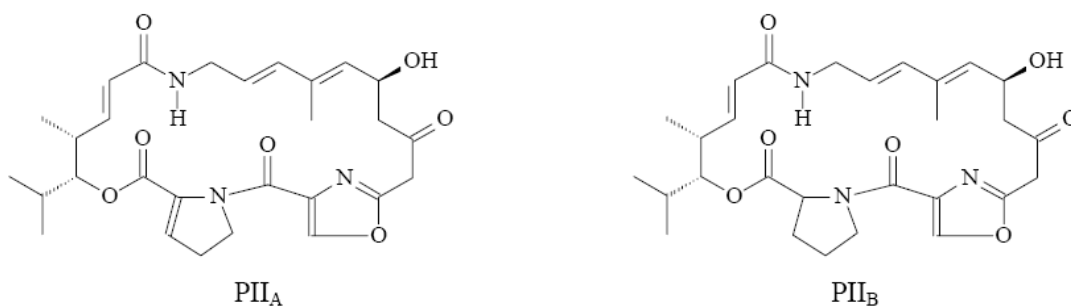


Figure I-9. Les constituants du groupe des pristinamycines II.

1.8.3.3. Microorganismes cibles et mode d'action

Les pristinamycines utilisées en mélange présentent une faible toxicité lors de traitements prolongés, une hypoallergenicité et n'autorisent qu'un faible développement de résistances des microorganismes cibles. Généralement le spectre d'action des pristinamycines est restreint aux :

- *Cocci* et bacilles à Gram positif (*Staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline, à la méthicilline et à la vancomycine)
- *Cocci* à Gram négatif
- *Haemophilus* sp. *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis* et certaines bactéries à développement intracellulaire (*Chlamydia*, *Rickettsia*) (Samra et al., 2005).

Différentes souches bactériennes e.g. *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Campylobacter* sp., *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycoplasma pneumoniae* et quelques *Enterobacteriaceae* présentent des résistances aux pristinamycines (Barrière et al., 1998).

2^{ème} chapitre

II. Matériels, méthodes et outils numériques

II.1. Micro-organismes et milieux de culture utilisés

II.1.1. Micro-organismes

Streptomyces pristinaespiralis

Les micro-organismes étudiés sont *Streptomyces pristinaespiralis* pr11 et *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. *S. pristinaespiralis* pr11 a été fournie par la société Sanofi-Aventis. C'est une souche industrielle qui a été isolée après une mutation spontanée de la souche *S. pristinaespiralis* ATCC 25486. *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 est une souche de référence obtenue auprès de la collection Allemande de micro-organismes.

Listeria ivanovii

Listeria ivanovii est une bactérie sensible utilisée pour détecter la présence des pristinamycines par dosage microbiologique. Cette souche fait partie de la collection de l'équipe de microbiologie alimentaire du Laboratoire d'Ingénierie des BIOMolécules (LIBIO - ENSAIA, INPL. Nancy).

II.1.2. Milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés pour la croissance de *S. pristinaespiralis* ont été utilisés pour des travaux antérieurs par Corvini (2000) et Saffroy (2006). On rappellera ici les principales caractéristiques des trois milieux utilisés pour la sporulation, la préculture et la culture du microorganisme considéré.

Milieu de sporulation et de dénombrement des spores de S. pristinaespiralis

Pour *S. pristinaespiralis* pr11, la composition du milieu de sporulation et de dénombrement est donnée dans la Table II-1.

Table II-1. Composition du milieu de culture pour la sporulation et le dénombrement de *S. pristinaespiralis* pr11.

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
Extrait de levures	1
Extrait de viandes	1
Dextrines blanches	10
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02
Agar	25

Le pH du milieu est ajusté à 7,2 avant la stérilisation par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C. Le milieu est ensuite transféré dans des boîtes de Pétri. Pour *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, la composition du milieu de culture est donnée dans la Table II-2.

Table II-2. Composition du milieu de culture solide pour *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338.

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
Glucose	4
Extrait de levures	4
Extrait de malt	10
CaCO ₃	0,02
Agar	12

Le pH du milieu est ajusté à 7,2 avant l'ajout de l'agar et avant la stérilisation par autoclavage, 20 minutes à 120°C. Le milieu est ensuite transféré dans des boîtes de Petri.

Composition du milieu complexe insoluble ICS

Le milieu de culture ICS est utilisé pour la germination des spores. La composition de ce milieu est décrite par Paquet (1992), Corvini (2000) et Saffroy (2006) et est rappelée dans la Table II-3. La préparation du milieu ICS se fait en deux étapes. Le corn steep est dans un premier temps préparé séparément en solution à 12,5 g.L⁻¹ et autoclavé pendant 20 minutes

à 120°C. Cette solution est ensuite centrifugée 10 min à 10000 g puis le surnageant est passé sur un filtre plissé. Le filtrat est alors utilisé avec le reste des éléments pour la préparation du milieu ICS.

Table II-3. Composition du milieu complexe ICS.

Composé	Concentration
Corn steep en solution	40 % (v/v)
Saccharose	15 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1 g.L ⁻¹
NaCl	3 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2 g.L ⁻¹
CaCO ₃	1,25 g.L ⁻¹

Le pH est ajusté à 6,8 avec une solution de NaOH 30 %, puis le CaCO₃ est ajouté. Le milieu est réparti par volumes de 40 mL dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 mL de volume total. La stérilisation se fait par autoclavage, pendant 20 minutes à 120 °C.

Milieu de culture synthétique MPS2

Le milieu MPS2 est utilisé pour la croissance de *S. pristinaespiralis* et la production des pristinamycines. La composition de ce milieu est donnée dans la Table II-4. Le pH est ajusté à 6,8 par ajout d'une solution de NaOH à 30 % et stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C. Pour éviter les réactions de Maillard et les précipitations, les solutions de glucose ainsi que les sels K₂HPO₄ et CaCl₂. 2H₂O sont préparés et stérilisés séparément.

Milieus de culture de *Listeria ivanovii*

Le milieu TSB-YE utilisé pour la culture sur milieu liquide de *Listeria ivanovii* est un mélange de bouillon-CASO et d'extrait de levures à des concentrations respectives de 30 et 6 g.L⁻¹. En culture solide, 12 g.L⁻¹ d'agar sont ajoutés au milieu TSB-YE (milieu TSA-YE).

Table II-4. Composition du milieu synthétique MPS2.

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
Glucose	30
Acide malonique	7,5
L-arginine	3
L-glutamate	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,015
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,55
Acide 3-morpholinopropanesulfonique (MOPS)	20
K ₂ HPO ₄	0,75
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4

II.2. Mise en œuvre des cultures

II.2.1. Systèmes de culture

Dans cette étude, des fioles lisses d'Erlenmeyer sont utilisées. Ces fioles sont fournies par Schott (Clichy, France). Ces fioles ont des volumes totaux de 250, 500 et 1000 mL. Les dimensions de ces fioles sont indiquées dans la Figure II-1.

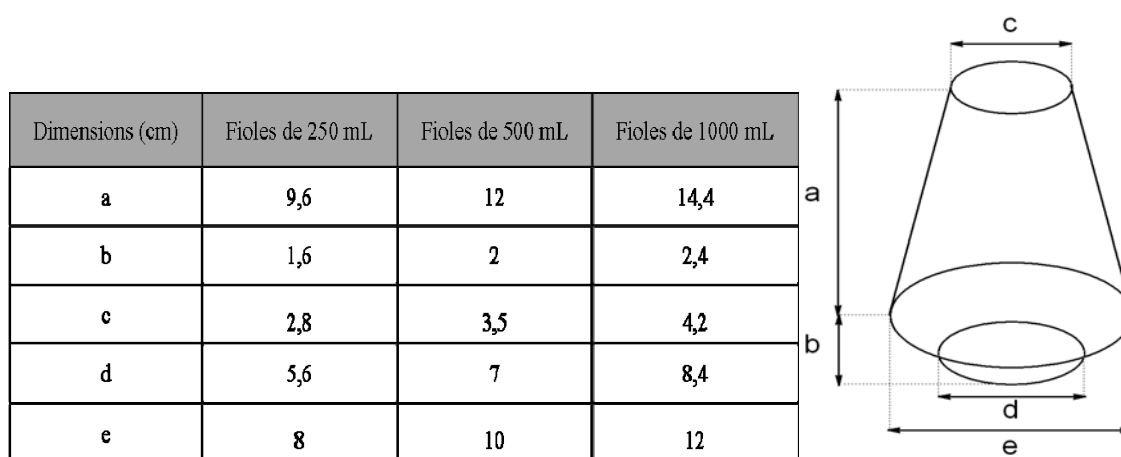


Figure II-1 : Dimensions des fioles lisses d'Erlenmeyer utilisées dans cette étude

II.2.2. Conditions opératoires

II.2.2.1. Préparation et conservation du stock de spores de *S. pristinaespiralis*

A partir d'un stock de spores conservé à -20°C , des étalements sont réalisés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de sporulation et de dénombrement. Ces boîtes sont incubées à 28°C jusqu'à l'apparition d'un tapis de spores grises matures. Généralement, cette étape dure 2 à 3 semaines.

Pour récupérer ces spores, 2 mL d'eau glycérolée stérile à 20 % (v/v) sont ajoutés par boîte puis les spores et le mycélium sont décrochés à l'aide d'un fil à boucle. La suspension est alors collectée puis filtrée stérilement sur du coton cardé qui retiendra le mycélium et ne laissera passer que les spores. La suspension de spores est ensuite répartie en microtubes et conservée à -20°C .

II.2.2.2. Préculture de *S. pristinaespiralis* sur milieu complexe

Les milieux ICS (40 mL dans des fioles de 250 mL) sont ensemencés avec 1 mL du stock de spores contenant 3.10^7 CFU.mL⁻¹. Les milieux ICS sont incubés à 28°C , sous agitation (250 rpm).

II.2.2.3. Culture de *S. pristinaespiralis* sur milieu synthétique en fiole d'Erlenmeyer

Après 20 h de préculture sur ICS, la culture de *S. pristinaespiralis* est conduite dans des fioles d'Erlenmeyer (Figure II-2) de volume total variable (250, 500 et 1000 mL). Les volumes de remplissage relatifs varient entre 2 et 20 % du volume total de la fiole, deux vitesses d'agitation de 250 ou 350 rpm et deux diamètres de table d'agitation (2,5 ou 5 cm) sont utilisés durant la culture afin de modifier la puissance dissipée volumique (P / V) et le coefficient volumique de transfert d'oxygène (k_{La}). Le milieu est ensemencé avec la préculture puis placé sur une table d'agitation à 28°C .

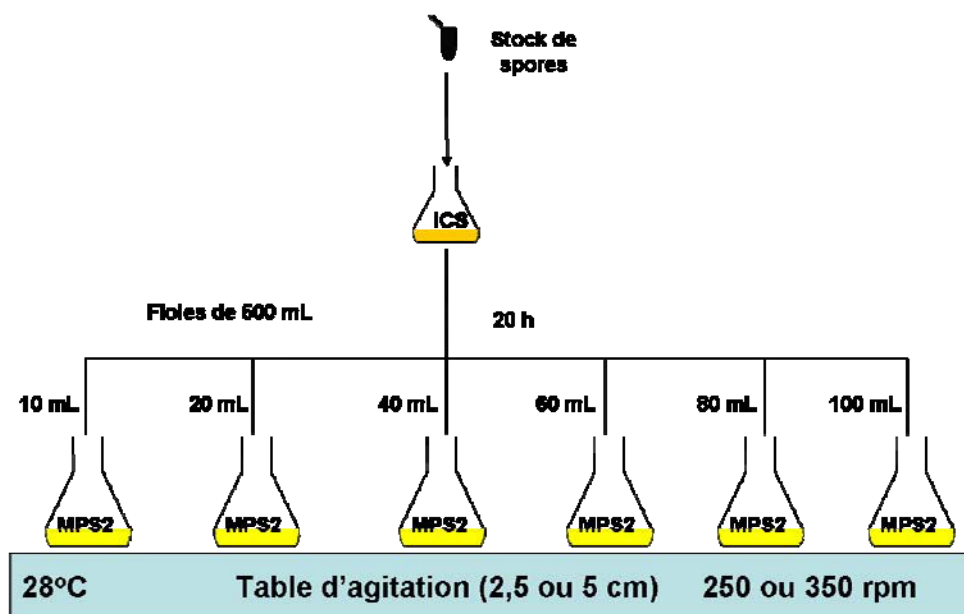


Figure II-2 : Exemple de protocole de culture mis en œuvre avec les fioles d'Erlenmeyer de 500 mL de volume total.

Le moût constitué du milieu avec les cellules est utilisé pour le dosage de la concentration en biomasse et de la viscosité. Une partie du moût prélevé est centrifugée pendant 10 min à 15000 rpm, puis les surnageants sont filtrés sur filtre Millex[®] (Billrica, Etat-Unis) de porosité 0,22 μm . Les surnageants ainsi obtenus sont utilisés pour le dosage des concentrations en glucose, des acides aminés, de l'acide malonique, du phosphate, de l'ammonium et pour la détection microbiologique et la mesure de la concentration des pristinamycines.

II.3. Mesure de la concentration en biomasse et des métabolites extracellulaires

II.3.1. Mesure de la concentration en biomasse

L'estimation de la concentration en biomasse se fait par une méthode spectrophotométrique (Lubbe et al., 1985). Les prélèvements sont dilués au dixième afin de mesurer une absorbance inférieure à 1, en respectant le protocole suivant: 1 mL de moût est

ajouté à 1 mL de HCl 2,5 N et 8 mL d'eau distillée. Les pelotes sont ensuite désagrégées par traitement aux ultrasons à une puissance de 40 W pendant 40 s. Ce traitement peut être répété une seconde fois si les pelotes n'ont pas été suffisamment désagrégées. Toutefois, un traitement trop long de l'échantillon peut être néfaste et entraîner une lyse cellulaire. La mesure de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 660 nm par comparaison avec un blanc contenant 1 mL de milieu sans bactérie, 1 mL d'HCl 2,5 N et 8 mL d'eau. La quantité de poids sec MS (g.L^{-1}) est déterminée à partir de la formule de corrélation absorbance (Abs) / poids sec (Corvini, 2000) suivante:

$$MS = (Abs + 0,28204)/1,7695 \quad (\text{II-1})$$

Une vérification de cette corrélation a été réalisée au cours d'une culture en mode discontinu pendant la phase de croissance. L'écart entre la biomasse estimée et la biomasse pesée après déshydratation complète est de 3 %.

II.3.2. Détection des pristinamycines par test microbiologique

Le test microbiologique est une méthode qualitative permettant de mettre en évidence la présence de l'antibiotique dans l'échantillon. Pour cela, *L. ivanovii*, naturellement sensible aux pristinamycines, est utilisée. Après croissance de cette souche sur milieu TSB-YE, 100 mL de milieu TSA-YE sontensemencés avec 1 mL de la culture de *L. ivanovii* et réparti en boîtes de Pétri à raison de 12 mL de milieu par boîte. Après solidification du milieu à 4°C, des puits sont réalisés dans la gélose à l'aide de cloches de Durham stériles. Le surnageant de la culture à tester est filtré sur filtre Millex[®] de porosité 0,22 μm et 20 μl sont déposés dans chaque puits. Les boîtes sont tout d'abord placées 3 h à 4°C afin de permettre la diffusion du dépôt dans la gélose, puis incubées à 30°C. Après 24 h, la présence d'antibiotiques dans l'échantillon testé est mise en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition de croissance de la souche cible autour du puits où l'échantillon a été déposé.

II.3.3. Extraction et dosage des pristinamycines

L'extraction et le dosage des pristinamycines sont réalisés selon un protocole précédemment décrit (Paquet et al., 1992).

Extraction

Pour l'extraction des pristinamycines, 1 volume de moût est ajouté à 2 volumes de phase mobile (34 % (v/v) acétonitrile et 66 % (v/v) tampon phosphate 0,1 M pH 2,9). Ce mélange est agité pendant 20 min sur une table d'agitation à 250 rpm, puis centrifugé 10 min à 15000 rpm. Le surnageant est filtré sur filtre Millex[®] de porosité 0,22 µm pour le dosage par CLHP.

Dosage par CLHP des pristinamycines

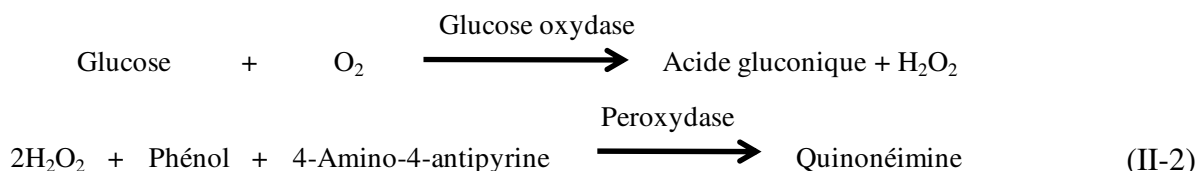
Une chaîne de Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) (Shimadzu LC-10AD -VP, Champs-sur-Marne, France) munie d'une colonne 5C8 Nucléosil 4,6*150 mm (Interchim, Montluçon, France) a été utilisée pour le dosage des pristinamycines. La phase mobile utilisée pour l'extraction est dégazée en ligne à l'hélium. Le débit d'élution est de 0,8 mL.min⁻¹. Le dosage est effectué à température ambiante, le volume injecté est de 20 µL et la détection est réalisée à 206 nm (pristinamycines II) et 193 nm (pristinamycines I). Des solutions mères de pristinamycines I_A (100 mg.L⁻¹) et pristinamycines II_A (200 mg.L⁻¹) sont utilisées pour réaliser les gammes étalons. Au cours de ce travail, une colonne Altima HPC18 Amide 5u (150 mm x 2.1 mm) (Deerfield, Irlande) a également été utilisée pour le dosage des pristinamycines selon le même protocole.

II.3.4. Dosage de l'acide malonique

La méthode de détection des acides organiques est celle précédemment décrite par Rondags et al. (1998). Une chaîne CLHP Waters (Milford, Etats-Unis) munie d'une colonne polypore H (Brownlee Labs, A.B.I., Santa Clara, Etats-Unis) a été utilisée. La température de la colonne est maintenue à 65°C. La phase mobile utilisée est une solution de H₂SO₄ à 0,04 mM. Le débit d'élution est de 0,9 mL.min⁻¹. Le volume injecté est de 20 µL et la détection est réalisée à 210 nm. Des solutions standards d'acide malonique (1 g.L⁻¹ – 10 g.L⁻¹) sont préparées et conservées à -20°C.

II.3.5. Dosage du glucose

Le dosage du glucose a été réalisé à l'aide d'un kit enzymatique (Glucose PAP, Elitech, France) et d'un automate Vitalab Selectra E (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le procédé de dosage est basé sur le couplage des réactions enzymatiques suivantes :



L'apparition de la quinonéimine est détectée à 500 nm. L'erreur de mesure par cette méthode est estimée à environ 5 %.

II.3.6. Dosage des ions ammonium

Le dosage des ions ammonium a été réalisé à l'aide d'une électrode à diffusion gazeuse (Orion, Boston, Etats-Unis). En milieu fortement alcalin, les ions ammonium du milieu de culture sont transformés en NH_3 gazeux selon la réaction suivante:



L'équilibre est déplacé vers la formation d'ammoniaque par addition de 3 mL de soude 0,2 N à 3 mL de l'échantillon à analyser. Le pH du mélange final est proche de 12. L'ammoniaque formée se diffuse à travers la membrane perméable de l'électrode et entraîne une variation du potentiel selon la loi de Nernst :

$$E = E_0 - S \cdot \log[\text{NH}_3] \quad (\text{II-4})$$

E_0 est le potentiel de référence (ordonné à l'origine) (mV) et S est la pente de la courbe d'étalonnage. L'étalonnage est réalisé avec des solutions de NH_4Cl de molarité connue (0,5-20 mM) en traçant le logarithme de la concentration en NH_4Cl en fonction du potentiel de l'électrode (mV). L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10 %.

II.3.7. Dosage du phosphate

En milieu acide et réducteur, les phosphates forment avec l'acide molybdique un complexe phosphomolybdique-molybdeux de couleur bleue. Une gamme étalon est réalisée

avec du Na_2HPO_4 (de 1 à 5 mM). Le mélange réactionnel est composé d'acide ascorbique 10 % (1/6 v/v) et d'une solution de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$ à 0,42 % dans H_2SO_4 1 N (5/6, v/v). 50 μL de l'échantillon à doser sont ajoutés à 250 μL d' HCl 0,5 N. 700 μL du mélange réactionnel sont ensuite ajoutés et le tout est incubé 20 min à 45°C. L'absorbance des échantillons est mesurée à 820 nm.

II.3.8. Dosage du glutamate et de l'arginine

Principe

Glutamate et arginine sont analysés par CLHP (LC – 20AD, Shimadzu France, Champs-sur-Marne, France). L'ortho-phthalaldéhyde (OPA) est utilisé comme réactif de fluorescence de dérivation pour cette séparation. Cette réaction est très sensible, sélective et réalisée à température ambiante. La séparation a été réalisée dans une colonne chromatographique en phase inversée Shim-pack CLC-ODS (6,0 mm ID x 150 mm). La colonne de garde et la pré-colonne sont respectivement une Shim-pack G-ODS (4,0 mm ID x 100 mm) et une Shim-pack GRD-ODS (4,0 mm ID x 250 mm). Un four CTO-20A est employé afin de maintenir la température de la colonne à 45°C. La détection est effectuée par mesure de la fluorescence (Prostar, Varian, Walnut Creek, Etat-Unis). Au cours de cette séparation, les longueurs d'onde d'excitation et de mesure ont été respectivement de 350 et 460 nm.

Préparation des réactifs

Un tampon de borate de sodium est utilisé comme réactif. Ce réactif est préparé par dissolution de 100 mM d'acide borique dans de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 9,0 par ajout d'hydroxyde de sodium. L'acide β -mercaptopropionique est préparé en ajoutant 10 μL d'acide β -mercaptopropionique dans 10 mL de solution tampon de borate de sodium. La solution d'OPA est préparée par dissolution de 20 mg dans 3 mL d'acétonitrile et par ajout de 10 mL de solution tampon de borate de sodium. Pour réaliser la dérivation, la solution tampon de borate de sodium, l'échantillon et la solution d'OPA sont ajoutés successivement dans une bouteille munie d'un septum. Ces réactifs sont mélangés par aspiration et refoulement successifs. Après quelques minutes de réaction, une partie du mélange est injectée dans la colonne. Toutes les opérations mentionnées ci-dessus sont conduites automatiquement par l'auto-injecteur SIL-20A (Shimadzu, Champs-sur-Marne, France).

Préparation de la phase mobile

La solution tampon à pH 6,8 est préparée en dissolvant 5 mM de phosphate de sodium dihydrate et 5 mM de phosphate disodium dans de l'eau distillée (phase A). La phase B est préparée en mélangeant 300 mL d'acétonitrile à 600 mL de phase A. En outre, une solution eau/acétonitrile (20 / 80 % v/v) est utilisée comme solution de lavage (phase C). L'élution est réalisée en utilisant un gradient de phases A et B à un débit constant de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ comme suit : 95 % de phase A et 5 % de phase B pendant 1 min, 95-0 % de phase A et 5 -100% de phase B pendant 9 min, 100 % de phase B pendant 5 min., 100-0 % réactif B pendant 1 min. La colonne est ensuite lavée avec la phase C pendant 5 min (Figure II-3).

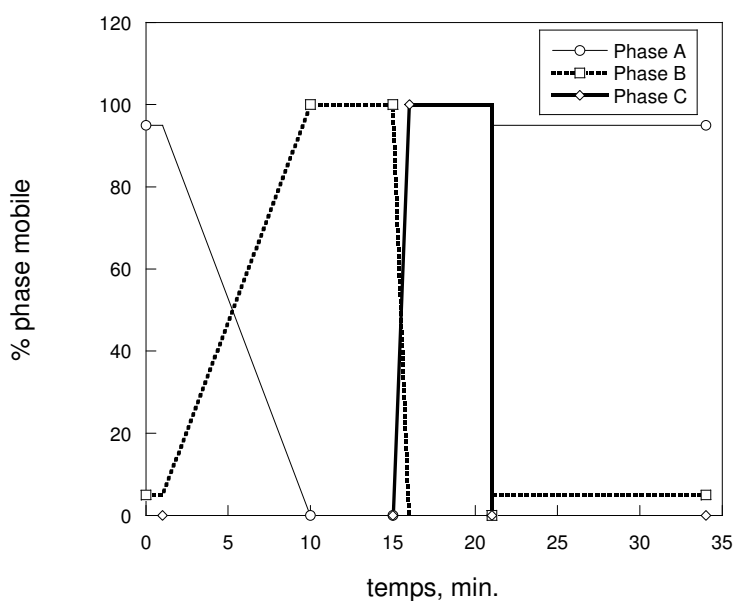


Figure II-3 : Profil d'élution appliqué pour la séparation et la quantification du glutamate et de l'arginine.

Préparation des échantillons

Après décongélation, les moûts sont centrifugés pendant 10 min à 15000 rpm, puis les surnageants sont filtrés sur filtre Millex[®] de porosité $0,22 \mu\text{m}$. Les échantillons doivent éventuellement être dilués afin que la concentration maximum en acides aminés ne dépasse pas 2,5 mM. La gamme étalon est ainsi préparée entre 0,25 et 2,5 mM.

II.4. Mesure du diamètre des pelotes

Analyse par Malvern

La taille des pelotes mycéliennes a été mesurée en cours de cultures par diffraction laser (Mastersizer, Worcestershire, Royaume-Uni). Ce système se compose d'un laser He-Ne comme source de rayonnement et de plusieurs détecteurs pour mesurer la répartition, sur une large gamme d'angles, de la lumière produite (Figure II-4).

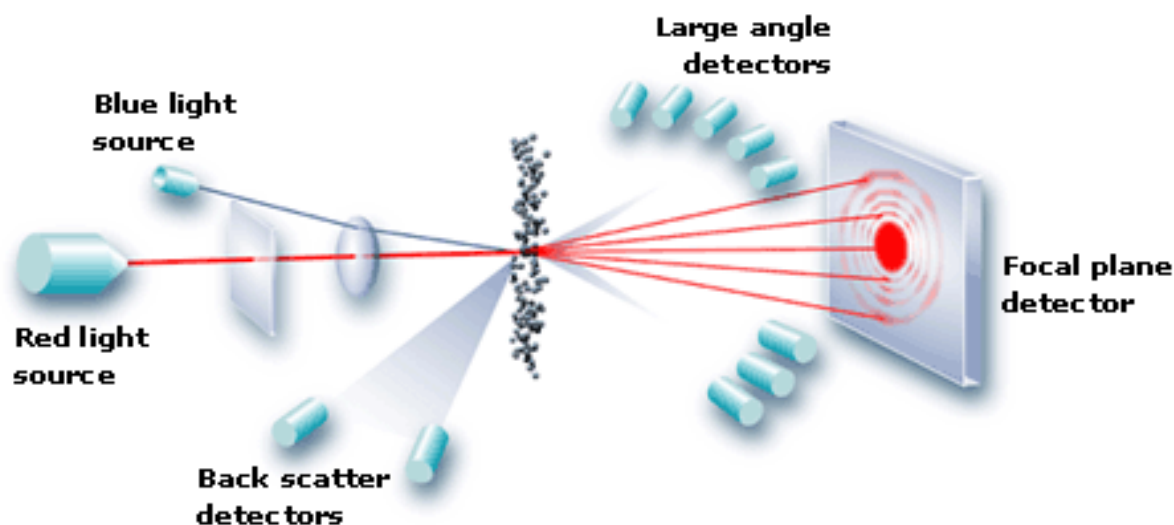


Figure II-4 : Principe de la mesure par diffraction optique du Mastersizer, Malvern (document Malvern).

Le principe de base de cette mesure est la diffusion de la lumière observée lorsque des particules traversent le faisceau laser. L'angle de la lumière laser diffusée dépend de la taille de la particule ; une grande dispersion des particules est constatée pour des angles faibles tandis qu'une faible dispersion est constatée à des angles élevés. La diffraction laser est décrite avec précision par l'approximation de Fraunhofer et la théorie de Mie, avec l'hypothèse d'une morphologie sphérique des particules. Cette technique peut être utilisée pour mesurer la taille des particules dans la gamme de 0,02 à 2000 μm .

La limite inférieure et supérieure de l'obscurité a été fixée à 10 et 30 % respectivement. Ces limites ont été suffisantes pour obtenir un bon ratio bruit/signal. La

culture est supposée posséder les propriétés optiques de l'eau (Lin et al., 2010). Les angles de la lumière laser diffractée par des pelotes microbiennes fournissent un profil de diffraction caractéristique collecté par les détecteurs et enregistré par un logiciel dédié (Mastersizer, version 2.17). Le diamètre moyen en volume $d_{4,3}$ a été considéré comme représentatif du diamètre des pelotes d'un échantillon. On considèrera par la suite que $d_p = d_{4,3}$.

Observation sous microscope

Le microscope DMRB; Leica Leitz (Wetzlar, Allemagne) est utilisé pour l'observation sur fond clair (Figure II-5).

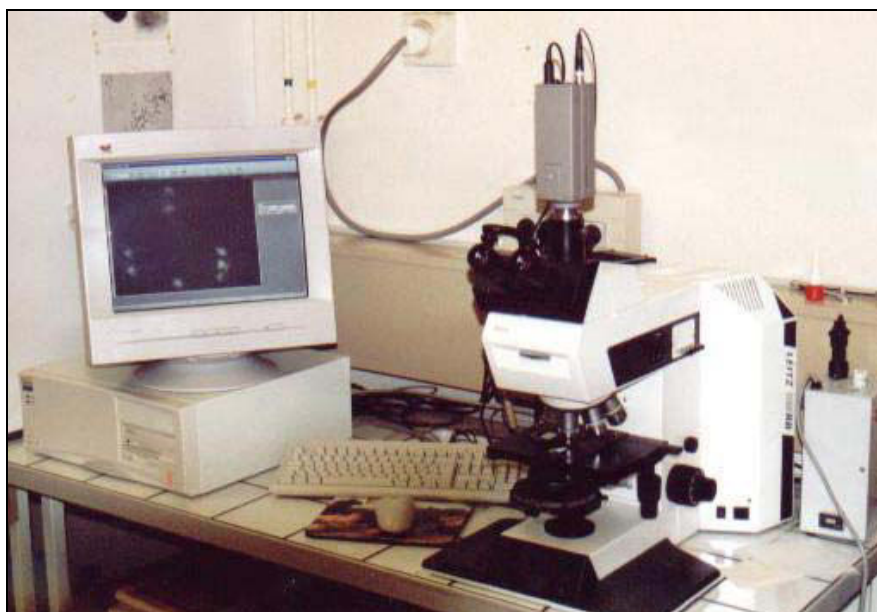


Figure II-5 : Microscope DMRB surmonté de la caméra Cohu 4910 et PC de contrôle et d'acquisition.

Plusieurs objectifs comme le PL FLUOTAR X 10 0,30 et le PL FLUOTAR X 40 sont utilisés. Des images sont prises à l'aide d'une caméra Cohu 4910 (Cohu, San Diego, USA) monochrome équipée d'un capteur à 256 niveaux de gris. L'acquisition des images se fait par l'intermédiaire du logiciel Kappa ImageBase Control 2.5 (Kappa opto electronics GmbH, Gleichen, Allemagne).

II.5. Caractérisation du transfert d'oxygène

Le coefficient volumique de transfert d'oxygène (k_La) a été estimé pour toutes les conditions opératoires de culture. La vitesse de transfert d'oxygène (OTR) a été mesurée expérimentalement au cours du temps et calculée lors des cultures réalisées en fioles d'Erlenmeyer. Cette vitesse de transfert sera assumée égale à la consommation globale d'oxygène (OUR).

II.5.1. Estimation semi-empirique du coefficient volumique de transfert d'oxygène

Différents modèles (van Suijdam et al., 1978; Henzler et Schedel, 1991; Veljkovic et al., 1998; Veglio et al., 1991) ont été proposés pour calculer le coefficient de transfert d'oxygène. Nous avons utilisé l'équation empirique proposé par Maier (2002) et utilisé par Seletzky et al. (2007). Cette corrélation est valable pour les fioles d'Erlenmeyer et les conditions opératoires utilisées dans notre étude.

$$k_La = 6,67 \cdot 10^{-6} N^{1,16} V_L^{-0,83} d_0^{0,38} d^{1,92} \quad (\text{II-5})$$

Dans cette relation, k_La est le coefficient volumique de transfert (s^{-1}), N la vitesse d'agitation (min^{-1}), V_L le volume de remplissage (mL), d_0 le diamètre de table d'agitation (cm) et d le diamètre caractéristique des fioles (cm).

II.5.2. Vitesse de transfert d'oxygène

La vitesse de transfert d'oxygène dans des fioles agitées lisses a été mesurée expérimentalement. Sa valeur maximale a également été calculée par des équations empiriques.

II.5.2.1. Mesure expérimentale de l' OTR

La vitesse de transfert de l'oxygène est mesurée par l'appareil proposé par Anderlei et Büchs (2001) et Anderlei et al. (2004).

Description de l'appareil

Pour la mesure de l'*OTR*, l'appareil RAMOS (Respiratory Activity MOnitoring System) a été utilisé. Cet appareil se compose d'une table d'agitation qui supporte huit fioles. Il est connecté à un ordinateur qui recueille les données expérimentales de chaque fiole pendant la culture.

Description des fioles de mesure utilisées

Pour la mesure de l'*OTR*, des fioles spécifiques de mesure sont utilisées (Figure II-6).

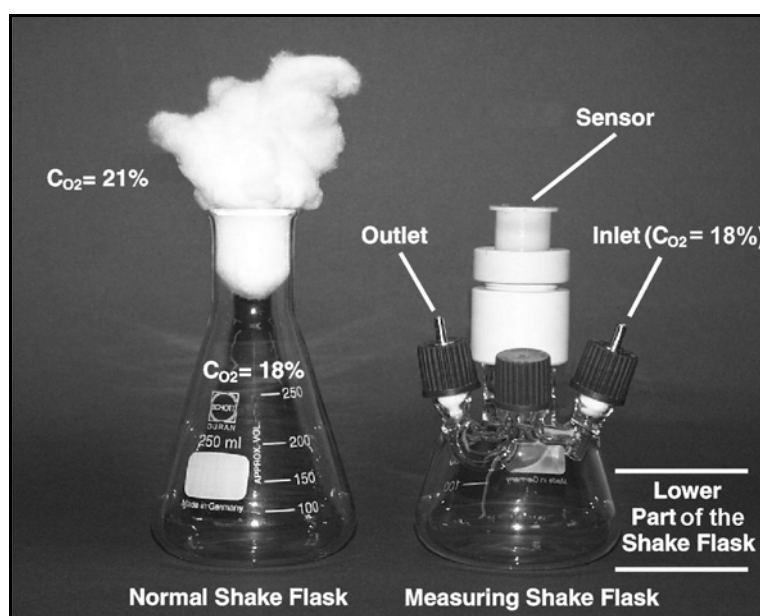


Figure II-6 : Comparaison entre une fiole lisse d'Erlenmeyer de 250 mL de volume total et une fiole de mesure de l'*OTR* (Anderlei et Büchs, 2001).

L'intérêt principal de cette géométrie est de présenter des conditions hydrodynamiques de la phase liquide et de composition de la phase gaz identiques à celles des fioles de culture de type Erlenmeyer. Ainsi, même si la partie basse des fioles de mesure reste la même que celle des fioles normales, leur partie supérieure est modifiée et contient trois ouvertures. La première de ces ouvertures permet l'entrée de l'air, la deuxième sa sortie et la troisième l'ajout des milieux et de l'inoculum. Pour éviter la contamination de ces fioles, des filtres stériles sont ajoutés dans les ouvertures. Le capteur permettant la mesure de la pression partielle

d'oxygène est monté dans la partie centrale supérieure. Ce capteur n'est pas en contact avec le liquide et ne perturbe donc pas son écoulement.

Pour maintenir une composition du gaz similaire à celles des conditions de culture, un modèle mathématique a été développé par Mrotezik et al. (2001). Ce modèle est capable de calculer la composition des gaz dans l'espace libre des fioles en cours de culture. Selon ce modèle, la concentration d'oxygène à l'intérieur des fioles a été estimée à 18 % contre 21 % à l'extérieur. Avec cette information, l'ordinateur connecté à l'appareil de mesure, contrôle le débit d'air (Figure II-7a).

Cycles de mesure

Le cycle de mesure est précédé par une phase de rinçage (Figure II-7b).

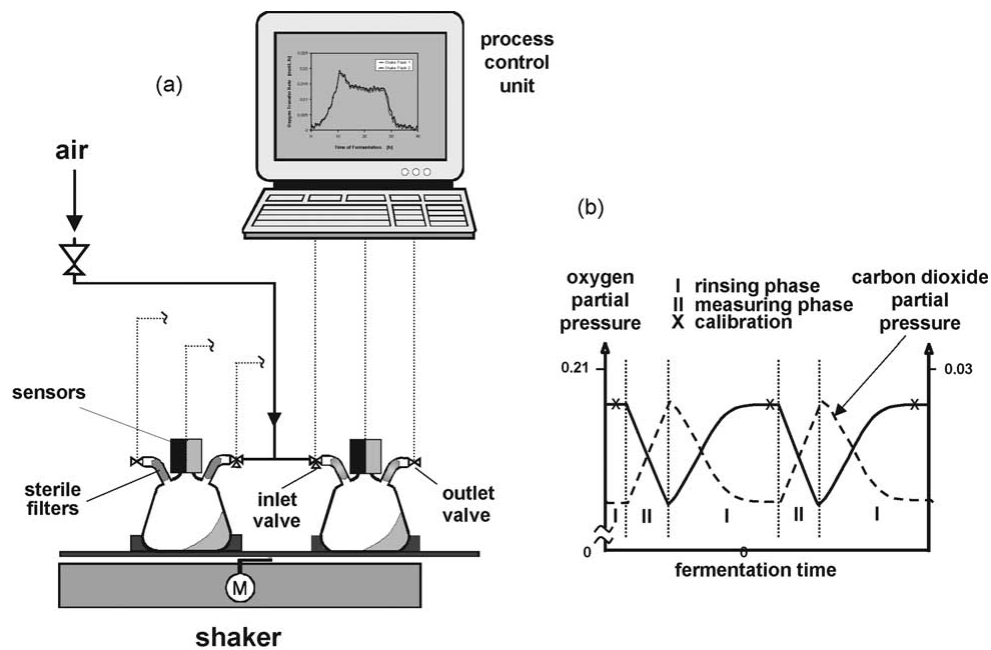


Figure II-7 : (a) Principe et mise en place générale du RAMOS. (b) Evolution de la pression partielle d'oxygène et de dioxyde de carbone au cours d'un cycle de mesure: (—) pression partielle d'oxygène et (- - -) pression partielle du dioxyde de carbone (Anderlei et al., 2004).

Pendant la phase de rinçage, les vannes d'entrée et de sortie de l'air sont ouvertes (la troisième vanne reste toujours fermée pendant la culture). L'air contenu dans la fiole est alors évacué et remplacé par un gaz assimilé à de l'air mais contenant 18 % d'oxygène. Cette phase dure environ 20 minutes. Au début de la phase de mesure, les vannes d'entrée et de

sortie d'air sont fermées. Les micro-organismes présents dans le milieu de culture consomment alors l'oxygène, ce qui induit une diminution de la pression partielle d'oxygène et une augmentation de la pression partielle de dioxyde de carbone.

Ces mesures permettent d'accéder à la vitesse de transfert d'oxygène (*OTR*) selon l'équation suivante :

$$OTR = \frac{\Delta pO_2}{\Delta t} \frac{V_G}{RTV_L} \quad (\text{II-6})$$

avec ΔpO_2 la différence de pression partielle d'oxygène (bar), R la constante des gaz parfaits ($\text{bar.L.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T la température (K), V_L le volume de remplissage (L), V_G le volume de gaz (L) et Δt la durée de la phase de mesure (h).

La phase de mesure est achevée en 10 minutes. Après la phase de mesure, les vannes sont ouvertes et débute alors le prochain cycle de mesure. Les cycles de mesure sont répétés en continu pendant la culture. Avant chaque phase de mesure, les capteurs sont calibrés selon la composition connue du gaz à l'état d'équilibre afin de compenser une éventuelle dérive du signal.

Quelques exemples de courbes types de l'OTR

En travaillant avec différents micro-organismes, cultivés dans différents milieux, Anderlei et Büchs (2001) ont proposé plusieurs types de courbes d'*OTR* (Figure II-8). Ces graphiques permettent de déterminer si la croissance du micro-organisme est normale (Figure II-8-1), limitée en substrat (Figure II-8-2), limitée en oxygène (Figure II-8-3), inhibée par le produit (Figure II-8-4) ou présente une diauxie (Figure II-8-5).

Cette mesure de la vitesse de transfert d'oxygène permet d'accéder à la consommation globale d'oxygène (*OUR* ou Oxygen Uptake Rate) dans une condition de culture donnée en supposant que l'*OUR* est égal à l'*OTR*.

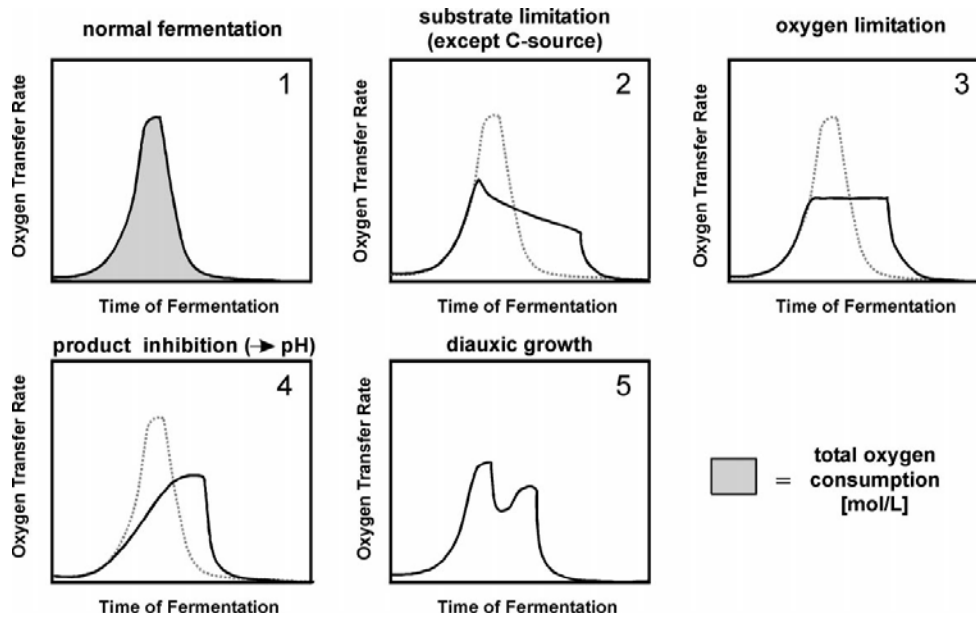


Figure II-8 : Interprétation des profils d'OTR proposée par Anderlei et Büchs (2001).

II.5.2.2. Modèle semi-empirique pour la détermination de l' OTR_{max}

L' OTR_{max} représente la quantité maximale d'oxygène transférable à la phase liquide en un temps donné. Elle peut être calculée par l'équation empirique proposée par Maier et Büchs (2004) pour des fioles lisses:

$$OTR_{max} \propto N^{0,84} V_L^{-0,84} d_0^{0,27} d^{-1,25} \quad (II-7)$$

avec OTR_{max} la vitesse maximum de transfert d'oxygène ($\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), N la fréquence d'agitation (s^{-1}), V_L le volume de remplissage (mL), d_0 le diamètre de la table d'agitation (cm) et d le diamètre maximal des fioles agitées (cm).

II.6. Calculs des vitesses spécifiques expérimentales de croissance, consommation et production

Les données expérimentales de concentration en biomasse, nutriments et antibiotiques sont interpolées afin de calculer les vitesses spécifiques instantanées entre deux points interpolés i et $i+1$. Les expressions suivantes sont ainsi obtenues.

Vitesse spécifique de croissance

$$\mu = \frac{1}{X^{i+\frac{1}{2}}} \cdot \frac{\Delta X^{i \rightarrow i+1}}{\Delta t^{i \rightarrow i+1}} \quad (\text{II-8})$$

avec μ la vitesse spécifique de croissance (h^{-1}), X la concentration en biomasse (g.L^{-1}) et t le temps (h).

Vitesse spécifique de consommation des substrats

$$\nu = \frac{1}{X^{i+\frac{1}{2}}} \cdot \frac{\Delta S^{i \rightarrow i+1}}{\Delta t^{i \rightarrow i+1}} \quad (\text{II-9})$$

avec ν la vitesse spécifique de consommation de substrat ($\text{g.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$), S la concentration des substrats (g.L^{-1}) et t le temps (h).

Vitesse spécifique de production des pristinamycines

$$\pi = \frac{1}{X^{i+\frac{1}{2}}} \cdot \frac{\Delta P^{i \rightarrow i+1}}{\Delta t^{i \rightarrow i+1}} \quad (\text{II-10})$$

avec π la vitesse spécifique de production du produit ($\text{mg.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$), P la concentration de pristinamycines (mg.L^{-1}) et t le temps (h).

Vitesse spécifique de consommation d'oxygène

$$q_{O_2} = \frac{OUR^i}{X^i} \quad (\text{II-11})$$

avec q_{O_2} la vitesse spécifique de consommation d'oxygène ($\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$).

II.7. Rhéologie des suspensions bactériennes

II.7.1. Dispositif expérimental

Les suspensions de bactéries filamenteuses peuvent, selon leur morphologie, présenter une modification de leur viscosité voire un comportement non-Newtonien, ce qui peut impacter les propriétés de transfert de matière du bioréacteur. Le comportement rhéologique

des suspensions utilisées, à différentes concentrations de la biomasse a donc été mesuré à l'aide d'un rhéo-réacteur. Le principe de cet appareil est décrit par Nzihou et al. (2004) et Ait Kadi et al. (2002). Il se compose d'un cylindre équipé d'un double ruban hélicoïdal relié à un rhéomètre RFS II (Piscataway, Etats-Unis) (Figure II-9). Ce rhéo-réacteur permet d'obtenir les valeurs de viscosité à différents taux de cisaillement à partir des mesures de couple et de vitesse angulaire du rotor. Il est alors possible d'identifier le comportement Newtonien ou non Newtonien de la suspension à partir du rhéogramme obtenu.

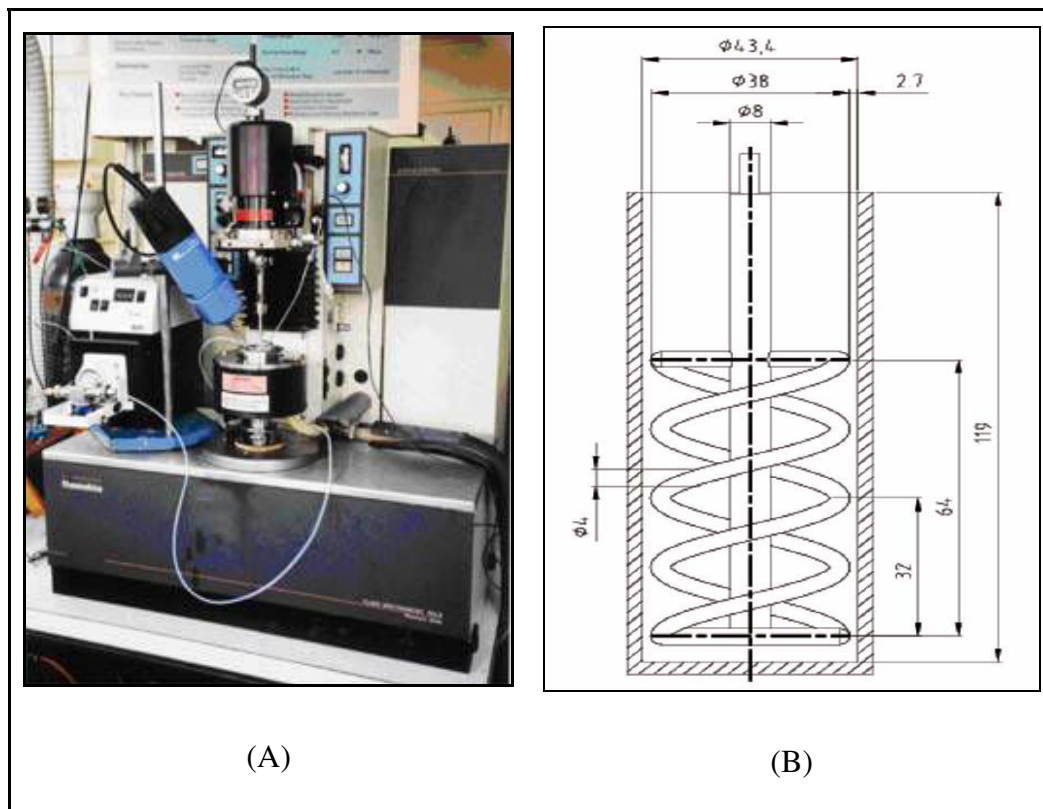


Figure II-9. (A) Système utilisé pour mesurer la viscosité (B) Détail du rhéo-réacteur équipé avec un double ruban hélicoïdal (Nzihou et al., 2004).

II.7.2. Éléments généraux de rhéologie

Fluide Newtonien

Si le taux de cisaillement et la contrainte de cisaillement restent proportionnels quel que soit le cisaillement appliqué, le liquide présente un comportement newtonien. La constante de proportionnalité est appelée viscosité Newtonienne (Figure II-10). Elle est donc indépendante

du cisaillement appliqué. Pour ce type de fluide, on n'observe donc pas d'hétérogénéité de viscosité dans le bioréacteur, à l'exception des variations possibles dues aux gradients thermiques éventuels.

Fluide non-Newtonien

Si la contrainte de cisaillement ne varie pas linéairement avec le taux de cisaillement appliqué, on parle alors de comportement non-Newtonien (Figure II-10). En d'autres termes, pour ce type de fluide, la viscosité du liquide dépend du taux de cisaillement. L'hydrodynamique non-Newtonienne est réputée plus complexe que la Newtonienne.

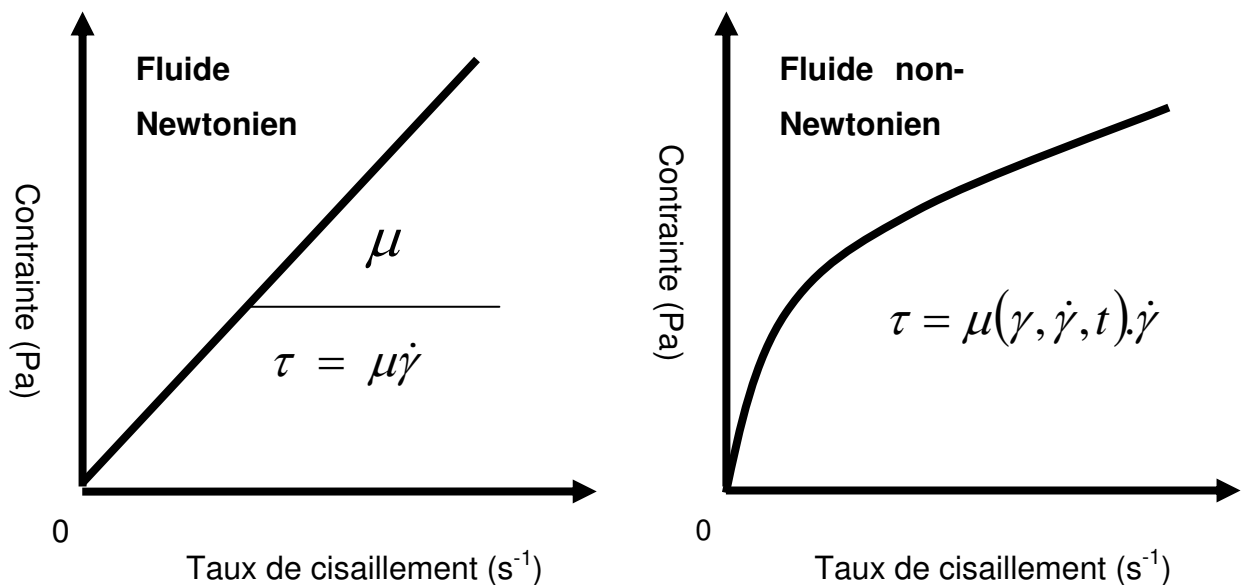


Figure II-10. Relation entre contrainte et le taux de cisaillement pour un fluide Newtonien (à gauche) et non Newtonien (à droite).

II.8. Quantification de la puissance dissipée volumique

La puissance dissipée volumique (P / V) se réfère à la puissance générée par la mise en rotation d'un agitateur dans un volume de liquide, à une vitesse d'agitation donnée et entraînant la circulation du fluide dans le système. Cette puissance dissipée permet la mise en mouvement du liquide et impacte donc le transfert de matière (oxygène, substrats organiques), le transfert de chaleur, les caractéristiques de macro- et micro-mélange ainsi que les temps de

circulation (Ascanio et al., 2004; Lara et al., 2006 ; Nienow, 1990; Nienow, 1994). Typiquement, les corrélations semi-empiriques permettant d'accéder à la puissance dissipée pour une géométrie donnée relie un nombre de Newton ou nombre de puissance Ne à un nombre de Reynolds d'agitation. Tandis que de nombreuses études de la littérature ont été dédiées à l'écriture de ces relations en cuves agitées mécaniquement, peu d'informations sont disponibles dans la littérature pour des fioles d'Erlenmeyer agitées sur table d'agitation orbitale. Ainsi, les objectifs de ce paragraphe sont de présenter (i) les méthodes de détermination de la puissance dissipée volumique utilisées dans ce travail de thèse (équations semi-empiriques, mesures expérimentales, mécanique des fluides numérique), (ii) les paramètres pouvant influencer cette dernière ainsi que (iii) la comparaison des méthodes utilisées.

II.8.1. Modélisation semi-empirique

II.8.1.1. Corrélation générale

La première tentative de détermination de la dissipation d'énergie dans des flacons agités est basée sur la mesure d'augmentation de température (Sumino et al., 1972). Cependant, les conclusions de cette étude furent délicates car l'augmentation de la température réelle était assez faible. Une autre méthode de mesure consiste à enregistrer la dissipation totale de la table d'agitation dans son ensemble. Cette méthode a été utilisée avec succès pour évaluer cette grandeur dans des cuves cylindriques de grands volumes (2,1 à 6,9 L) par Kato et al. (1995). Cette méthode s'est avérée peu précise pour de faibles valeurs de remplissage (moins de 0,2 L). Büchs et al. (2000) ont proposé des équations empiriques basées sur des mesures expérimentales (voir paragraphe II.8.2). Selon ces auteurs, la dissipation peut être calculée dans des fioles agitées lisses par la corrélation suivante :

$$\frac{P}{V_L} = Ne' \cdot \rho \cdot \frac{N^3 \cdot d^4}{V_L^{2/3}} \quad (\text{II-12})$$

Avec P / V_L la puissance dissipée volumique ($W.m^{-3}$), Ne' le nombre de Newton modifié, ρ la densité du liquide ($kg.m^{-3}$), N la fréquence d'agitation (s^{-1}), d le diamètre maximum de la fiole (m), V_L le volume de remplissage (m^3). Le nombre de Newton modifié peut être calculé par la corrélation suivante :

$$Ne' = 70 Re^{-1} + 25 Re^{-0.6} + 1.5 Re^{-0.2} \quad (II-13)$$

Avec le nombre de Reynolds donné par:

$$Re = \frac{\rho N d^2}{\mu} \quad (II-14)$$

Les résultats de la corrélation II-12 sont donnés sur la Figure II-11.

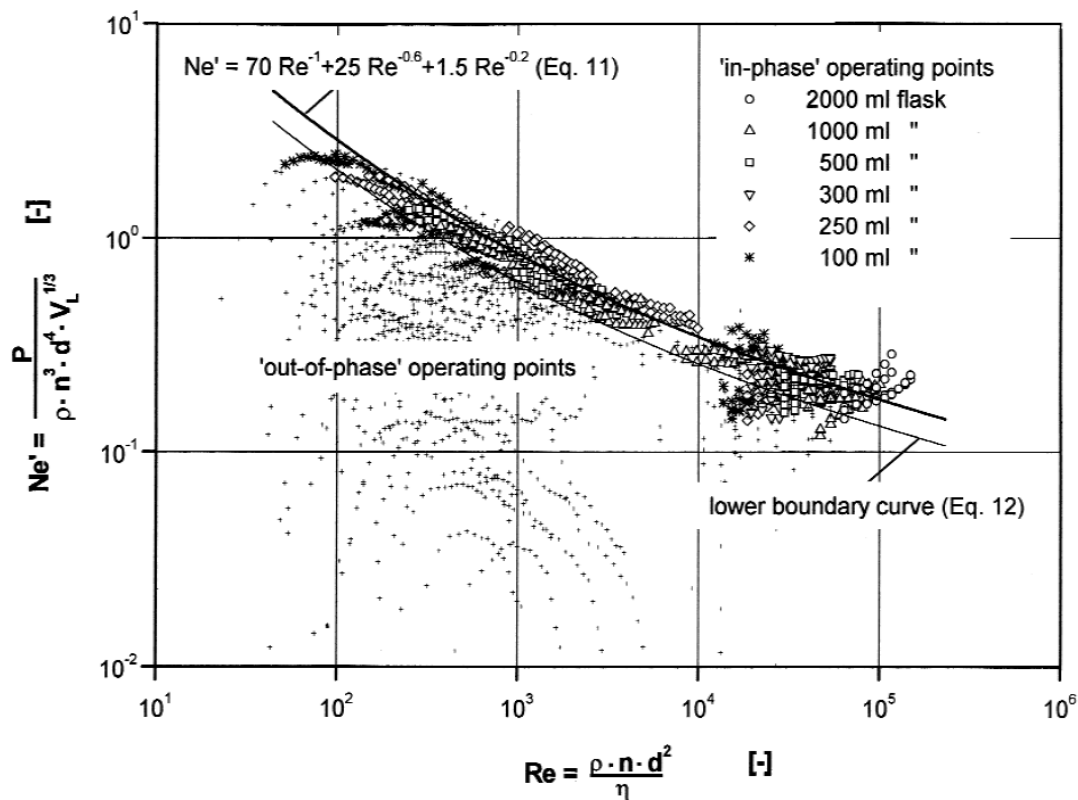


Figure II-11. Corrélation fournissant la puissance dissipée volumique en fioles agitées lisses, d'après Büchs et al. (2000).

II.8.1.2. Facteurs affectant la puissance dissipée volumique

Sur la base de la relation précédemment exposée, il est possible de moduler la puissance dissipée volumique lors des cultures en modifiant l'un des paramètres de culture (taille de

foies, vitesse d'agitation, volume de liquide). La Table II-5 regroupe les influences respectives de chacun de ces paramètres opératoires, dans la gamme de conditions expérimentales testées lors de la présente étude.

Table II-5. Influence des paramètres opératoires sur la puissance dissipée volumique en fioles agitées lisses.

Paramètre	vitesse d'agitation N	densité du liquide ρ	diamètre maximal des fioles d	volume de remplissage V_L
Lien avec P / V , les autres paramètres restant fixes	$P / V \propto N^{2,6}$	$P / V \propto \rho^{0,71}$	$P / V \propto d^{-0,51}$	$P / V \propto V_L^{-2/3}$

Pour des fioles agitées, et contrairement au cas d'un réacteur agité mécaniquement et chicané, la dissipation volumique reste dépendante de la viscosité du milieu de culture, même en régime turbulent. Ainsi, si besoin, il est nécessaire de calculer la viscosité, au moins apparente du milieu de culture, pour une condition opératoire donnée.

II.8.2. Mesure expérimentale de la dissipation volumique

La puissance dissipée volumique a également été mesurée expérimentalement pour une majorité des conditions testées à l'aide du montage développé à l'université d'Aix-la-Chapelle (Büchs et al., 2000; Büchs et al., 2001). Une description de ce montage est présentée Figure II-12.

La table d'agitation, fermement fixée à un cadre, est mise en rotation par un moteur muni d'un capteur de couple (0 à 1 N.m). Les données de couple C et de vitesse N sont enregistrés et sauvegardés sur un PC via un convertisseur A/N. La puissance dissipée totale est alors donnée par $P = 2\pi NC$. Un nombre suffisamment grand de fioles est placé sur la table afin de limiter l'influence relative du bruit de fond de la mesure. Les pertes de puissance issues des frottements mécaniques internes au moteur et de la résistance de l'air sont soustraites grâce à des mesures de référence utilisant des fioles remplies d'agar solidifié de même poids que le liquide. L'agar empêche le mouvement du liquide et donc la

consommation d'énergie. De la différence entre les mesures de couple avec des fioles remplies de liquide (C_1) et celles avec l'agar solidifié (C_2), la puissance dissipée volumique est obtenue par :

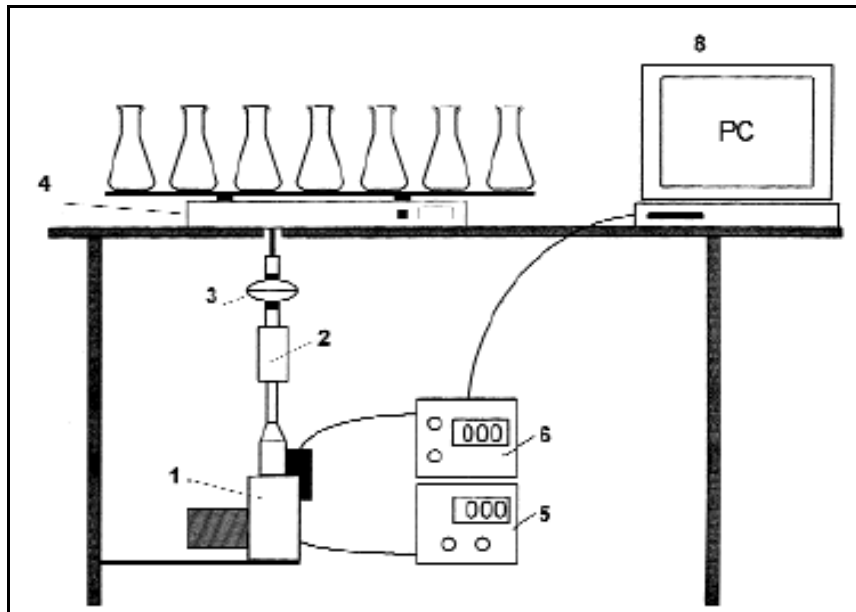


Figure II-12. Système de mesure de la puissance dissipée en fioles agitées. (1) Moteur avec capteur de couple intégré, (2) roue libre, (3) couplage flexible, (4) table agitée, (5) mesure de couple, (6) convertisseur A/N, (8) acquisition des données (Büchs et al., 2000).

$$\frac{P}{V_L} = \frac{(C_1 - C_2) \cdot 2\pi N}{z \cdot V_L} \quad (\text{II-15})$$

Ici C_1 est le couple mesuré avec le liquide (N.m), C_2 est le couple mesuré avec l'agar solidifié (N.m), z est le nombre total des fioles sur la table et V_L est le volume de remplissage de chaque fiole (m^3).

II.8.3. Simulation numérique des écoulements (CFD)

La puissance dissipée volumique a également été calculée par utilisation de la mécanique des fluides numérique (CFD). Les simulations obtenues pourront également permettre, à terme, de prédire les distributions de taux de dissipation et donc d'affiner les

relations cellules / contraintes. Dans le cadre de cette étude, la CFD a été utilisée pour vérifier que cet outil pouvait prédire les dissipations volumiques escomptées en flacons agités et pour estimer les viscosités équivalentes dans le cas de rhéologies non-Newtoniennes. L'hydrodynamique des flacons agités est typiquement un écoulement à surface libre. Ainsi, le calcul de la dissipation ne peut se faire sans un calcul simultané de la déformation de l'interface. De plus, l'aération est surfacique et donc sans inclusion. Les phases gaz et liquide sont donc clairement séparées ce qui justifie pleinement l'utilisation d'une approche par suivi d'interfaces de type Volume Of Fluid (VOF).

II.8.3.1. Approche Volume Of Fluid (VOF)

L'approche VOF a été utilisée pour prédire conjointement les champs de vitesse de la phase liquide et la déformation de la surface libre (Hirt and Nichols, 1981). Cette approche a été appliquée avec succès à de grands flacons agités (Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2009). Elle est basée sur la résolution des équations de transport de Navier-Stokes pour une phase de mélange et d'une équation additionnelle de transport de la fraction volumique de l'une des deux phases (ici la phase gazeuse indiquée g). Dans notre étude, nous avons supposé le transfert de matière entre les deux phases nul, le but du calcul étant la prédiction de la puissance dissipée volumique et non celle du transfert d'oxygène. L'équation de continuité peut donc s'écrire:

$$\frac{\partial(\alpha_g \rho_g)}{\partial t} + \nabla \cdot (\alpha_g \rho_g \mathbf{u}_g) = 0 \quad (\text{II-16})$$

avec \mathbf{u} (m.s^{-1}) la vitesse, α_g la fraction volumique de la phase gazeuse. La contrainte $\alpha_g + \alpha_l = 1$ permet de déduire la fraction de la phase liquide (indiquée l). On considèrera dans les équations suivantes que $\alpha = \alpha_g$. Toutes les autres variables (densité, viscosité) sont partagées par les deux phases:

$$\begin{cases} \rho = \alpha \rho_g + (1 - \alpha) \rho_l \\ \mu = \alpha \mu_g + (1 - \alpha) \mu_l \end{cases} \quad (\text{II-17})$$

Dans le cas où des simulations avec des fluides Newtoniens ont été réalisées, la viscosité est assumée Newtonienne et similaire à celle de l'eau. Dans le cas de fluides non-Newtoniens, une loi rhéologique de Sisko à trois paramètres a été utilisée comme indiqué dans le chapitre

IV et dans le paragraphe IV.1. Cette loi a été intégrée dans Fluent par une sous-routine C++. L'équation de transport de la quantité de mouvement peut alors être résolue:

$$\frac{\partial(\rho \mathbf{u})}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u} \mathbf{u}) = -\nabla p + \mu \Delta \mathbf{u} + \rho \mathbf{g} + \mathbf{F}_{st} \quad (\text{II-18})$$

avec $\mathbf{g} = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$, p (Pa) la pression et \mathbf{F}_{st} (N.m^{-3}) la force de tension de surface donnée par Brackbill (1992):

$$\mathbf{F}_{st} = \sigma \kappa \mathbf{n} \quad (\text{II-19})$$

avec $\sigma = 0,072 \text{ N.m}^{-1}$ la tension de surface eau-air, κ (m) la courbure locale et \mathbf{n} le vecteur normal à l'interface.

II.8.3.2. Paramètres numériques

Le flacon agité a été représenté par un domaine de calcul contenant respectivement 105 000 et 460 000 cellules de calcul tétraédriques dans le cas d'un écoulement Newtonien et non-Newtonien (voir Figure II-13-B). Le maillage obtenu est structuré. Les équations de transport précédentes ont été résolues, en parallèle, à l'aide du logiciel Fluent 6.12.6TM et d'un bi-dual Xeon@1,6 GHz équipé de 3 Go de Ram.

La rotation du flacon sur la table a été représentée par une rotation de la paroi externe et centrée sur le flacon dans un référentiel en contre-rotation et dont le centre est décalé par rapport à la fiole. La longueur de déplacement est égale au diamètre de rotation de la table d'agitation (Figure II-13-A). Les conditions aux limites appliquées sont une entrée d'air à pression atmosphérique en haut du domaine et des murs sans glissement par ailleurs. Les pas de temps choisis sont de 5.10^{-4} s mais des valeurs plus faibles ont été utilisées en début de simulation pour assurer la convergence. Environ dix rotations sont nécessaires pour obtenir une interface gaz-liquide stabilisée, ce qui représente environ 48 h de calcul pour une condition opératoire donnée. Les équations de transport de la quantité de mouvement et de la fraction volumique de gaz ont été respectivement résolues à l'aide d'un schéma UPWIND du second ordre et d'un schéma Geo-Reconstruct. Le couplage pression-vitesse a été résolu par un algorithme PISO, bien adapté aux simulations en régime transitoire.

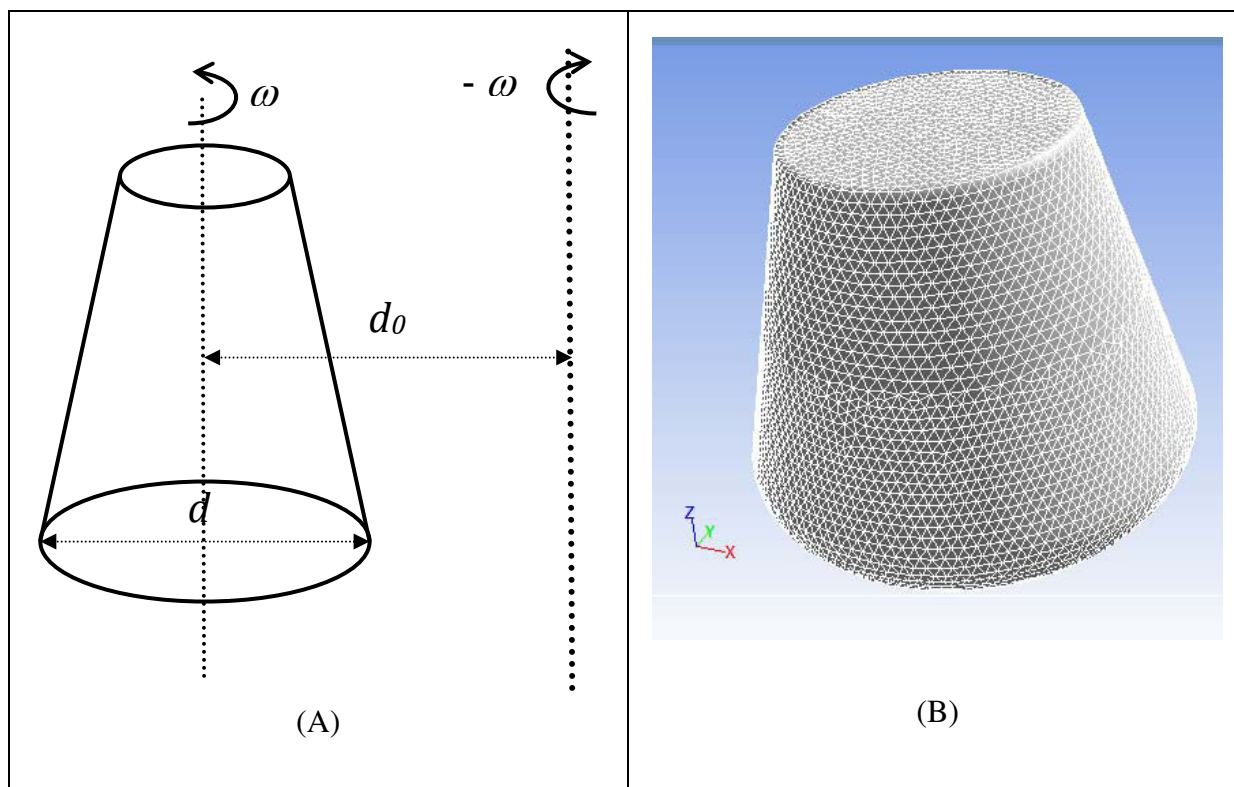


Figure II-13. Représentation schématique des référentiels choisis pour la simulation numérique (A) et maillage du flacon de 250 mL (écoulement non-Newtonien). d est le diamètre de la fiole, d_0 est le diamètre de rotation de la table d'agitation et w est la vitesse angulaire.

Des calculs préliminaires ont montré que l'utilisation d'un modèle de turbulence, qui pourrait être discuté compte-tenu de l'importance relative des nombres de Reynolds escomptés, a mené à des résultats globalement peu concluants. L'écoulement purement rotationnel des flacons lisses, potentiellement fortement anisotrope, rend en effet peu judicieuse l'utilisation de modèles de turbulence isotropes. Par ailleurs, une étude récente basée sur la mesure du ratio entre la dissipation maximale et la dissipation moyenne en flacons agités (Peter et al., 2006) a montré que le régime turbulent prenait place pour des Reynolds supérieurs à 60 000 environ. Les valeurs rencontrées dans le cadre de notre étude restent inférieures à cette valeur critique, excepté pour des fioles de 1000 mL de volume utile pour lesquelles elle est légèrement dépassée à 350 rpm. L'écoulement laminaire est donc supposé pour les calculs. Des représentations des interfaces calculées sont données sur la Figure II-14.

Une comparaison des dissipations volumiques déterminées par CFD, expérience et corrélation semi-empirique est donnée en annexe de ce document.

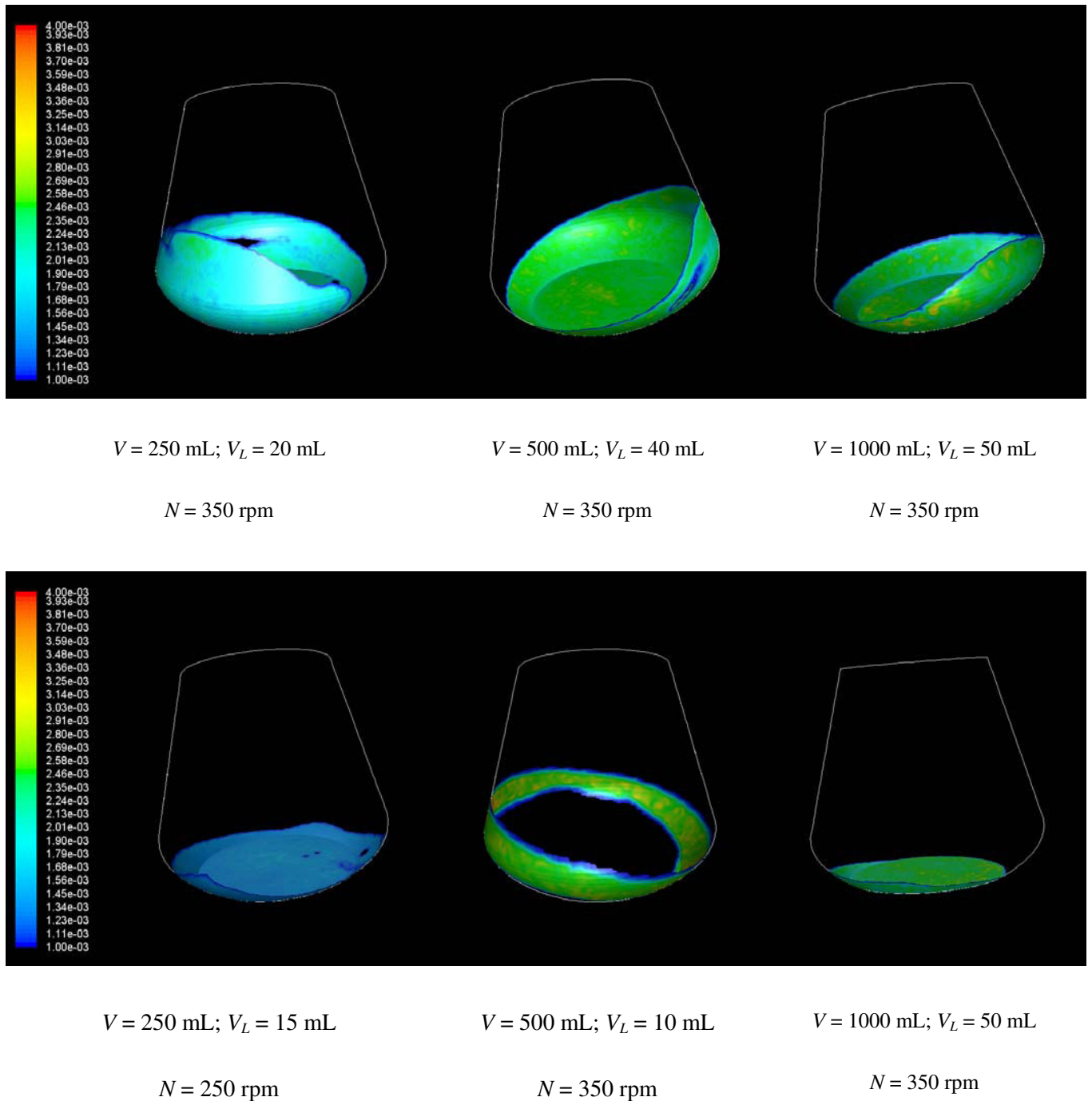


Figure II-14. Quelques résultats qualitatifs des simulations CFD pour différentes conditions opératoires. L'échelle entre les fioles de 250, 500 et 1000 mL n'est pas respectée. L'échelle de couleur indique la cote verticale.

3^{ème} Chapitre

III. Influence de l'hydrodynamique sur la réponse physiologique et la morphologie de *S. pristinaespiralis* pr11 cultivée en fioles agitées

III.1. Introduction

Les objectifs des travaux présentés dans ce chapitre sont d'étudier l'influence de l'agitation (quantifiée par la puissance dissipée volumique) et, par voie de conséquence, de l'oxygénation sur la physiologie de *S. pristinaespiralis* pr11 et en particulier sur la production de pristinamycines. Dans cette optique, les cinétiques de croissance, de consommation de substrats et de production de pristinamycines (déclenchement et concentrations finales) ainsi que les vitesses de consommation d'oxygène (*OUR*) et les modifications de morphologie de *S. pristinaespiralis* pr11 ont été suivies sous différentes conditions de dissipation volumique. Ces conditions ont été obtenues par modification du volume de remplissage des fioles d'Erlenmeyer utilisées et de la vitesse d'agitation. Les fioles utilisées au cours de ce travail ont été des fioles lisses d'un volume total de 250 mL. Les résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un projet de publication soumis à *Biotechnology and Bioengineering* le 07 janvier 2011. Des résultats complémentaires sont présentés à la suite de celui-ci.

III.2. Oxygen supply controls the onset of pristinamycins production by *S. pristinaespiralis* in shaking flasks.

N. Mehmood¹, E. Olmos¹, J-L. Goergen¹, F. Blanchard¹, D. Ullisch², W. Klöckner²,
J.Büchs² and S. Delaunay^{1*}

¹Laboratoire Réactions et Génie des Procédés-UPR CNRS 3349, Nancy-Université
ENSAIA-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172 F-54505 Vandœuvre lès Nancy
France

² AVT - Biochemical Engineering, RWTH Aachen University, Worringerweg 1, 52056
Aachen, Germany,

III.2.1. Abstract

Antibiotics are secondary metabolites, generally produced during stationary phase of growth under various nutritional and hydrodynamic stresses. However, the exact mechanisms of the induction of antibiotics production are still not clearly established. In a previous study, the induction of pristinamycins as well as product concentrations were correlated with power dissipation per unit of volume (P / V) in shaking flasks. In this study, detailed kinetics of growth, substrate consumption, oxygen uptake rate (OUR) and pristinamycins production under varying P / V conditions have been obtained and analysed. Our results showed that higher P / V resulted in a higher concentration of biomass and promoted an earlier nutrient limitation and ultimately an earlier induction of pristinamycins production. The maximal specific growth rate, specific oxygen consumption rate and specific consumption rate of glutamate increased with P / V while this influence was less marked with specific consumption rate of glucose, arginine, ammonium ions and phosphate. When the OUR was inferior to the maximum oxygen transfer rate OTR_{max} , pristinamycins production was observed in case of limitation in nitrogen and/or phosphate sources. When OUR was close to the maximum OTR , pristinamycins production was not detected despite the occurrence of nitrogen and/or phosphate sources limitation. The threshold value for OUR observed was

around 25 mmol.L⁻¹.h⁻¹. This suggested that a limitation in nitrogen and/or phosphate alone was not sufficient to induce pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* pr11. To induce this production, the oxygen transfer had to be non-limiting.

Keywords: *Streptomyces*, power dissipation, nutrient limitation, pristinamycins production, hydrodynamics, shaking flask

III.2.2. Introduction

Antibiotics are secondary metabolites which are not essential for basic metabolic processes such as reproduction and growth. The majority of known antibiotics are produced by actinomycetes, especially the *Streptomyces* genus, fungi or non-filamentous bacteria. Pristinamycins, members of the streptogramin family, consist of two different groups of ring-like structures (Preud'Homme et al., 1968) which act synergistically to exert their bactericidal action. They have a strong activity against methicillin-, penicillin-, and vancomycin-resistant bacteria, and exhibit a prolonged post-antibiotic effect (Abdel-Hamid and Phillips, 2003; Qadri et al., 1997). Pristinamycins are produced by *Streptomyces pristinaespiralis* (Corvini et al., 2000; Paquet et al., 1992; Voelker and Altaba, 2001).

Since the identification of antibiotic-producing microorganisms, many studies have been conducted to understand the mechanisms of the induction of antibiotics production. Among parameters inducing antibiotic production, nutritional limitation (stress) is a well known one. Various works have correlated stress due to carbon, nitrogen and/or phosphate depletion with induction of antibiotics production. However, to date, physiological effects of these limitations are not well understood. For instance, an elevated initial glucose concentration negatively influenced chloramphenicol productivity but did not delay the initiation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* (Bhatnagar et al., 1988). On the contrary, chloramphenicol production by *S. venezuelae* was increased by the use of poorly assimilated carbon and nitrogen sources, while changes in phosphate availability had little effect on productivity (Chatterjee et al., 1983). In *Streptomyces erythreus*, the production of erythromycin is repressed by the increase in the ammonium ions concentration (Flores and Sanchez, 1985). The rate of actinorhodin formation by *Streptomyces coelicolor* is inversely related to the residual concentration of the nitrogen source (Doull and Vining, 1990).

Gunarrsson et al. (2003) showed that low initial concentrations of ammonium and phosphate were beneficial for A40926 production and that productivity was not enhanced by applying a glucose limitation. Interestingly, the initiation of A40926 production was not governed by residual ammonium and phosphate concentrations, although the level of these nutrients strongly influenced A40926 production rates and final titers. On the contrary, with *S. coelicolor*, actinorhodin production was found to be triggered by phosphate or nitrogen depletion or by a decline in the specific growth rate (Doull and Vining, 1990). In *S. pristinaespiralis* pr11, the production of pristinamycins has been correlated with the sequential use and the exhaustion of amino acids, glutamate and arginine, used mainly as nitrogen sources (Corvini et al., 2004). With this microorganism, it was also shown that the nature of the nitrogen source could govern the patterns of growth and pristinamycins production (Voelker and Altaba, 2001).

During culture, microorganisms are submitted to hydrodynamic stresses along with nutritional stresses. Power consumption per unit of liquid volume has been intensively used for the characterization of macroscopic hydrodynamics in bioreactors and for the scale-up of microbial processes. Indeed, biological response is greatly influenced by power dissipation through changes in oxygen supply, carbon dioxide removal, degree of mixing and homogeneity, hydrodynamic stress and cell damage (Büchs et al., 2001). Mass transfer inside microbial pellets, pellets diameter and thus specific consumption rates are expected to be correlated to power dissipation as well.

Some studies have been specifically conducted to observe the role of dissolved oxygen concentration (DOC) on the concentration of produced antibiotics. For example, it has been observed a two fold increase in the final ratamycin concentration when DOC was controlled at a value of 100 % of air saturation (Martins et al., 2004). A linear relation between the concentration of virginamycin produced by *Streptomyces virginiae* and the dissolved oxygen tension from 10 to 80 % was put into evidence by Shioya et al., (1999). Jensen et al. (1966) observed that increasing in the level of aeration entailed a progressive increase in chlortetracycline yield in *Streptomyces aureofaciens*. In the same way, Chen and Wilde (1991) reported increased yields of tylosin and macrosin with increased aeration for *Streptomyces fradiae* cultures. Similarly, avermectin production in *Streptomyces avermitilis* was dramatically reduced when the DOC fell below 20 % of the saturation value (Magnolo et al., 1991). Yegneswaran and Gray (1991) observed an approximately 3 fold increase in the

maximum concentration of cephamycin C when DOC was controlled at 100 % of air saturation during the growth phase of *Streptomyces clavuligeris*. It has to be noted that the use of DOC as characteristic parameter must be completed by the simultaneous knowledge of the volumetric oxygen transfer coefficient k_{La} .

Besides studies showing the effects of DOC on antibiotics titer, very few studies have correlated the onset of antibiotic production with DOC or oxygen transfer rate. Clark et al. (1995) have reported that erythromycin was produced in both oxygen limited and oxygen sufficient conditions by *Saccharopolyspora erythraea*, while vancomycin was only produced in oxygen non limiting culture with *Amycolatopsis orientalis* (formally called *Streptomyces orientalis*) (Dunstan et al., 2000). Rollins et al. (1988) have reported that when levels of DOC dropped to almost zero, the appearance of cephamycin C in *S. clavuligerus* was delayed and its concentration was lowered.

The oxygen uptake rate (*OUR*) is a commonly employed parameter for quantifying the physiological state of an aerobic culture, since some metabolic activities depend on oxygen consumption. Substrate or oxygen limitations, product inhibitions, diauxic growth and other biological phenomena may be uncovered based on the monitoring of the *OUR* during fermentation (Anderlei and Büchs, 2001). However, to our knowledge, in the literature, the information concerning the *OUR* in *Streptomyces* cultures and its influence on the antibiotic production is scarce.

In a previous work (Mehmood et al., 2010), it has been shown that the onset of pristinamycins production could be predicted on the basis of the knowledge of the power dissipation and of the volumetric oxygen transfer coefficient. When production occurred, the concentration of antibiotics was strongly correlated with power dissipation. The aim of this study is to precise the influence of hydrodynamic (quantified by P / V) on the physiological modifications leading to the onset of the production and the accumulation of pristinamycins. A particular attention has been paid to the nutritional stress (nitrogen and phosphate) and the oxygen supply. To our knowledge, in most of the works dealing with the induction of antibiotic production, the influence of these substrates was studied separately.

III.2.3. Material and methods

III.2.3.1. Microorganisms

The strain used throughout this study was *S. pristinaespiralis* pr11, a pristinamycins overproducing mutant strain provided by Sanofi-Aventis (Vitry sur Seine, France). *Listeria ivanovii* was used as a pristinamycins sensitive strain to detect the presence of pristinamycins in the culture broth of *S. pristinaespiralis* pr11.

III.2.3.2. Media and culture conditions

Complex medium (ICS)

The ICS medium, used for the germination of *S. pristinaespiralis* spores, consisted in: sucrose 15 g.L⁻¹, corn steep (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) 5 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 10 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g.L⁻¹, NaCl 3 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0.2 g.L⁻¹ and CaCO₃ 0.2 g.L⁻¹. Medium pH was adjusted at 6.8 prior to sterilization at 121°C for 20 min.

Synthetic medium (MPS2)

MPS2 was the buffered synthetic medium in which *S. pristinaespiralis* was cultured for the production of pristinamycins. It was composed of: glucose 30 g.L⁻¹, malonic acid 7.5 g.L⁻¹, L-arginine 3 g.L⁻¹, L-glutamate 1.5 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0.3 g.L⁻¹, FeSO₄.7H₂O 15 mg.L⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 0.55 g.L⁻¹, 3-morpholinopropanesulfonic acid 20 g.L⁻¹, K₂HPO₄ 0.75 g.L⁻¹ and CaCl₂.2H₂O 0.40 g.L⁻¹. pH was adjusted at 6.8 prior to sterilization for 20 min at 121°C. Concentrated solutions of glucose, CaCl₂ and K₂HPO₄ were sterilized and added separately to avoid Maillard reactions and precipitations.

Culture conditions

Precultures were inoculated with 1 mL of thawed spores calibrated at 3 x 10⁷ CFU.mL⁻¹ and poured into 250 mL unbaffled flasks containing 40 mL of ICS medium. The precultures were performed at 28°C and 250 rpm on an orbital shaker having a 2.5 cm-shaking diameter. After 20 h, this preculture was used to inoculate MPS2 medium (5 % v/v) contained in 250 mL unbaffled flasks. The dimensions of these flasks were those shown in a previous work (Mehmood et al. 2010). The cultures were performed for 50 h, at 28°C, either at 250 or 350

rpm on the same orbital shaker mentioned earlier. Filling volumes of 10, 20, 30, 40 or 50 mL were used to cover a wide range of power dissipations. For offline analysis, several flasks with same filling volumes were used. Each of them was successively dedicated to sampling analysis.

III.2.3.3. Analytical methods

Biomass

The biomass concentration was determined by absorbance at 660 nm according to the method described previously by Lubbe et al. (1985) and by gravimetric method.

Pristinamycins

The presence of pristinamycins in fermentation broth was detected by growth inhibition zone: inoculation of a solid medium (agar MRS) containing the pristinamycin-sensitive bacterium *L. ivanovii* with a supernatant from *S. pristinaespiralis* culture (Saffroy, 2006). For the quantitative analysis, pristinamycins were extracted from the culture medium and analyzed by HPLC (Thibaut et al., 1995).

Glutamate and Arginine

Glutamate and arginine concentration were measured by HPLC (LC – 20AD, Shimadzu France, Champs-sur-Marne, France). A pre-column derivatization was performed using ortho-phthalaldehyde (OPA) as fluorescence derivatization reagent. This reaction was reported to complete instantaneously at room temperature and to achieve extremely high sensitivity and selectivity. Separation was conducted in a Shim-pack CLC-ODS reversed-phase partition chromatography column (6.0 mm ID x 150 mm long) (Shimadzu France, Champs-sur-Marne, France). Detection was conducted by a fluorescence detector (excitation wavelength: 350 nm, emission wavelength: 460 nm) (Prostar, Walnut Creek, USA).

The elution was performed using a gradient of reagent A (sodium phosphate buffer, pH 6.8, 5 mmol.L⁻¹) and of reagent B (33 % reagent A and 66 % acetonitrile). It was fed at a constant flow rate of 1.0 mL.min⁻¹ as following: 95 % reagent A and 5 % reagent B for 1 min., 95-0 % reagent A and 5-100 % reagent B for 9 min., 100 % buffer B for 5 min., 100-0

% reagent B for 1 min.. The column was then washed with acetonitrile (80 %) for 5 min.. The column temperature was controlled at 45°C.

Ammonium

Ammonium concentration in culture supernatants was determined using an ammonium gas sensing electrode (model 95-12, Orion, Boston, USA) with ammonium chloride as standard (0.5-20 mmol.L⁻¹). 3 mL of 0.5 N NH₄Cl were added to 3 mL of sample solution and corresponding electrode potential was noted to get the concentration of ammonium.

Inorganic phosphate

A standard solution of Na₂HPO₄ (0-1 mmol.L⁻¹) was prepared. The reaction mixture was composed of ascorbic acid 10 % (1/6 v/v) and of a solution of 0.42 % ammonium molybdate tetrahydrate (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4H₂O in 1 N H₂SO₄ (5/6, v/v). 50 µl of sample solution were added to 250 µl of HCl 0.5 N and then 700 µl of reaction mixture are added. After incubation at 45°C for 20 min, samples absorbance, due to the presence of phosphomolybdate complexes, was determined at 820 nm.

Glucose

An automated chemistry analyzer (VITALAB Selectra 2, Merck, Darmstadt, Germany) was used to measure glucose concentrations by glucose oxidase assays (Bruss, 1997; Sakha et al., 2006).

III.2.3.4. Shaking flask hydrodynamics

The power dissipation P (W) in unbaffled shaking flasks can be calculated according to the equation proposed by Büchs et al. (2000):

$$Ne' = 70Re^{-1} + 25Re^{-0.6} + 1.5Re^{-0.2} \quad (III-1)$$

with the modified Newton number Ne' and the Reynolds number Re given by:

$$Ne' = \frac{P}{\rho N^3 d^4 V_L^{1/3}} \quad Re = \frac{\rho N d^2}{\mu} \quad (III-2)$$

with d (m) the maximum flask diameter, N (s^{-1}) the rotational frequency, and ρ ($kg.m^{-3}$) the density of liquid. μ (mPa.s), the dynamic viscosity, was either supposed constant for Newtonian conditions or given by numerical simulations using the Sisko law for non-Newtonian conditions as described in Mehmood et al. (2010).

As it is well adapted for the flask used in case of low-viscosity medium, the equation (III-3), proposed by Maier (2002) and used by Seletzky et al. (2007), was used in this study to estimate the volumetric gas-liquid mass transfer coefficients:

$$k_L a = 6.67 \times 10^{-6} N^{1.16} V_L^{-0.83} d_0^{0.38} d^{1.92} \quad (III-3)$$

with $k_L a$ the volumetric gas-liquid mass transfer coefficient (s^{-1}), N the rotational frequency (min^{-1}), V_L (mL) the filling volume, d_0 (cm) the shaking diameter and d (cm) the shake flask diameter.

III.2.3.5. Oxygen transfer and consumption quantification

Oxygen consumption (OUR)

On-line measurement of the *OUR* in shaken flasks was carried out in a self-made Respiratory Activity Monitoring System (RAMOS) described by Anderlei and Büchs (2001) and Anderlei et al. (2004). Commercial versions are available from Kühner (Birsfelden, Switzerland) or HiTec Zang (Herzogenrath, Germany). Specially designed flasks were used for cultures in RAMOS device but encountered hydrodynamics and gas phase concentrations were similar to those in standard Erlenmeyer flasks with cotton plugs. The measuring cycle was separated into a measuring and a rinsing phase. During the rinsing phase, air with a calculated flow rate flowed through the measuring flask. To protect the measuring flask against contamination two sterile filters were installed at the inlet and the outlet. The partial pressure of oxygen in the headspace of the measuring flask was detected by an oxygen gas sensor. At the beginning of the measuring phase the inlet and outlet valves of the measuring flask were closed. The continuing respiration activities of the microorganisms subsequently led to a decrease in the partial pressure of oxygen in the headspace of the measuring flask. The *OUR* of the particular measuring flask was automatic calculated from the change in the partial pressure. After the measuring phase the valves were re-opened and “fresh” air could flow through the flask and new measuring cycle started. The measuring cycles approximately

completed in 30 minutes. A newly developed calibration strategy ensured the compensation of the drift of the oxygen sensors (Anderlei et al., 2004).

Maximum oxygen transfer rate (OTR_{max})

The maximum oxygen transfer capacity OTR_{max} for the various operating conditions could be related to operating conditions using the relation proposed by Maier and Büchs (2001).

$$OTR_{max} \propto N^{0.84} V_L^{-0.84} d_0^{0.27} d^{-1.25} \quad (\text{III-4})$$

with OTR_{max} the maximum oxygen transfer capacity ($\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Specific consumption rate of oxygen (qO_2)

The specific consumption rate of oxygen has been deduced from OUR using the following relation:

$$qO_2 = \frac{OUR}{X} \quad (\text{III-5})$$

with qO_2 the specific consumption rate of oxygen ($\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$) and X (g.L^{-1}) the biomass concentration.

III.2.4. Results

III.2.4.1. Influence of power dissipation on biomass and pristinamycins production

During this study, 250 mL unbaffled flask, containing synthetic medium were incubated on a rotary shaker with a 2.5 cm shaking diameter. At these conditions, power dissipation per unit of volume was adjusted in the range of 0.55 to 6 kW.m^{-3} by modifying the shaking frequency (250 or 350 rpm) and filling volumes (from 10 to 50 mL). The values obtained were thus quite similar to the values commonly encountered in mixed and sparged bioreactors. The detailed values of P/V and k_La , respectively, calculated using equations (III-2) and (III-3) are shown in Table III-1. Ten operating conditions were experimentally studied but kinetic results for only seven of them were presented for graphical convenience. The

operating conditions corresponding to 2.3 and 2.2 kW.m⁻³ were almost similar; only the latter condition was thus presented. In the same way, similar results were provided at 1.38, 1.44 and 1.60 kW.m⁻³, so only this last one was presented.

Table III-1. Calculated values of volume power dissipation (P / V) and gas-liquid mass transfer coefficient (k_{La}) for each working conditions tested during this study.

Filling volume (mL)	P / V (kW.m ⁻³)		k_{La} (h ⁻¹)	
	250 rpm	350 rpm	250 rpm	350 rpm
10	2.30	6.07	165	244
20	1.44	3.29	93	137
30	0.78	2.21	66	98
40	0.64	1.60	52	77
50	0.55	1.38	43	64

Figure III-1 depicts the influence of power dissipation and oxygen transfer on biomass concentration. The highest concentration of biomass has been observed with the highest power dissipation *i.e.* 17.9 g.L⁻¹ after 30 h culture ($P / V = 6.1$ kW.m⁻³ and $k_{La} = 244$ h⁻¹). For a given measurement time, the concentration of biomass decreased continuously with the decrease in power dissipation. As a consequence, the lowest maximum biomass concentration (10 g.L⁻¹) was observed with the lowest value of P / V .

In each culture conditions, the maximal specific growth rate was determined at the very beginning of the culture when glutamate was used as sole carbon and nitrogen source (see below). A global increase of the maximum specific growth rate with P / V could be put into evidence (Figure III-2). The maximum growth rate observed was 0.5 h⁻¹ at 6 kW.m⁻³ and the minimum one was 0.35 h⁻¹ at 0.55 and 1.38 kW.m⁻³. It has to be mentioned that for higher values of power dissipations obtained in bigger flasks, the maximum specific growth rate remained constant to 0.5 h⁻¹ (data not shown). Despite the differences observed for the maximal specific growth rate during the first hours of culture, the specific growth rate remained not influenced by P / V after 10 hours of culture.

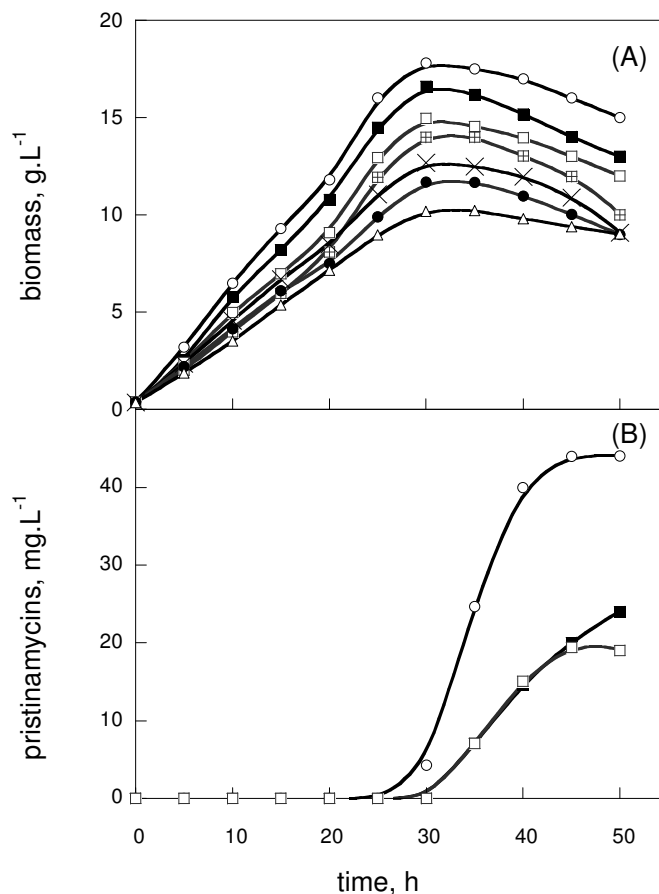


Figure III-1. Kinetics of biomass growth (A) and pristinaamycins concentration (B) under various hydrodynamics. Values of P / V (kW.m^{-3}) and k_{La} (h^{-1}) were: (6.1; 244, ○), (3.3; 137, ■), (2.2; 98, □), (1.6; 77, ⊕), (0.8; 66, ×), (0.65; 52, ●), (0.55; 43, △).

Among the culture conditions tested, only four operating conditions have entailed the production of pristinaamycins while no production was observed in the remaining operating conditions (Figure III-1B). Pristinaamycins production for 6 kW.m^{-3} occurred between 25 and 30 h of culture, while for 3.3 and 2.2 kW.m^{-3} , production occurred between 30 and 35 h. The operating condition corresponding to 2.3 kW.m^{-3} (not shown in Figure III-1B) also led to pristinaamycins production. As expected, pristinaamycins production triggering was observed during the stationary growth phase. However, even though a stationary phase was observed in all the cultures performed, pristinaamycins production was not systematic. Threshold values of power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, 2.2 kW.m^{-3} and 98 h^{-1} respectively, have to be reached to observe the antibiotic production. The highest pristinaamycins concentration, 43 mg.L^{-1} , was obtained with the highest P / V value whereas

similar pristinamycins titers were measured with the other culture conditions. No significant difference in the ratio pristinamycins I to pristinamycins II was measured (data not shown) in the different cultures during which the antibiotics production occurred.

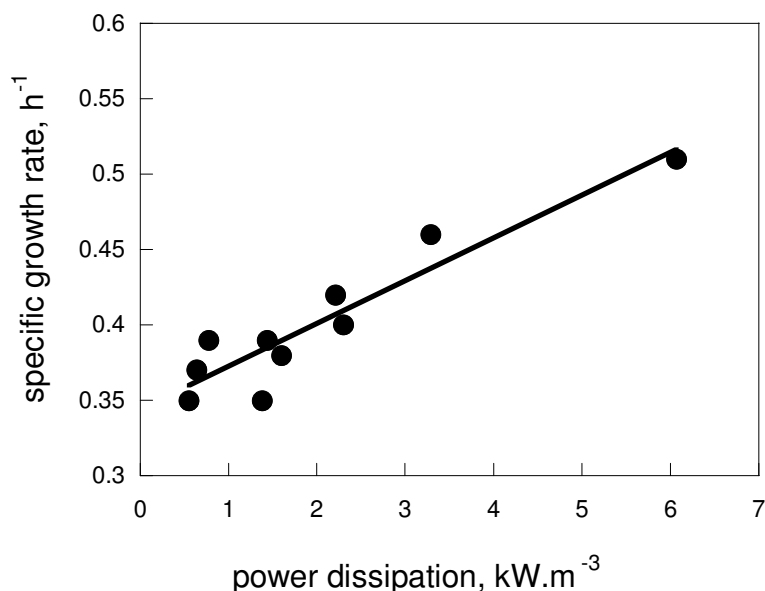


Figure III-2. Influence of power dissipation on the maximal specific growth rate.

III.2.4.2. Influence of power dissipation on the consumption of carbon, nitrogen and phosphate sources

Glucose was the main source of carbon in the culture medium. Malonic acid might also be used as carbon source, but its consumption remained weak, between 1 and 2 g.L⁻¹ at the end of the process according to the culture conditions (data not shown). This indicated a clear preference of glucose over malonic acid as carbon source by *S. pristinaespiralis*. Glutamate and arginine can potentially be used as both carbon and nitrogen sources and the third nitrogen source present in the culture medium are the ammonium ions.

As shown in Figure III-3A and Figure III-3B, glutamate and NH₄⁺ were consumed since the very beginning of the culture. However, whereas NH₄⁺ was used all over the culture, glutamate was used during the first hours of the process. According to the culture conditions, glutamate was exhausted between 15 and 20 hours of culture. The specific rate of glutamate

consumption appeared to be strongly correlated to P / V . The highest rates were determined when P / V was superior to 3.3 kW.m^{-3} and the lowest with 0.55 kW.m^{-3} (Figure III-3B). The consumption of arginine and glucose began after approximately 10 h of culture (Figure III-3C and Figure III-3E). Higher power dissipations promoted faster beginning in the glucose and arginine utilization. With power dissipations of 6 and 3 kW.m^{-3} , glucose was totally consumed at the end of culture while for the other power dissipation conditions, residual concentrations of glucose were determined at the end of culture. The beginning of arginine consumption was between 5 and 10 h but depended upon operating conditions (Figure III-3C). Indeed, at 6 kW.m^{-3} , arginine began to be consumed around 5 h, while for 0.55 kW.m^{-3} , arginine remained unconsumed up to 10 h of culture. Arginine was completely consumed after a culture time ranging from 30 to 45 h depending on the operating conditions. As for glutamate, higher P / V promoted faster ammonium exhaustion (Figure III-3B). This occurred between 25 and 50 h of cultivation time when the power dissipation was superior or equal to 0.8 kW.m^{-3} . As it was already mentioned, for four operating conditions, pristinamycins production occurred with a triggering time comprised between 25 and 35 h of culture. For these producing conditions, the residual concentration of the three nitrogen sources was close to zero. Nevertheless, for some of the non-producing conditions, an exhaustion of these nitrogen sources, delayed in time, was also determined. However, no pristinamycins excretion was observed.

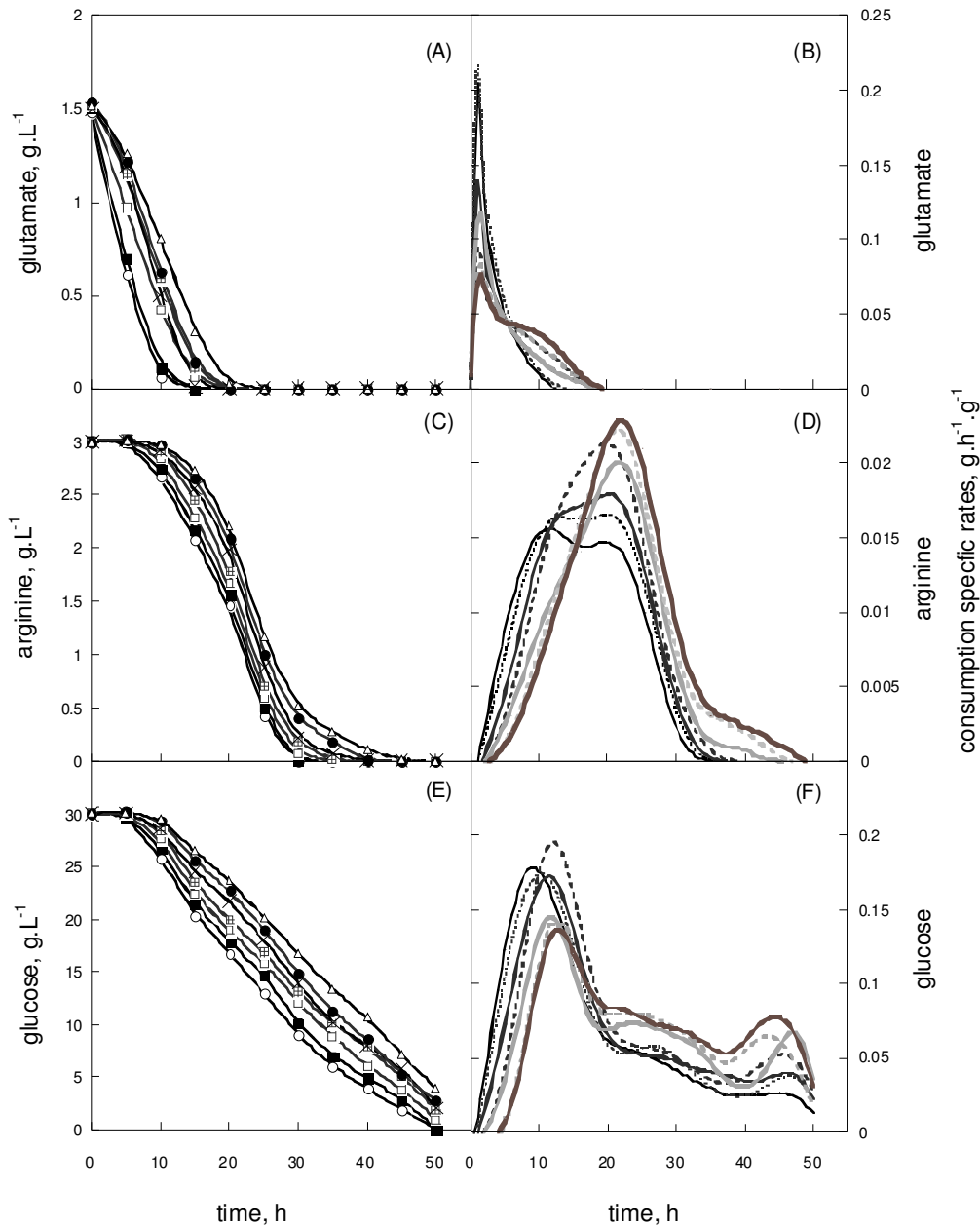


Figure III-3. I. Kinetics of carbon-substrates consumption under various conditions of power dissipation for glutamate (A), arginine (C) and glucose (E). Values of P / V (kW.m^{-3}) and k_{LA} (h^{-1}) were respectively: (6.1; 244, ○), (3.3; 137, ■), (2.2; 98, □), (1.6; 77, ⊕), (0.8; 66, ×), (0.65; 52, ●), (0.55; 43, △). II. Specific consumption rates for glutamate (B), arginine (D) and glucose (F). Values of P / V (kW.m^{-3}) and k_{LA} (h^{-1}) were respectively: (6.1; 244, —), (3.3; 137, ----), (2.2; 98, ———), (1.6; 77, ······), (0.8; 66, ———), (0.65; 52, ······), (0.55; 43, ———).

Phosphate stress is a well known phenomenon inducing antibiotic production (Martin, 2004; Lounes et al., 1996b; Weinberg, 1978). As a consequence, kinetics of phosphate sources consumption were also analyzed during the pristinamycins producing process (Figure III-4A). Similarly to nitrogen and carbon sources, the power dissipation increase entailed a faster exhaustion of phosphate sources. When the antibiotics production occurred, the remaining concentration of phosphate was between 0.4 and 0.25 mmol.L⁻¹ for the culture condition at 6 kW.m⁻³ and between 0.5 and 0.2 mmol.L⁻¹ for 3.3 or 2.2 kW.m⁻³. Similar phosphate concentrations were also determined for other culture conditions but without pristinamycins production.

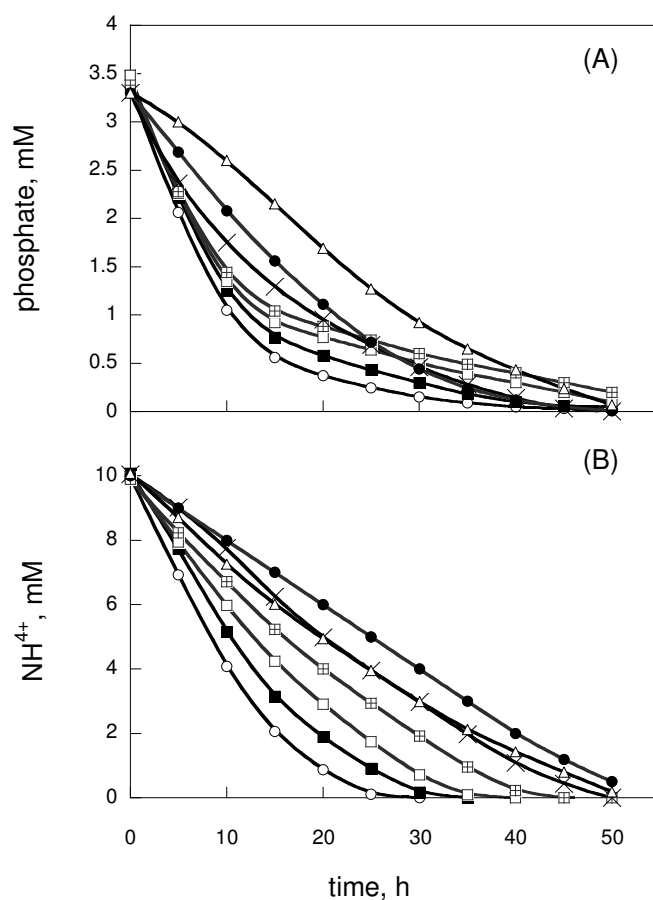


Figure III-4. Kinetics of phosphate source (A) and ammonium ions (B) consumption under various conditions of power dissipation. Values of P / V (kW.m⁻³) and k_La (h⁻¹) were respectively: (6.1; 244, ○), (3.3; 137, ■), (2.2; 98, □), (1.6; 77, ⊕), (0.8; 66, ×), (0.65; 52, ●), (0.55; 43, △).

III.2.4.3. Influence of power dissipation on oxygen consumption

The *OTR* in the culture system has been measured by the RAMOS device (Figure III-5). Due to low solubility of oxygen in fermentation medium ($\sim 8 \text{ mg.L}^{-1}$ at 25°C), it could be assumed that *OTR* is equal to oxygen uptake rate (*OUR*).

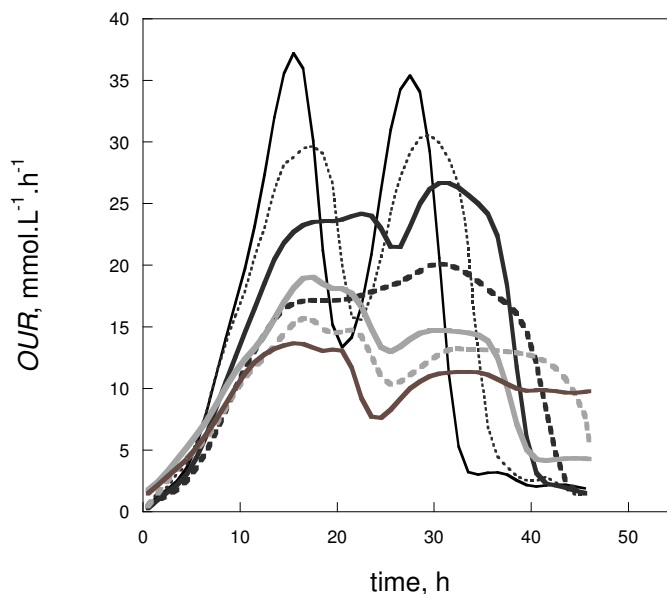


Figure III-5. Oxygen Uptake Rate under various conditions of power dissipation: Values of P / V (kW.m^{-3}) and k_La (h^{-1}) were respectively: (6.1; 244, —), (3.3; 137, ----), (2.2; 98, ———), (1.6; 77, ······), (0.8; 66, ———), (0.65; 52, ······), (0.55; 43, ———).

Globally, an increase in power dissipation from 0.55 kW.m^{-3} to 6.1 kW.m^{-3} promoted higher *OUR*. At the highest power dissipation, the maximum oxygen demand (*OUR*) was $38 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ while this value dropped to $14 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at the lowest power dissipation (0.55 kW.m^{-3}). From 3.3 kW.m^{-3} , two sharp peaks were clearly determined. The first one was observed around 15 h of cultivation and after a short decrease; the second maximum value was obtained between 28 and 35 h of cultivation. The culture logically ended with a rapid decrease of the *OUR*. It has to be noticed at 6 and 3.3 kW.m^{-3} , the highest *OUR* (respectively 38 and $30 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), the highest biomass concentrations (respectively 17.9 g.L^{-1} , 16.7 g.L^{-1}) and earliest substrates consumption and pristinamycins production have been put into evidence. For operating conditions corresponding to the lowest power dissipations (1.6, 0.8,

0.65 and 0.55 kW.m⁻³), two peaks were still observed for the *OUR* at roughly 20 and 35 h. However, these peaks were wider and the maximal *OUR* significantly reduced.

On the basis of the conclusions of Anderlei et Büchs (2001), this decrease could be attributed to an oxygen limitation. This implied that the maximum oxygen transfer capacity (OTR_{max}) was inferior to the maximum oxygen demand (OUR_{max}) if the limitation of oxygen came from an insufficient transfer from atmospheric gas to liquid medium. This oxygen limitation was expected to entail lower growth and lower consumption of substrates.

The specific consumption rate of oxygen (qO_2) is characteristic of each microorganism and is a key parameter for process design. Using the experimental *OUR* and biomass values, qO_2 of *S. pristinaespiralis* was calculated with equation (III-5) at the time of the first (approximately 15 h) and second (approximately 30 h) *OUR* peaks. As reported before, the specific growth rate, the glutamate specific consumption rate and the pristinamycins specific production rate (from 0.04 to 0.25 mg.h⁻¹.g⁻¹) increased with P / V . In the same way, the oxygen specific consumption rate globally increased from 2.5 to 4.2 mmol.h⁻¹.g⁻¹ at approximately 15 h of culture and from 1 to 2 mmol.h⁻¹.g⁻¹ at 30 h of culture, when P / V increased from 0.55 to 6 kW.m⁻³. The qO_2 was at least divided by a factor 2 between 15 h and 30 h of culture (Figure III-6).

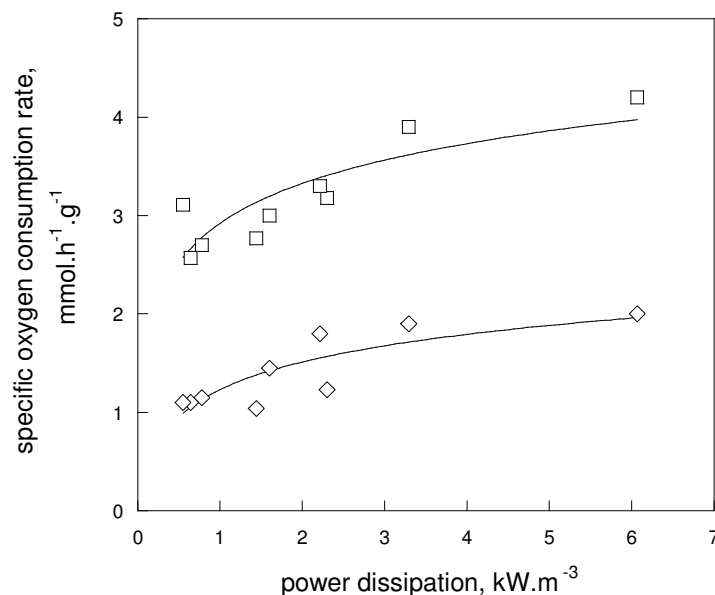


Figure III-6. Influence of power dissipation on the specific rate of oxygen consumption at the first (□) and second (◇) Oxygen Uptake Rate peak.

Some qO_2 values have been reported for various *Streptomyces* strains. For instance, qO_2 was between 2 and 3 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for *S. aureofaciens* (Jensen et al., 1966), 10 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for *S. clavuligerus* (Yegneswaran et al. 1991), 0.09 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for *S. lividans* (Magnolo et al. 1991) and 7.44 $\text{mmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ for *S. coelicolor* (Ozergin-Ulgin and Mavituna, 1998). These reported values are close to the one observed in our study.

III.2.5. Discussion

The sequential utilization of amino acids by *S. pristinaespiralis* pr11, which was previously observed in stirred bioreactors (Corvini et al., 2004) has been confirmed in shaking flasks in this work. As already mentioned, glutamate was used as both carbon and nitrogen source before the concomitant consumption of glucose and arginine as carbon and nitrogen source, respectively. This sequence was determined in all the culture conditions which were conducted whatever the power dissipation applied.

The production occurred only in four culture conditions, when power dissipation reached at least 2.2 kW.m^{-3} . In these cultures, and as it was previously observed with various *Streptomyces* (Doull and Vining, 1990, Lebrihi et al., 1992, Lounes et al., 1996a, Flores and Sanchez, 1985, Jonsbu et al., 2000, Tanaka et al., 1985, Voelker and Altaba, 2001), the nitrogen source was exhausted prior to the production of pristinamycins which occurred at the end of the growth phase. Nevertheless, in several cultures no antibiotic production was measured whereas the nitrogen sources were exhausted. This suggested that the disappearance of nitrogen source in the culture medium was not the sole parameter to which the induction of the pristinamycins excretion could be attributed. An excessive concentration of inorganic phosphate was also shown to have a negative effect on the onset of antibiotic production in several *Streptomyces*. During the cultures with *S. pristinaespiralis*, phosphate was not completely consumed. Traces of phosphate were still present in the culture medium including conditions where the pristinamycins production was detected. In all cultures, the phosphate concentration was below 0.5 mmol.L^{-1} . Such a limitation in phosphate source has no effect on the onset of monamycin production in *S. jamaicensis* (Hall and Hassal, 1970), of cycloheximide in *S. griseus* (Abou Zeid, 1972) and of oleandomycin in *S. antibioticus* (Torbochkina et al., 1965, Vilches et al., 1990). Moreover Martin (1977) has divided antibiotics into three categories on the basis of phosphate sensitivity: antibiotics produced (a) at low concentrations (less than 1 mmol.L^{-1}), e.g. bacitracin, tetracycline, monamycin etc., (b)

in presence of a concentration between 1 and 10 mmol.L⁻¹, e.g. streptomycin, chlortetracycline, vancomycin, and (c) with a residual concentration higher than 10 mmol.L⁻¹, e.g. novobiocin, gramicidin S, cephamycin, avermectine. This may suggest that pristinamycins may be classified in the group of antibiotics produced at low phosphate concentration.

Power dissipation had a clear impact on the cell kinetics observed during this study. The increase in P / V induced an earlier use of all the substrates. Moreover, the maximal specific growth rate and the maximal specific rates of glutamate and oxygen consumption increased with the power dissipation. The influence on use of glucose and arginine but also of ammonium ions and phosphate (data not shown) was less marked. Concerning the oxygen consumption determined using the RAMOS device, two peaks of high OUR have been observed. The first peak could correspond to the growth on glucose as carbon source and on arginine as nitrogen source; it could then be attributed to the oxygen demand for the bacterial growth. The second peak corresponded to a specific oxygen consumption rate (qO_2) that increased at around 30 h, but as shown in Figure III-6, the intensity of this specific oxygen consumption rate was actually quite low, compared to the 15 h peak. Moreover, the second peak occurred when the growth was strongly reduced and when the consumption of basic substrates was ended, and, in four cultures, a few hours before the pristinamycins excretion (around 30 h). Thus, the low but sensible additional oxygen consumption observed after 30 h of cultures could be due to the transition from the primary to the secondary metabolism. Indeed, it is known that the synthesis of pristinamycins requires oxygen for the reoxidation of cofactors (NADH, H⁺ and FADH₂) that are produced within the pristinamycins biosynthesis pathway (Corvini, 2000). One can observe that, at this precise culture time, the highest demands in oxygen were determined when the production of pristinamycins occurred.

In a general way, an increase in power dissipation could influence O₂ transfer from gas to liquid phase, macro-mixing, micro-mixing and also pellet diameter distribution. In our case, pristinamycins production occurred only when relatively high OUR were measured (more than 25 mmol.L⁻¹.h⁻¹). This suggested that the limitation in the oxygen supply observed for the culture conditions without production of pristinamycins could be, at least partially, responsible for this absence of production. To strengthen this hypothesis, the pseudo- OTR_{max} values in the shaking flasks predicted by equation (III-4) were compared with the effective consumption of oxygen by the cells at first (14-16 h of cultivation time) and second peak (28-

35 h) of fermentation.

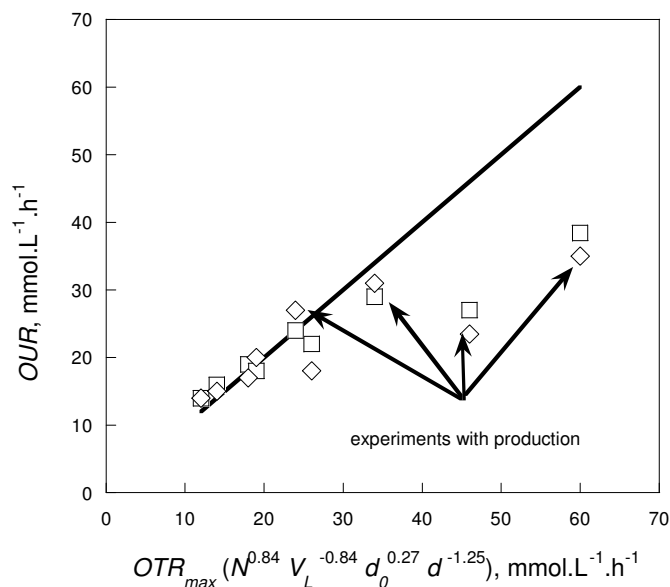


Figure III-7. Comparison of the experimental Oxygen Uptake Rate (at the first (≈ 15 h, \square) and second (≈ 30 h, \diamond) peak to the predicted maximum OTR values (---) in shaking flasks of the under various conditions of volume power dissipation.

As shown in Figure III-7, the maximum OUR increased linearly following equation (III-4) from 14 to 25 $\text{mmol.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. For the pristinamycins producing conditions, the experimental OUR_{max} values increased slower than pseudo- OTR_{max} which confirmed the absence of limitation in the oxygen transfer from the gas to liquid phase in these culture conditions. The increase in power dissipation may also have an effect on the circulation time of the substrates in the culture medium and as a consequence on the homogenization of substrates concentration in the liquid phase (macro-mixing). However, due to the low culture volume, this hypothesis is probably the less pertinent. Tan et al. (2011) measured mixing times in the order of a few seconds for the operating conditions used in this work. The renewing of the substrate at the surface of the bacterial pellets could be enhanced at the high values of power dissipation (micro-mixing) explaining the more intense consumption of the substrates due to an enhancement of the enzyme activities involved in the glutamate catabolism and using oxygen as substrate. As a consequence, the highest bacterial growth rates were observed at

high power dissipations. This should suggest that the supply in glutamate was limiting at the lowest values of power dissipation. Lastly, by increasing power dissipation, the mean size of the pellets could also decrease as it was previously shown with *S. fradiae* (Tamura et al., 1997) and *S. coelicolor* (Tough and Prosser, 1996). As the biomass concentration increased with power dissipation, the raise in glutamate and specific oxygen consumption could then be attributed to an enhancement in the specific surface exchange between the bacterial pellets (by reducing the mean diameter) and the external medium. On the contrary, for instance for glucose, the concentrations were sufficiently high in the bulk liquid phase to allow a sufficient mass flux to the pellet, thus avoiding any glucose limitation. Glucose consumption rates were thus independent from power dissipation.

III.2.6. Conclusion

Limitations in nitrogen and phosphate supply only could not explain the onset of the pristinamycins production by *S. pristinaespiralis*. Production of these antibiotics occurred when both of the following conditions were fulfilled: limitation in nitrogen (and phosphate) sources and sufficient oxygen supply. The next step of this study will be to determine mean pellet diameter during course of cultivation time under varying power dissipations as well as measurement of oxygen and mass transfer inside pellets in order to precisely relate these parameters to the production of pristinamycins.

III.2.7. References

- Abdel-Hamid ME, Phillips OA. 2003. LC-MS/MS determination of Synercid[®] injections. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 32(6):1167-1174.
- Abou Zeid AZ. 1972. Production of cycloheximide by *Streptomyces* sp. *Acta microbiologica Polonica. Series B: Microbiologia applicata* 4(2):83-88.
- Anderlei T, Büchs J. 2001. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem. Eng. J.* 7(2):157-162.
- Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J. 2004. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem. Eng. J.* 17(3):187-194.
- Bhatnagar RK, Doull JL, Vining LC. 1988. Role of the carbon source in regulating chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae*: studies in batch and continuous cultures. *Can. J. Microbiol.* 34(11):1217-1223.
- Bruss ML (1997). Lipids and ketones. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds) *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th edn. Academic, London, pp 83–113.
- Büchs J, Lotter S, Milbradt C. 2001. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 7(2):135-141.

Chapitre III. Influence de l'hydrodynamique sur la réponse physiologique et la morphologie de *S. pristinaespiralis* pr11 cultivée en fioles agitées

- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol. Bioeng.* 68(6):589-593
- Chatterjee S, Vining LC, Westlake DWS. 1983. Nutritional requirements for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. *Can. J. Microbiol.* 29(2):247-253.
- Chen HC, Wilde F. 1991. The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 37(6):591-595.
- Clark GJ, Langley D, Bushell ME. 1995. Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: Investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology* 141(3):663-669.
- Corvini PFX, Delaunay S, Maujean F, Rondags E, Vivier H, Goergen JL, Germain P. 2004. Intracellular pH of *Streptomyces pristinaespiralis* is correlated to the sequential use of carbon sources during the pristinamycins-producing process. *Enzyme Microb. Technol.* 34(2):101-107.
- Corvini PFX, Gautier H, Rondags E, Vivier H, Goergen JL, Germain P. 2000. Intracellular pH determination of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* by image analysis. *Microbiology* 146(10):2671-2678.
- Corvini PFX. 2000. Etude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines : Activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du pH intracellulaire. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, PhD thesis.
- Doull JL, Vining LC. 1990. Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32(4):449-454.
- Dunstan GH, Avignone-Rossa C, Langley D, Bushell ME. 2000. The Vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen-limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC 19795) cultures that do not produce antibiotic. *Enzyme Microb. Technol.* 27(7):502-510.
- Flores ME, Sanchez S. 1985. Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 26(2):191-194.
- Gunnarsson N, Bruheim P, Nielsen J. 2003. Production of the glycopeptide antibiotic A40926 by *Nonomuraea* sp. ATCC 39727: Influence of medium composition in batch fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30(3):150-156.
- Hall MJ, Hassall CH. 1970. Production of the monamycins, novel depsipeptide antibiotics. *Appl. Microbiol.* 19(1):109-112.
- Jensen AL, Schultz JS, Shu P. 1966. Scale-up of antibiotic fermentations by control of oxygen utilization. *Biotechnol. Bioeng.* 8(4):525-537.
- Jonsbu E, Ellingsen TE, Nielsen J. 2000. Effect of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by *Streptomyces noursei*. *J. Antibiot.* 53(12):1354-1362.
- Lebrihi A, Lamsaif D, Lefebvre G, Germain P. 1992. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37(3):382-387.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1996a. Effect of nitrogen/carbon ratio on the specific production rate of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Process Biochem.* 31(1):13-20.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1996b. Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effects of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45(1-2):204-211.
- Lubbe C, Demain AL, Bergman K. 1985. Use of controlled-release polymer to feed ammonium to *Streptomyces clavuligerus* cephalosporin fermentations in shake flasks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22(6):424-427.
- Magnolo SK, Leenutaphong DL, DeModena JA, Curtis JE, Bailey JE, Galazzo JL, Hughes DE. 1991. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of bacterial hemoglobin. *Nat. Biotechnol.* 9(5):473-476.
- Maier U, Büchs J. 2001. Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 7(2):99-106.

Chapitre III. Influence de l'hydrodynamique sur la réponse physiologique et la morphologie de *S. pristinaespiralis* pr11 cultivée en fioles agitées

- Maier U. 2002. Gas-Flüssigkeits-Stofftransfer im Schüttelkolben. RWTH Aachen University. Aachen, Germany, PhD thesis.
- Martín J. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Eng.* Volume 6. p 105-127.
- Martin JF. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the *PhoR-PhoP* system: An unfinished story. *J. Bacteriol.* 186(16):5197-5201.
- Martins RA, Guimaraes LM, Pamboukian CR, Tonso A, Facciotti MCR, Schmidell W. 2004. The effect of dissolved oxygen concentration control on cell growth and antibiotic retamycin production in *Streptomyces olindensis* So20 fermentations. *Braz. J. Chem. Eng.* 21(2):185-192.
- Mehmood N, Olmos E, Marchal P, Goergen JL, Delaunay S. 2010. Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_La . *Process Biochem.* 45(11):1779-1786.
- Ozergin-Ulgen K, Mavituna F. 1998. Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) culture in a batch bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73(3):243-250.
- Paquet V, Goma G, Soucaille P. 1992. Induction of pristinamycins production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Biotechnol. Lett.* 14(11):1065-1070.
- Park JP, Kim YM, Kim SW, Hwang HJ, Cho YJ, Lee YS, Song CH, Yun JW. 2002. Effect of agitation intensity on the exopolymers production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microbiol.* 34(6):433-438.
- Preud'homme J, Tarridec P, Belloc A. 1968. 90. Pristinamycine, isolement, caractérisation et identification des constituants. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2:585-591.
- Qadri SMH, Ueno Y, Mostafa FMA, Halim M. 1997. In vitro activity of quinupristin/dalfopristin, RP59500, against gram-positive clinical isolates. *Chemotherapy* 43(2):94-99.
- Rollins MJ, Jensen SE, Westlake DWS. 1988. Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. *J. Ind. Microbiol.* 3(6):357-364.
- Sakha M, Ameri M, Rohbakhsh A. 2006. Changes in blood β -hydroxybutyrate and glucose concentrations during dry and lactation periods in Iranian Holstein cows. *Comp. Clin. Pathol.* 15(4):221-226.
- Seletzky JM, Noak U, Fricke F, Welk E, Eberhard W, Knocke C, Büchs J. 2007. Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnol. Bioeng.* 98(4):800-811.
- Shioya S, Morikawa M, Kajihara Y, Shimizu H. 1999. Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(2):164-169.
- Tan R-K, Eberhard W, Büchs J. 2011. Measurement and characterization of mixing time in shake flasks, *Chem. Eng. Sci.* 66(3):440-447.
- Tamura S, Park Y, Toriyama M, Okabe M. 1997. Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 83(6):523-528.
- Tanaka Y, Taki A, Masuma R, Omura S. 1985. Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* 39(6):813-821.
- Thibaut D, Ratet N, Bisch D, Faucher D, Debussche L, Blanche F. 1995. Purification of the two-enzyme system catalyzing the oxidation of the D-proline residue of pristinamycin II (B) during the last step of pristinamycin II (A) biosynthesis. *J. Bacteriol.* 177(18):5199-5205.
- Torbochkina LI, Dormidoshina TA, Navolneva IN. 1965. The path of pyruvic acid synthesis in *Act. erythreus* and *Act. antibioticus* strains producing macrolid antibiotics. *Obrazuiushchikh makrolidnye antibiotiki.* 30(2):388-394.
- Tough AJ, Prosser JJ. 1996. Experimental verification of a mathematical model for pelleted growth of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in submerged batch culture. *Microbiology* 142(3):639-648.
- Vilches C, Mendez C, Hardisson C, Salas JA. 1990. Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: Influence of

Chapitre III. Influence de l'hydrodynamique sur la réponse physiologique et la morphologie de *S. pristinaespiralis* pr11 cultivée en fioles agitées

- nutritional conditions and development of resistance. J. Gen. Microbiol. 136(8):1447-1454.
- Voelker F, Altaba S. 2001. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in '*Streptomyces pristinaespiralis*'. Microbiology 147(9):2447-2459.
- Weinberg D. 1978. Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. Folia Microbiol. 23(6):496-504.
- Yegneswaran PK, Gray MR, Thompson BG. 1991. Experimental stimulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: Effect on *Streptomyces clavuligerus*. Biotechnol Bioeng 38(10):1203-1209.
- Yegneswaran PK, Gray MR. 1991. Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentations. Biotechnol. Prog. 7(3):246-250

III.3. Influence de la puissance dissipée volumique sur la morphologie de *S. pristinaespiralis* pr11

S. pristinaespiralis peut se présenter sous trois formes morphologiques (filaments, enchevêtrements ou pelotes). Ces morphologies jouent un rôle important pour la rhéologie du milieu de culture. De plus, l'existence de pelotes, même peu denses, entraîne des limitations du transport de l'oxygène vers les bactéries situées en leur cœur (Papagianni, 2004). La proportion de biomasse métaboliquement active est dans ce cas potentiellement limitée à la zone externe de la pelote.

Des clichés de pelotes de *S. pristinaespiralis* pr11 ont été pris sous différentes conditions opératoires (Figure III-8) à 30 h de culture. Les images indiquent que (i) la morphologie est bien de type pelote, (ii) sous faible dissipation les pelotes présentent un plus grand diamètre qu'à forte dissipation. Pour confirmer ces clichés, des mesures de diamètre ont été réalisées. Le diamètre moyen des pelotes de *S. pristinaespiralis* pr11 a ainsi été suivi au cours du temps, lors des cultures présentées dans la publication précédente (Figure III-9). Le diamètre initial des particules est le même pour toutes les cultures et est de l'ordre de 20 μm . Le profil d'évolution du diamètre est le même pour toutes les cultures suivies. Dans un premier temps (jusqu'à 30 h de culture), celui-ci augmente puis décroît jusqu'à la fin de la culture. Des variations très sensibles du diamètre sont observées au cours du temps, quelles que soient les conditions de culture. La variation la plus faible est observée à 6,1 $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$ où le diamètre initial des pelotes est néanmoins multiplié par 2,5 environ après 30 h de culture. Le diamètre des pelotes diminue en fonction de la puissance dissipée volumique. Ainsi, le diamètre maximal des pelotes a été de 40 μm à 6,1 $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$ mais de 140 μm avec une dissipation de 0,55 $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$.

Les études concernant l'influence de l'hydrodynamique sur l'évolution de diamètre des pelotes de *Streptomyces* sont peu nombreuses dans la littérature. Tamura et al. (1997) ont rapporté qu'en réacteur, pour une faible vitesse d'agitation (400 rpm), la concentration en pelotes est plus importante chez *S. fradiae*. La surface des pelotes diminue avec l'augmentation de la vitesse d'agitation à 550, 750 et 900 rpm.

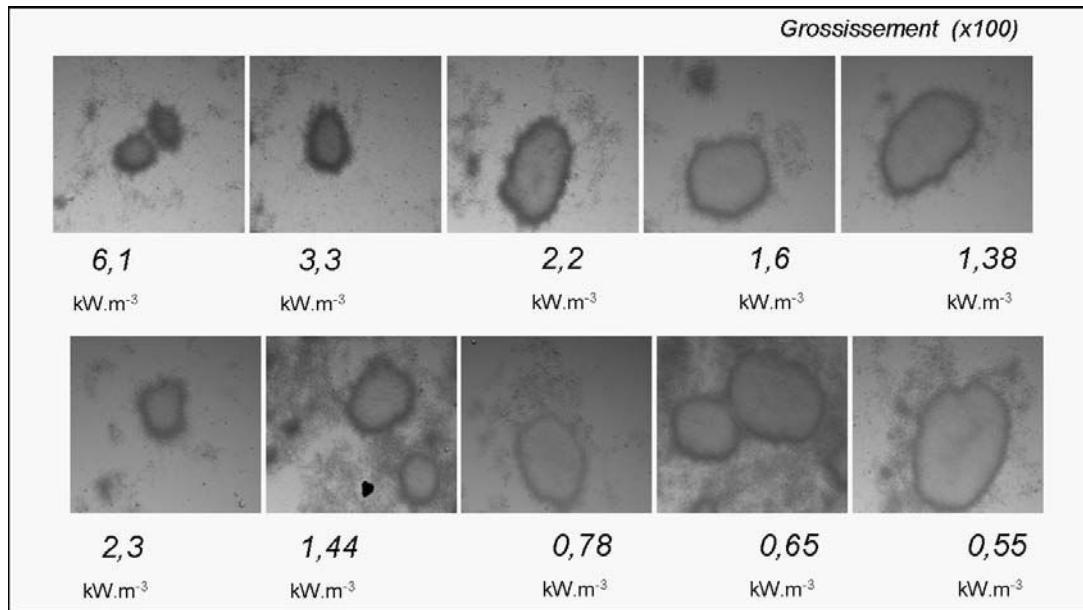


Figure III-8. Clichés de pelotes de *S. pristinaespiralis* pr11 à différentes valeurs de puissance dissipée volumique à 30 h de culture.

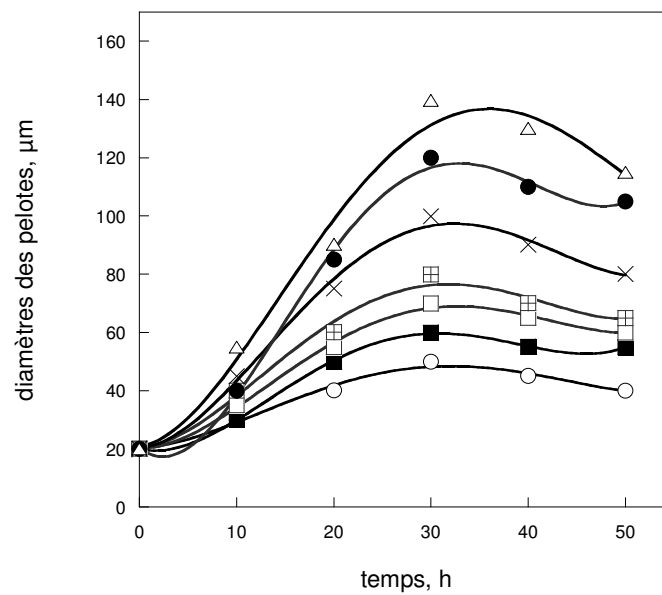


Figure III-9. Evolution du diamètre moyen des pelotes de *S. pristinaespiralis* pr11 au cours de cultures menées sous différentes conditions de puissance dissipée volumique. Les valeurs de P/V (kW.m^{-3}) et k_{La} (h^{-1}) sont : (6,1; 244, ○), (3,3; 137, ■), (2,2; 98, □), (1,6; 77, ⊕), (0,8; 66, ×), (0,65; 52, ●), (0,55; 43, △).

Diverses études ont été menées pour relier la morphologie à la production de métabolites. Ainsi, la productivité d'ivermectine est accrue en présence de petites pelotes et à haute densité par *S. avermitilis* (Yin et al., 2008). Plus de pelotes ou de concentration en biomasse ont été nécessaires pour la production de dipeptides et tripeptides bioactifs de nikkomycines par *S. tendae* (Vecht-Lifshitz et al., 1992). Cependant, les changements morphologiques n'ont pas été jugés sensibles pour la production de virginiamycine par *S. virginiae* (Yang et al., 1996) et d'acide clavulanique par *S. clavuligerus* (Belmar-Beiny et Thomas, 1991). Dans notre étude, la relation entre la forme morphologique et la production des pristinamycines sera abordée plus en détail aux chapitres V et VI de ce document.

III.4. Conclusion

Dans ce chapitre, l'influence de l'agitation (quantifiée par la puissance dissipée volumique) a été étudiée sur la croissance, la consommation des substrats, le taux de transfert de l'oxygène et sur le diamètre des pelotes. Ces paramètres ont été ensuite corrélés avec l'induction de la production des pristinamycines.

Nos résultats ont montré qu'une augmentation des dissipations conduisait à une concentration plus élevée en biomasse, un OUR plus élevé, une consommation plus rapide des substrats et une limitation rapide des éléments nutritifs qui aboutit à une induction plus précoce de la production des pristinamycines. Les vitesses spécifiques maximales de croissance, la consommation d'oxygène et de glutamate augmentent avec la puissance dissipée tandis que l'influence est moins marquée avec les vitesses spécifiques de consommation du glucose, de l'arginine, des ions ammonium et du phosphate. Les diamètres des pelotes sont sensiblement impactés par la puissance dissipée volumique. Les valeurs seuil de P/V ($\geq 2,2 \text{ kW.m}^{-3}$) et k_La ($\geq 100 \text{ h}^{-1}$) sont nécessaires pour l'induction de la production des pristinamycines dans le système de culture utilisé (fioles lisses d'un volume total de 250 mL).

Avec les conditions opératoires qui présentaient un OUR inférieur à $25 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ la production des pristinamycines n'a pas été obtenue même avec une limitation en azote et en phosphate tandis que les conditions opératoires permettant un OUR supérieur à $25 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ont permis la production des pristinamycines avec une limitation de l'azote. Ce résultat montre qu'en plus de la limitation nutritionnelle classiquement admise, un transfert suffisant d'oxygène est également nécessaire pour l'induction de la production de pristinamycines. L'apport insuffisant d'oxygène peut être soit issu d'un transfert d'oxygène gaz-liquide

insuffisant, soit d'une limitation diffusionnelle ou à l'interface des pelotes de plus grande taille.

Cette étude, effectuée en fioles de 250 mL, doit maintenant être confortée lors d'un changement de géométrie (fioles de 500 et 1000 mL) afin de tester la validité des critères d'extrapolation (P / V ; $k_L a$) pour la prédiction du déclenchement de la production en fioles agitées.

4^{ème} Chapitre

IV. Influence de la puissance dissipée volumique (P/V) et du coefficient volumique de transfert d'oxygène (k_La) sur la production des pristinamycines

*Cultures de $S. pristinaespiralis$ pr11 en fioles
agitées de 250, 500 et 1000 mL.*

Il a été montré dans le chapitre précédent qu'en fioles de 250 mL de volume total, le déclenchement et la quantité de pristinamycines produites par *S. pristinaespiralis* pr11 ainsi que la croissance de celle-ci pouvaient être reliés à la puissance dissipée. Par ailleurs, il a été montré que le déclenchement de la production n'était observé que si la limitation en substrat azoté était accompagnée d'un transfert d'oxygène suffisant. En effet, une légère surconsommation spécifique d'oxygène a été observée pour les conditions productrices de culture. Au final, des conditions de puissance dissipée ($P/V > 2 \text{ kW.m}^{-3}$) et de transfert d'oxygène ($k_La > 98 \text{ h}^{-1}$) ont été identifiées pour l'obtention de la production. Un certain nombre d'expériences complémentaires doit être mené afin de pouvoir généraliser les résultats précédents et de répondre aux questions suivantes :

1. Les paramètres globaux de caractérisation de l'hydrodynamique (puissance dissipée volumique et coefficient volumique de transfert d'oxygène) restent-ils pertinents lorsque leur gamme de valeurs est élargie ?
2. Ces paramètres peuvent-ils être utilisés pour corréler les concentrations caractéristiques de biomasse ou de pristinamycines ?
3. Est-il possible d'envisager le tracé d'un diagramme de production qui permettrait d'identifier *a priori* les conditions productrices dans un système de culture de type fiole d'Erlenmeyer lisse?

Afin de répondre à ces questions, des suivis cinétiques de biomasse et de concentration en substrats et en pristinamycines ont été réalisés. Les puissances dissipées volumiques et les coefficients volumiques de transfert d'oxygène ont été augmentés jusqu'à des valeurs respectives de 14 kW.m^{-3} et de 380 h^{-1} par l'utilisation de fioles de 500 et de 1000 mL de volume total. Des corrélations entre la dissipation volumique et le coefficient volumique de transfert d'oxygène et les principales réponses physiologiques ont été établies dans cette gamme de conditions opératoires hydrodynamiques. Une partie des résultats obtenus a donné lieu à une publication dans *Process Biochemistry* reproduite dans le paragraphe IV.1. Les résultats complémentaires non publiés seront présentés dans les paragraphes IV.2 à IV.6.

IV.1. Relation between pristinamycins production by *S. pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_{LA}

Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_{LA}

N. Mehmood, E. Olmos, P. Marchal, J.-L. Goergen, S. Delaunay*

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS UPR 3349, Nancy-Université, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, F-54505 Vandœuvre lès Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2009

Received in revised form 16 February 2010

Accepted 22 February 2010

Keywords:

Streptomyces
Volume mean power dissipation
Oxygen transfer
CFD
Shaking flask
Antibiotics
Volume of fluid

ABSTRACT

During bioreactor cultures, microorganisms are submitted to non-optimal conditions such as nutritional and hydrodynamic stresses which may lead to modifications of the physiological cell response; this is especially true for filamentous microorganisms like *Streptomyces* also subjected to significant morphological changes. In the present work, growth and production of pristinamycins by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks have been related to power dissipation. The filamentous bacteria were grown in different flask conditions with various total and working volumes and at two agitation rates, to test the influence of power dissipation and gas-liquid mass transfer coefficient on growth and antibiotics production. As a first step, computational fluid dynamics-volume of fluid (CFD-VOF) calculations were shown to be able to predict power dissipations for the various operating conditions in Newtonian flow conditions. Then, in non-Newtonian flow conditions (biomass concentration superior to 14 g L^{-1}), the rheological model of Sisko was implemented in CFD simulations for the calculation of the fluid viscosity and then of power dissipation. Whereas microbial growth was correlated to k_{LA} , the antibiotics production onset was linked to the volume mean power dissipation. Once a minimal cell concentration of 15 g L^{-1} was reached, the concentration of antibiotics was correlated to power dissipation with an optimal range of production, between 5.5 and 8.5 kW m^{-3} . Higher power dissipation entailed a drop in production which could be explained by hydrodynamic cell damages.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Streptomyces pristinaespiralis is used for the industrial production of pristinamycins. These antibiotics belong to the family of streptogramins. A mix of molecules consisting of approximately 30% pristinamycins I (PI_A, PI_B, and PI_C) and 70% pristinamycins II (PII_A, PII_B) is produced by *S. pristinaespiralis*. Each compound reversibly blocks protein synthesis and only displays bacteriostatic activity. In combination, they exhibit a synergistic bactericide activity. Pristinamycins are active against Gram-positive bacteria (especially *Staphylococcus* and *Streptococcus*) as well as some Gram-negative bacteria. Pristinamycins resistant pathogen strains are rarely encountered [1].

As all secondary metabolites, pristinamycins are produced under different stress conditions. Among the various stresses to which producing microorganisms are submitted during cultures in bioreactors, nutritional and hydrodynamic stresses are probably the most important, especially for filamentous microorganisms such as *Streptomyces*. Nutritional stress is a well-known phenomenon responsible for the induction of antibiotics production.

For instance, the consequences of phosphate depletion on bacterial growth and antibiotics production are well-documented in *Streptomyces* [2]. In *S. pristinaespiralis* Pr11, the production of pristinamycins has been correlated with the sequential use and the exhaustion of amino acids used as nitrogen and carbon sources [3]. It was also shown that, with this bacterium, the nature of the nitrogen source could govern the patterns of growth and pristinamycins production [4].

Many parameters which can directly influence biological cultures such as oxygen supply, carbon dioxide removal, degree of mixing and homogeneity and hydrodynamic stress are related to mechanical power dissipation. It was previously shown that the production of virginiamycin by *Streptomyces virginiae* depended on the oxygen supply, as a linear increase in the concentration of antibiotics occurred for cultures performed with dissolved oxygen tension from 10 to 80% [5]. The agitation rate was shown to have an influence on the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. According to Rosa et al. [6], the high agitation rate improve the production of this molecule and according to Large et al. [7], an optimal impeller tip speed exists. However, on the contrary, in the work of Belmar-Beiny and Thomas [8], an increase in the agitation rate had no significant influence on the production of clavulanic acid by *S. clavuligerus*.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 59 57 74; fax: +33 3 83 59 57 71.
E-mail address: stephane.delaunay@ensaia.inpl-nancy.fr (S. Delaunay).

Up to now, a relationship between the volumetric power dissipation and the production of antibiotics was never demonstrated. On one hand, the complex heterogeneity of the flow in gas–liquid stirred tank reactor is a key problem to precisely link power dissipation to cell response. On the other hand, typical engineering parameters have been described in shake flasks to ensure defined culture conditions. For instance, the oxygen transfer rate [9–13], the power consumption [14–16] and the mixing time [15–17] were shown to provide an engineering basis for scale-up. At last, nearly 90% of all laboratory cell cultures and fermentation experiments are performed in such devices [18]. As a consequence, the influence of the power dissipation on cell response can be advantageously studied in shake flasks.

The aim of this work was to evaluate relationships existing between the volume mean power dissipation, the gas–liquid mass transfer coefficient (k_{La}) and the pristinamycins production by *S. pristinaespiralis*. In order to apply different levels of power dissipation on this antibiotic-producing microorganism, a series of cultures were carried out in unbaffled flasks with different filling volumes, at two agitation rates, i.e. 250 and 350 rpm. Computational Fluid Dynamics (CFD) was used to precisely describe the hydrodynamics occurring in such device.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

The strain used throughout this study was *Streptomyces pristinaespiralis* Pr 11, a pristinamycins overproducing mutant strain provided by Sanofi-Aventis (Vitry sur Seine, France). *Listeria ivanovii* was used as a pristinamycins sensitive strain to detect the presence of pristinamycins in the culture broth of *S. pristinaespiralis*.

2.2. Media and culture conditions

2.2.1. Complex medium (ICS)

The ICS medium, used for the germination of *S. pristinaespiralis* spores, consisted of: sucrose 15 g L⁻¹, corn steep 5 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 10 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g L⁻¹, NaCl 3 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.2 g L⁻¹ and CaCO₃ 0.2 g L⁻¹ [19]. pH of this medium was adjusted at 6.8 prior to sterilization at 121 °C for 20 min.

2.2.2. Synthetic medium (MPS2)

MPS2 was the buffered synthetic medium in which *S. pristinaespiralis* was cultured for the production of pristinamycins. It is composed of: glucose 30 g L⁻¹, malonic acid 7.5 g L⁻¹, L-arginine 3 g L⁻¹, L-glutamate 1.5 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.3 g L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 15 mg L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0.55 g L⁻¹, 3-morpholinopropanesulfonic acid 20 g L⁻¹, K₂HPO₄ 0.75 g L⁻¹ and CaCl₂·2H₂O 0.40 g L⁻¹ [19]. pH was adjusted at 6.8 prior to sterilization for 20 min at 121 °C. Concentrated solutions of glucose, CaCl₂

and K₂HPO₄ were sterilized and added separately to avoid Maillard reactions and precipitations.

2.2.3. Culture conditions

Precultures were inoculated with 1 mL of thawed spores calibrated at 3 × 10⁷ CFU mL⁻¹ and poured into a 250 mL unbaffled flask containing 40 mL of ICS medium. The precultures were performed at 28 °C and 250 rpm on an orbital shaker having a 2.5-cm shaking diameter. After 20 h, this preculture was used to inoculate MPS2 medium (5% v/v) in 250, 500 or 1000 mL flasks. The cultures were performed for 48 h, at 28 °C, either at 250 or 350 rpm on the orbital shaker mentioned earlier. Different filling volumes were used according to the total volume of flasks: 10, 15, 20, 30, 40 and 50 mL were used for 250 mL flasks; 10, 20, 40, 60, 80 and 100 mL for 500 mL flasks; 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 and 200 mL for 1000 mL flasks.

2.2.4. Analytical methods

During the culture, samples were collected to measure biomass and pristinamycins concentration. The biomass concentration was determined by absorbance at 660 nm (U2000 spectrophotometer, Hitachi, France) according to the method described previously [20], and by gravimetric method. The presence of pristinamycins in fermentation broth was detected by growth inhibition zone: inoculation of a solid medium (agar MRS) containing the pristinamycins-sensitive bacterium *L. ivanovii* with a supernatant from *S. pristinaespiralis* culture [19]. For the quantitative analysis, pristinamycins were extracted from the culture broth and analysed by HPLC (LC 10 AD-VP, Shimadzu, France) [21]. The viscosity of culture broth was measured in a home-made rheo-reactor according to the method described by Nzihou et al. [22].

2.3. Flask geometry

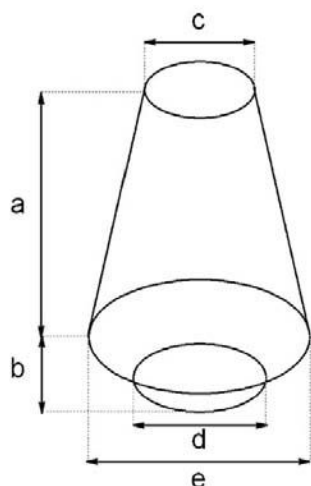
S. pristinaespiralis cultures were performed in unbaffled shake flasks provided by Schott (Clichy, France). The dimensions of the flasks used for the cultures are summarized in Fig. 1. Preliminary cultures in three- and four-baffles flasks did not allow the establishment of a relationship between power dissipation or k_{La} and the production of pristinamycins. This might be due to the attachment of most of the biomass on the surface of flasks during cultures at high agitation rates as reported by Galindo et al. [23]. Another possible explanation might be little changes in baffles design, medium splashing on the flask wall and on the cotton plug, more complex hydrodynamics and more difficult quantification of mechanical power dissipation and oxygen transfer as explained by Büchs [18]. The baffled systems have thus not been considered in the present study.

2.4. Oxygen transfer quantification

Various models have been proposed to determine volumetric gas–liquid mass transfer coefficient in shaking flasks. We have used the empirical equation (1) proposed by Maier [24] and used by Seletzky et al. [25]. This correlation is valid for the standard glass Erlenmeyer flasks and operating conditions that we have used in this study:

$$k_L a = 6.67 \times 10^{-6} N^{1.16} V_L^{-0.83} d_0^{0.38} d^{1.92} \tag{1}$$

where $k_L a$ is the volumetric gas–liquid mass transfer coefficient (s⁻¹), N the shaking frequency (rpm), V_L (mL) the working volume, d_0 (cm) the shaking diameter and d



Dimensions (cm)	250 mL flask	500 mL flask	1000 mL flask
a	9.6	12	14.4
b	1.6	2	2.4
c	2.8	3.5	4.2
d	5.6	7	8.4
e	8	10	12

Fig. 1. Dimensions of the 250, 500 and 1000 mL Erlenmeyer flasks used in the experiments.

(cm) the maximum shake flask diameter. The gas–liquid mass transfer was expected to be strongly coupled with flask geometry (modification of the interfacial area a) and agitation conditions (modification of both the liquid-side mass transfer coefficient k_L and the interfacial area a). For surface aerated culture systems, no general function relating $k_L a$ to power dissipation was found in the literature. Indeed, the structure of the free surface and thus the interfacial area was expected to change dramatically with power dissipation.

3. Numerical simulation

To predict the free surface flow, Computational Fluid Dynamics (CFD) was used. Calculation of the velocity field in the reactors and of the gas–liquid free surface are both required. As no bubble was considered for the calculations, the gas and liquid phases were clearly separated and non-interpenetrating. The Volume Of fluid (VOF) approach appeared as the most suitable and available numerical method for the prediction of this gas–liquid system.

3.1. Volume of fluid (VOF) approach

The VOF approach [26] was used to calculate the shape of the free surface and flask hydrodynamics. It has been successfully used to characterize the interfacial area in large shaking flasks [27,28]. This model is based on the calculation of a single mixture phase using a set of Navier–Stokes equations. The characterization of the additional phase (here, the gas phase) was performed using a transport equation for the gas volume fraction α_g . As oxygen solubility is very low in water, mass transfer could be supposed negligible and the transport equation thus stated as following:

$$\frac{\partial(\alpha_g \rho_g)}{\partial t} + \nabla \cdot (\alpha_g \rho_g \mathbf{u}_g) = 0 \quad (2)$$

where \mathbf{u} is the velocity of a given phase. The constraint $\alpha_g + \alpha_l = 1$ was added for the calculation of the liquid volume fraction (α_l being the liquid volume fraction). For this study, it was considered that $\alpha_g = \alpha$. All other parameters (velocities, properties) were shared by the two phases in the single mixture phase whose properties (density and viscosity) were given by the following equation:

$$\rho = \alpha \rho_g + (1 - \alpha) \rho_l, \quad \mu = \alpha \mu_g + (1 - \alpha) \mu_l \quad (3)$$

with $\rho_{l,g}$ and $\mu_{l,g}$ the densities and the viscosities of the liquid and gas phases respectively. For Newtonian conditions, the liquid viscosity was assumed constant to 1 mPa s.

For non Newtonian flows, the viscosity was calculated on the basis of the fit of experimental viscosity measurements using the rheological model of Sisko that allows the description of both Newtonian and non-Newtonian shear-thinning flows:

$$\mu = \mu_\infty + K \dot{\gamma}^{n-1} \quad (4)$$

with n the power law index, K (Pa s^{*n*}) the consistency index, μ_∞ (Pa s) the infinite shear viscosity and $\dot{\gamma}$ (s⁻¹) the local shear rate. Using this rheological model, CFD was used to calculate the mean equivalent viscosity of the suspension for non-Newtonian conditions.

Assuming transient flow, the momentum transport equation stated as follows:

$$\frac{\partial(\rho \mathbf{u})}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u} \cdot \mathbf{u}) = -\nabla p + \mu \Delta \mathbf{u} + \rho \mathbf{g} + \mathbf{F}_{ST} \quad (5)$$

\mathbf{g} (m s⁻²) is the gravity force, p (Pa) is the fluid pressure and \mathbf{F}_{ST} (N m⁻³) is the surface tension force proposed previously [29]:

$$\mathbf{F}_{ST} = \sigma \kappa \mathbf{n} \quad (6)$$

σ (N m⁻¹) was the surface tension, κ (m⁻¹) was the local curvature and \mathbf{n} was the vector normal to the interface.

Table 1
Operating conditions of the systems simulated by CFD, considering the culture broth as water.

	250 mL flask	500 mL flask	1000 mL flask
V_L (mL)	10, 20, 40, 80	10, 20, 40, 80, 100	80, 100, 200
N (rpm)		250 and 350	
Re	27 000; 37 000	42 000; 58 000	60 000; 84 000
Re_f	[93; 2500]	[146; 5500]	[700; 3500]

3.2. Numerical parameters

The calculation domain was divided into 105,000 tetrahedral cells in the case of Newtonian flow and into 460,000 cells for non-Newtonian flow that formed an unstructured mesh. These equations were solved with the commercial software Fluent 6.2.16™ on a bi-dual Xeon@1.6GHz equipped with 3 Go RAM. The single reference frame was used to take into account the rotational forces on the liquid. The rotation diameter corresponded to the agitation diameter of the table. Flask movement was described by a counter-rotation of the outer-wall centered on the flask core. The boundary conditions were an atmospheric pressure inlet on top of the domain, no-slip stationary walls for reactor walls. Time steps were 5×10^{-4} s (however smaller values were required at the beginning of the simulation). Around ten complete impeller rotations were necessary to obtain a stabilized averaged gas–liquid interface which led to 48 real hour simulations approximately for a given operating condition. The occurrence of a purely swirling flow promoted a pseudo-steady-state solution.

The momentum and volume fraction transport equations were respectively discretized with a second order UPWIND and Geo-Reconstruct scheme and pressure–velocity coupling was solved with a PISO algorithm. Laminar flow was supposed. Preliminary calculations have shown that the use of a turbulence model, which should be discussed according to the relatively high values of the Reynolds numbers, provided globally less pertinent results than a laminar simulation. Indeed, the rotational flow occurring in unbaffled shaking flask was expected to entail a highly anisotropic turbulent flow which was not compatible with the hypothesis of the isotropy made by most of the turbulence models. Moreover, a recent study [30], based on the measurement of the ratio of the maximum dissipation rate to the average value, has shown that the turbulent regime was probably occurring above $Re = 60,000$. The values of Reynolds number remained under this critical value, except for the 1000 mL flask at $N = 350$ rpm. The power dissipation in the liquid was thus obtained by the following equation:

$$\frac{P}{V_L} = \frac{1}{V_L} \iiint_V [\mu \dot{\gamma}^2 (1 - \alpha)] dV \quad (7)$$

In the preceding equation, P (W) was the mechanical power, V_L the liquid working volume, $\dot{\gamma}$ (s⁻¹) the local shear rate and α the liquid volume fraction. The operating conditions used for numerical simulations are summarized in Table 1.

4. Results

4.1. Volume mean power dissipation calculation

The volume mean power dissipation in shaking flasks is a complex function of flask size, working volume, rotational rate and viscosity. The influence of biomass concentration on liquid viscosity was quantified by rheology measurements. The results of viscosity measurements for various biomass concentrations are shown in Fig. 2. These rheograms showed that for biomass concentrations under 14 g L⁻¹, broth viscosity was independent of shear rate, which depicted a Newtonian flow behavior, the viscosity being sim-

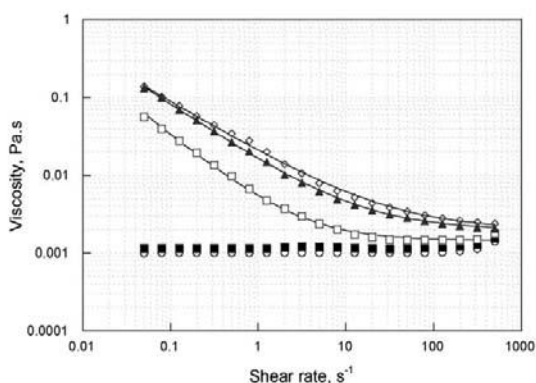


Fig. 2. Shear viscosity versus shear rate for microbial suspensions with various biomass concentrations: 10 g L⁻¹ (○), 12 g L⁻¹ (■), 14 g L⁻¹ (□), 15 g L⁻¹ (▲) and 18 g L⁻¹ (◇). The experimental data were represented by symbols and the values calculated by the rheological model of Sisko (for 14, 15 and 18 g L⁻¹) by continuous lines. For biomass concentrations of respectively 14, 15 and 18 g L⁻¹, parameters of the Sisko rheological model were: $\mu_{\infty} = 0.00145$ Pa s, $n = 0.1$, $K = 0.00405$ Pa s^{0.1}; $\mu_{\infty} = 0.002$ Pa s, $n = 0.26$, $K = 0.0145$ Pa s^{0.26}; $\mu_{\infty} = 0.002$ Pa s, $n = 0.34$, $K = 0.0191$ Pa s^{0.34}.

ilar to water. For biomass concentrations equal to or higher than 14 g L⁻¹, broth rheology was non-Newtonian; however a Newtonian plateau was observed for shear rates ($\dot{\gamma}$) superior to 100 s⁻¹, which corresponds to the range of shear rates encountered in shaking flasks. The parameters of the rheological model (Eq. (4)) were identified for biomass concentrations equal to 14, 15 and 18 g L⁻¹. Viscosity data fitting was very satisfactory for each operating condition tested (Fig. 2).

In “in-phase” conditions, literature provides a correlation for the calculation of power dissipation in unbaffled shaking flasks [14]. Thus, it has been first verified that the operating conditions used in this study were “in-phase”. The critical transition Reynolds number Re_T proposed by Büchs et al. [14,31] was thus calculated by the following relation:

$$Re_T = Re \frac{\pi}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V_L^{1/3}}{d} \right)^2} \right]^2 \quad (8)$$

The results presented in Table 1 show that Re_T is superior to the ratio of maximum flask diameter on shaking diameter (d/d_0) which is respectively equal to 3.2, 4 and 4.8 for 250, 500 and 1000 mL flasks. All these cultures are thus “in-phase”, meaning that liquid and culture device respectively display a synchronized movement. The power dissipation (P) in unbaffled shaking flasks was then calculated according to the equation proposed by [14]:

$$Ne' = 70Re^{-1} + 25Re^{-0.6} + 1.5Re^{-0.2} \quad (9)$$

With the modified Newton number Ne' and the Reynolds number Re given by:

$$Ne' = \frac{P}{\rho N^3 d^4 V_L^{1/3}}, \quad Re = \frac{\rho N d^2}{\mu} \quad (10)$$

With d (m) the maximum flask diameter, N (s⁻¹) the rotational frequency, and ρ (kg m⁻³) the density of liquid. In Newtonian conditions, μ (Pa s), the dynamic viscosity was supposed constant (1 mPa s). In this case, the volume mean power dissipation was also calculated using CFD as described in the materials and methods section and compared to values given by Eq. (9). The comparison of our numerical results with data calculated according to the reference method proposed by [14] is shown in Fig. 3 for the three flask sizes.

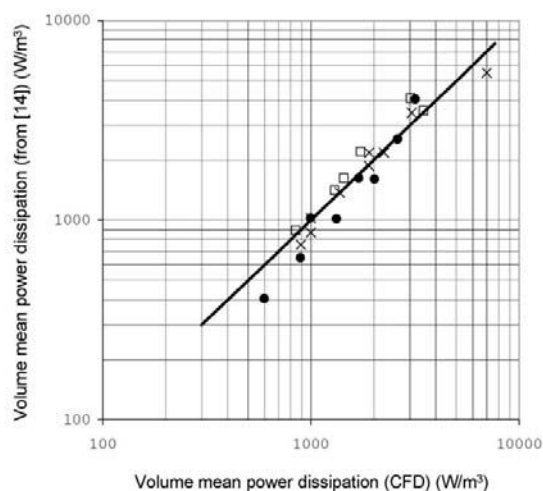


Fig. 3. Comparison of volume mean power dissipation calculated by CFD in unbaffled 250 mL (●), 500 mL (×) and 1000 mL (□) Erlenmeyer flasks with the reference method proposed by Büchs et al. [14] (continuous line).

The agreement between power dissipation calculated using CFD and Eq. (9) was satisfactory, especially for 500 and 1000 mL flasks. When 250 mL Erlenmeyer flasks were used, the prediction was less satisfactory but still acceptable. It has to be noticed that the use of a refined mesh (460,000 cells) did not increase the precision of the results. Moreover, as stated by Büchs et al. [14], an imprecision may arise from Eq. (9) for some operating conditions, which may explain the difference between CFD results and Eq. (9). CFD is thus an adequate tool for the calculation of velocity fields in unbaffled shaking flasks.

As no general correlation was available for the prediction of shear rate in non-Newtonian flow in shaking flask, CFD tool was used for the prediction of mean viscosity in the case of non-Newtonian conditions. To perform this, rheological data calculated by Eq. (4) were implemented in CFD calculations for each mixing condition with a maximum biomass concentration superior to 14 g L⁻¹. The results obtained are depicted in Table 2. As it can be seen, viscosities mainly remained in the range [1;3 mPa s] and are thus approximately one of order of magnitude lower than the values encountered in fungal cultures [32]. Moreover, the occurrence of a Newtonian plateau in the range of shear rates encountered in shaking flasks limits the impact of broth viscosity on power dissipation and oxygen transfer. Thus, this justified the use of relation (1) for the quantification of oxygen transfer rate coefficients [33,34].

4.2. Influence of power dissipation and oxygen transfer on biomass growth

Cultures were performed in Erlenmeyer unbaffled flasks of 250, 500, or 1000 mL at either 250 or 350 rpm in order to sweep a wide range of power dissipation. *S. pristinaespiralis* was grown in working volumes from 10 to 50 mL in 250 mL flasks, from 10 to 100 mL in 500 mL and from 20 to 200 mL in 1000 mL flasks, as described in the material and methods section. In these culture conditions, the volume mean power dissipation ranged from 0.55 to 13.6 kW m⁻³ and the gas–liquid mass transfer coefficient from 29 to 374 h⁻¹. The maximum biomass concentration was determined for the different culture conditions tested. Whereas no correlation could be established between the biomass concentration and the power dissipation (data not shown), the maximum biomass concentration appeared to be affected by the k_La value (Fig. 4).

Table 2
Values of mean viscosities of fermentation broth determined by CFD calculations in case of non-Newtonian flow (maximum biomass concentration higher than 14 g L^{-1}).

Total volume of flask (mL)		250			500			1000		
N (rpm)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Filling volumes (mL)	10	10	15	20	10	15	20	10	15	20
Biomass (g L^{-1})	15.4	15.4	14.9	14	15.4	15.4	14.8	17.5	16.5	15.7
Viscosity (mPa s)	3.00	3.00	1.67	3.48	3.14	3.14	2.55	2.78	3.02	2.40
Total volume of flask (mL)		500			500			1000		
N (rpm)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Filling volumes (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Biomass (g L^{-1})	15.7	15.7	17.5	15.4	15.4	15.4	14.8	17.5	16.5	15.7
Viscosity (mPa s)	2.60	2.60	3.00	3.14	3.14	3.14	2.55	2.90	3.02	2.40
Total volume of flask (mL)		1000			1000			1000		
N (rpm)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Filling volumes (mL)	20	20	40	20.1	20.1	20.1	18.3	17.5	16.5	15.7
Biomass (g L^{-1})	18.2	18.2	15.6	2.7	2.7	2.7	2.97	2.90	3.02	2.40
Viscosity (mPa s)	3.00	3.00	2.78	2.78	2.78	2.78	2.97	2.90	3.02	2.40

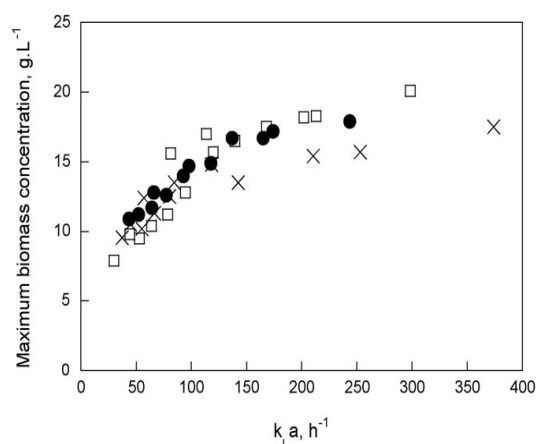


Fig. 4. Relationship between the gas–liquid mass transfer coefficient and the maximum biomass concentration in 250 mL (●), 500 mL (×) and 1000 mL (□) Erlenmeyer flasks.

Two phases were observed: (i) a first phase corresponding to the lowest values of k_La , where the biomass concentration increased rapidly with the k_La ; (ii) a second phase, where the biomass titer reached values higher than 15 g L^{-1} , where the increase in the k_La had a weaker effect on the cell density. In fact, the transition between those two phases occurred for a k_La of 100 h^{-1} whatever the type of flask.

4.3. Influence of power dissipation and oxygen transfer on the onset of pristinamycins production

In order to assess the influence of power dissipation on the onset of pristinamycins production by *S. pristinaespiralis*, antibiotics production was determined during the previously presented 250, 500 and 1000 mL Erlenmeyer fermentations (Fig. 5). For all cultures tested, pristinamycins production occurred above a clear threshold of power dissipation. A volume mean power dissipation varying from 2.3 to 5.6 kW m^{-3} was necessary to get an antibiotics production in those batch cultures performed in Erlenmeyer flasks of 250, 500 and 1000 mL. However, this value increased with the total volume of the flasks. These results suggest that power dissipation could be one of the main parameters responsible for these secondary metabolites production.

One hypothesis is that the effect of the volume mean power dissipation could be indirect, through a modification of mass transfers including oxygen transfer. Therefore, k_La was calculated according to a correlation previously published [24,25] for all batch cultures and the presence or absence of antibiotics production was plotted against the calculated values of k_La (Fig. 6). As for the volume mean power dissipation, production occurred only for the values of k_La , superior to 100 h^{-1} , whatever the type of flask used. On the contrary, no production was observed for values of k_La inferior to 80 h^{-1} . In-between those two extreme zones, there was no correlation between k_La and the presence of antibiotics (overlapping zone).

From the data collected on the onset of the pristinamycins production, a diagram of production of pristinamycins by *S. pristinaespiralis* could be established (Fig. 7). Two zones could be distinguished in this diagram. On one hand, when both k_La and volume mean power dissipation values remained low, pristinamycins were not produced. On the other hand, when both k_La and volume mean power dissipation values exceed a threshold simultaneously or when low values of k_La were compensated by a high value of power dissipation and *vice versa*, antibiotics were produced.

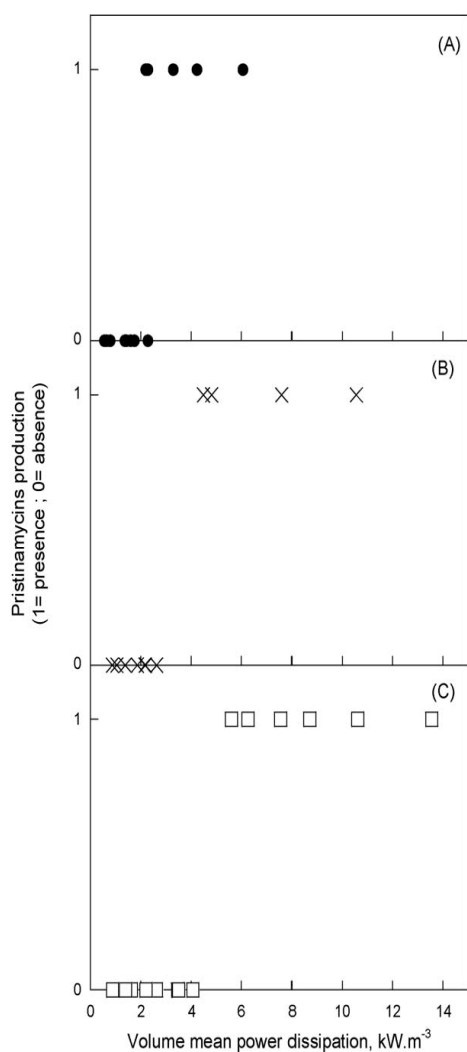


Fig. 5. Relationship between the onset of the pristinamycins production and power dissipation in 250 mL (A), 500 mL (B) and 1000 mL (C) flasks. A zero-ordinate means no production and an ordinate equal to 1, means production.

4.4. Influence of power dissipation on the concentration of pristinamycins

The concentration of pristinamycins was determined for each producing culture. For the operating conditions which entailed production, it appeared that the maximal pristinamycins concentration was strongly dependent on the volume mean power dissipation applied in the flasks (Fig. 8A). In fact, three zones have been identified: (i) a linear increase in the pristinamycins concentration with the power dissipation; (ii) a plateau phase (around 45 mg L^{-1}) for power dissipation values ranging from 5.5 to 8.5 kW m^{-3} ; (iii) beyond 8.5 kW m^{-3} , a rapid and linear decrease in the antibiotic concentration. None of the experiments entailed a non-production of antibiotics at high values of power dissipation. Regarding the pristinamycins on biomass yield (Fig. 8B), a very similar pattern was obtained. The maximum yield reached 3 mg g^{-1} for a power dissipation of 8 kW m^{-3} . Therefore, the increase in the pristinamycins concentrations observed on Fig. 8A was not only due to an increase in the biomass concentration.

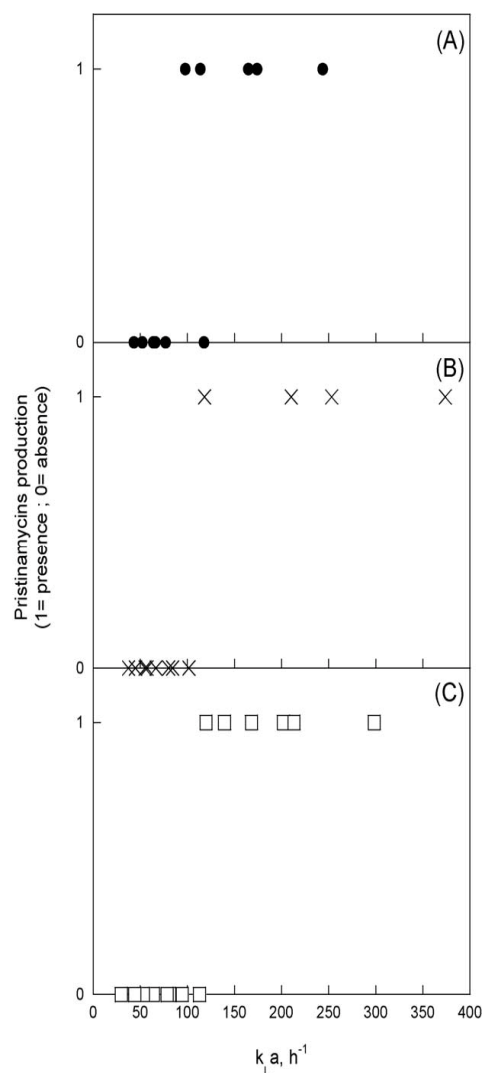


Fig. 6. Relationship between the onset of the pristinamycins production and the gas-liquid mass transfer coefficient, $k_L a$ (h^{-1}) in 250 mL (A), 500 mL (B) and 1000 mL (C) flasks. A zero-ordinate means no production and an ordinate equal to 1, means production.

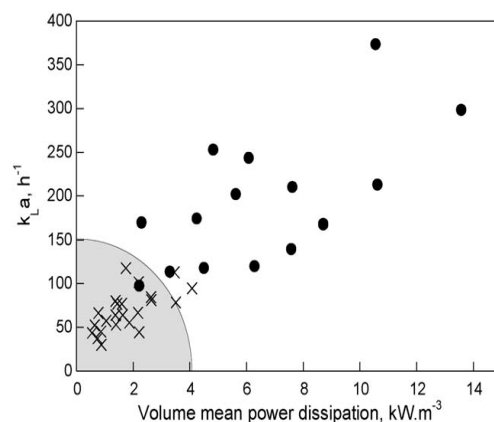


Fig. 7. Production diagram (\times : absence of pristinamycins production; \bullet : presence of pristinamycins production). The grey zone corresponds to the non-producing conditions.

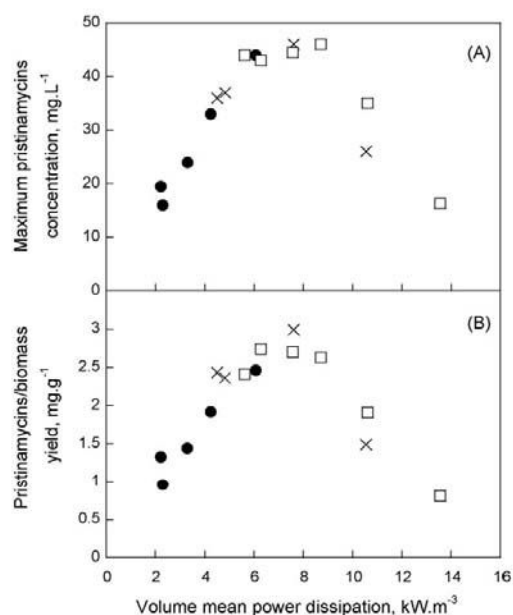


Fig. 8. Variation of pristinamycins maximum concentration (A) and of pristinamycins/biomass yield (B) with power dissipation in 250 mL flasks (●), 500 mL flasks (×) and 1000 mL flasks (□).

5. Discussion

As the biomass concentration is known to affect the viscosity of the culture broth, rheograms were realised at various biomass concentrations. The medium broth appeared to be a Newtonian fluid for biomass concentrations below 14 g L^{-1} and non-Newtonian otherwise.

To evaluate the influence of the volume mean power dissipation on the production of antibiotics by *S. pristinaespiralis* grown in Erlenmeyer flasks, a first step consisted in determining this parameter by numerical simulation in Newtonian conditions. The results of our numerical simulations showed that CFD could be used to predict the volume mean power dissipation in laboratory-scale unbaffled shaking flasks ranging from 250 to 1000 mL, with different working volumes and agitation rates of 250 or 350 rpm supposing a Newtonian behavior. In fact, the values obtained with a reference method using an empirical equation [14] agreed with those calculated by our numerical method.

For biomass concentrations higher than 14 g L^{-1} , the viscosity calculated using CFD (equation 4) was implemented in power dissipation calculation (equation 9). This allowed verifying that the broth viscosity remained close to water viscosity in the cultures performed in this study (Table 2). Moreover, the range of shear rates encountered in our culture conditions promotes a Newtonian behavior due to the Newtonian plateau.

The power dissipation taken alone was sufficient to predict the occurrence of antibiotics production by *S. pristinaespiralis* but only if a given flask geometry was considered. Our results put into evidence a linear dependence of the maximal biomass concentration with the volumetric gas–liquid mass transfer coefficient (k_La). This biomass increases with k_La was characteristic of an oxygen limitation during the cultures. However, as can be seen in Fig. 4, two slopes were obtained depending on the maximal biomass titer reached during the batch processes (maximum biomass concentration inferior to 15 g L^{-1} or higher than 15 g L^{-1}). In batch culture

the oxygen balance leads to Eq. (11):

$$X_{\max} = \left[k_La(O_2^* - O_2) - \frac{dO_2}{dt} \right] \frac{1}{v_{O_2}} \quad (11)$$

where X_{\max} (g L^{-1}) is the maximum biomass concentration, v_{O_2} ($\text{mol s}^{-1} \text{g}^{-1}$) the specific oxygen consumption rate, O_2^* (mol L^{-1}) the saturation oxygen concentration and O_2 (mol L^{-1}) the oxygen concentration in the liquid phase. The two linear relationships observed experimentally were thus characteristic of the steady-state regime ($dO/dt=0$). In the second phase, the maximal biomass concentration increase was less pronounced; this could be due to a higher specific oxygen consumption rate or additional nutrient limitation in the culture medium when biomass titer reached 15 g L^{-1} .

As antibiotics production onset was observed only for maximum biomass concentration higher than 15 g L^{-1} , it could be suggested that a nutrient limitation occurred at such biomass concentrations. The production of secondary metabolites generally takes place when a nutritional limitation occurs in the culture medium [35–38]. These nutritional limitations involve carbon, nitrogen or phosphate sources. In fact, the production of pristinamycins by *S. pristinaespiralis* was shown to be affected by the nature and concentration of the nitrogen source as antibiotics excretion occurs only when the ammonium concentration becomes limiting [4].

The effect of agitation on morphology, cell growth and production yield have been investigated for several processes involving filamentous microorganisms [38]. However, mixing effects are not generic and are dependent upon strain, medium composition and preculture conditions. Very few studies deal with the influence of this parameter on antibiotics production. Concerning the production of pristinamycins by *S. pristinaespiralis*, this study demonstrated that the power dissipation might have an influence on the concentration of antibiotics produced. It was clearly shown that power dissipation effect on pristinamycins titer was not related to a higher biomass concentration as the pristinamycins/biomass ratio increased with the volume mean power dissipation encountered in the Erlenmeyer flasks. The increase in the power dissipation was not the sole parameter influencing the onset of the production, since it had to be coupled with a transfer of oxygen sufficient to yield concentrations of biomass higher than 15 g L^{-1} . However, when the antibiotics production occurred, the concentration of pristinamycins was correlated with the volume mean power dissipation. This is the first time that such a relation is shown.

An increase in the power dissipation was expected to both entail a higher mass transfer and higher hydrodynamic stresses. In the first phase of Fig. 8A, the increase in the power dissipation had a positive effect on antibiotics production, suggesting that the transfer of some nutrients might be limiting to reach the maximal value of pristinamycins concentration. A similar result was previously shown for the production of clavulanic acid by *S. clavuligerus*. High impeller rates improved clavulanic acid titer and productivity, probably by increasing the rates of transfer of glycerol (carbon source) into the cells and clavulanic acid out of the cells [6]. On the contrary, an increase in the agitation rate was shown to have no significant influence on the production of clavulanic acid by *S. clavuligerus* [8]. The range of power dissipation for which the production of pristinamycins was maximum, might correspond to a zone where the increase in the mass transfer tended to be compensated by the increase in damaging hydrodynamic stresses. A similar optimal mixing condition was observed by Large et al. [7] for the production of clavulanic acid by *S. clavuligerus*. For higher power dissipations, a rapid decrease in pristinamycins concentration was determined. This could be related to microbial pellet damages. Indeed, it was shown that the increase in the agitation rate induced a decrease in the production of penicillin by the fungus *Penicillium*

chrysogenum due to a reduction of the main hyphal length [39].

Complementary experiments should be performed in sparged stirred tank reactors to test the validity of power dissipation as generalizable criterion for antibiotics production by *S. pristinaespiralis* or other *Streptomyces* species. However, in those systems, fully turbulent flow generally occurs and power dissipation is expected to exhibit strong spatial heterogeneities, challenging the validity of the use of mean power dissipation. Moreover, a precise kinetic study of carbon, nitrogen and phosphate sources consumption should be performed. Lastly, the morphology of *S. pristinaespiralis* should be tracked during those cultures to detect possible hydrodynamic damage of microbial pellets.

References

- [1] Soussy CJ, Acar JF, Cluzel R, Courvalin P, Duval J, Fleurette J, et al. A collaborative study of the in-vitro sensitivity to RP 59500 of bacteria isolated in seven hospitals in France. *J Antimicrob Chemother* 1992;30:53–8.
- [2] Martin JF. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR–PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol* 2004;186:5197–201.
- [3] Corvini PFX, Delaunay S, Maujean F, Rondags E, Vivier H, Goergen JL, et al. Intracellular pH of *Streptomyces pristinaespiralis* is correlated to the sequential use of carbon sources during the pristinamycin-producing process. *Enzyme Microb Technol* 2004;34:101–7.
- [4] Voelker F, Altaba S. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology* 2001;147:2447–59.
- [5] Shioya S, Morikawa M, Kajihara Y, Shimizu H. Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:164–9.
- [6] Rosa JC, Neto AB, Hokka CO, Badino AC. Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioproc Biosyst Eng* 2005;27:99–104.
- [7] Large KP, Ison AP, Williams DJ. The effect of agitation rate on lipid utilization and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol* 1998;63:111–9.
- [8] Belmar-Beiny MT, Thomas CR. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: effect of stirrer rate in batch fermentations. *Biotechnol Bioeng* 1991;37:456–62.
- [9] Anderlei T, Büchs J. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem Eng J* 2001;7:157–62.
- [10] Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem Eng J* 2004;17:187–94.
- [11] Auro M, Hodge H, Roth N. Oxygen absorption rates in shaken flasks. *Ind Eng Chem* 1957;49:1237.
- [12] Maier U, Büchs J. Characterisation of the gas–liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 2001;7:99–106.
- [13] Maier U, Losen M, Büchs J. Advances in understanding and modeling the gas–liquid mass transfer in shake flasks. *Biochem Eng J* 2004;17:155–67.
- [14] Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines. II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng* 2000;68:594–601.
- [15] Kato Y, Hiraoka S, Tada Y, Shirai S, Ue T, Koh ST, et al. Power consumption of horizontally shaking vessel with circulating motion. *Kagaku Kogaku Ronbunshu* 1995;21:365–71.
- [16] Sumino Y, Akiyama S, Fukuda H. Performance of the shaking flask. I. Power consumption. *J Ferment Technol* 1972;50:203–8.
- [17] Gerson DF, Kole MM. Quantitative measurements of mixing intensity in shake-flasks and stirred tank reactors: use of the Mixmeter, a mixing process analyzer. *Biochem Eng J* 2001;7:153–6.
- [18] Büchs J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J* 2001;7:91–8.
- [19] Saffroy S. Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. PhD Thesis. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France; 2006.
- [20] Lubbe C, Demain AL, Bergman K. Use of controlled-release polymer to feed ammonium to *Streptomyces clavuligerus* cephalosporin fermentations in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* 1985;22:424–7.
- [21] Thibaut D, Ratet N, Bisch D, Faucher D, Debussche L, Blanche F. Purification of the two-enzyme system catalyzing the oxidation of the α -proline residue of pristinamycin II(B) during the last step of pristinamycin II(A) biosynthesis. *J Bacteriol* 1995;177:5199–205.
- [22] Nzihou A, Boumonville B, Marchal P, Choplin L. Rheology and heat transfer during mineral residue phosphatation in a rheo-reactor. *Chem Eng Res Des* 2004;82:637–41.
- [23] Galindo E, Flores C, Larralde-Corona P, Corkidi-Blanco G, Rocha-Valadez JA, Serrano-Carreón L. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochem Eng J* 2004;18:1–8.
- [24] Maier U. Gas–Flüssigkeits–Stofftransfer im schüttel kolben. PhD Thesis. RWTH Aachen University, Aachen; 2002.
- [25] Seletzky JM, Noak U, Fricke F, Welk E, Eberhard W, Knocke C, et al. Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnol Bioeng* 2007;98:800–11.
- [26] Hiirt CW, Nichols BD. Volume of fluid (VOF) method for the dynamics of free boundaries. *J Comput Phys* 1981;39:201–25.
- [27] Zhang H, Williams-Dalson W, Keshavarz-Moore E, Shamlou PA. Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas–liquid mass transfer in shake flasks. *Biotechnol Appl Biochem* 2005;41:1–8.
- [28] Zhang X, Bürki C-A, Stettler M, De Sanctis D, Perrone M, Discacciati M, et al. Efficient oxygen transfer by surface aeration in shaken cylindrical containers for mammalian cell cultivation at volumetric scales up to 1000L. *Biochem Eng J* 2009;45:41–7.
- [29] Brackbill JU. A continuum method for modeling surface tension. *J Comput Phys* 1992;100:335–54.
- [30] Peter CP, Suzuki Y, Büchs J. Hydromechanical stress in shake flasks: correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnol Bioeng* 2006;93:1164–76.
- [31] Büchs J, Lotter S, Milbradt C. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 2001;7:135–41.
- [32] Riley GL, Tucker KG, Paul GC, Thomas CR. Effect of biomass concentration and mycelium morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnol Bioeng* 2000;68:160–72.
- [33] Badino AC, Facciotti MCR, Schmidell W. Volumetric oxygen transfer (k_{LO}) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. *Biochem Eng J* 2001;8:111–9.
- [34] Henzler HJ, Schedel M. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioproc Eng* 1991;7:123–31.
- [35] Demain AL, Aharonowitz Y, Martin JF. Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. In: Vining, editor. *Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics*. London: Addison-Wesley; 1983. p. 49–67.
- [36] Doull JL, Vining LC. Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* 1990;32:449–54.
- [37] Cheng YR, Fang A, Demain AL. Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995;43:1096–8.
- [38] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 2004;22:189–259.
- [39] Makagiarsar HY, Ayazi Shamlou P, Thomas CR, Lilly MD. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioproc Eng* 1993;9:83–90.

IV.2. Relation entre dissipation volumique et concentration de biomasse

La Figure IV-1 illustre la relation entre la dissipation volumique et la concentration maximale en biomasse.

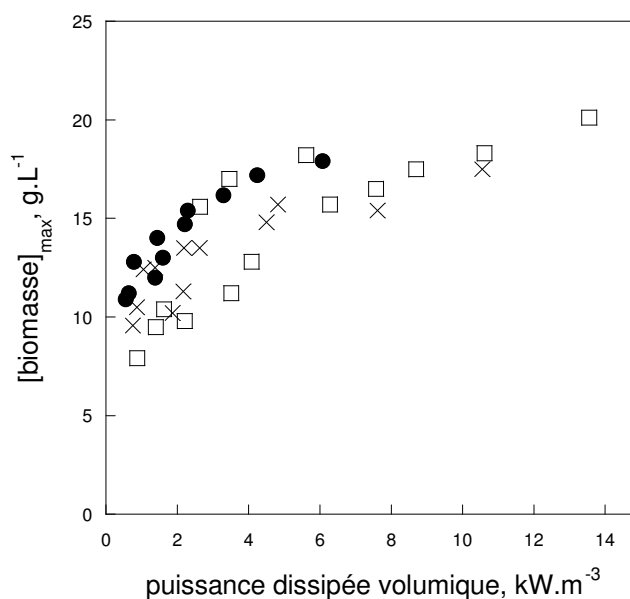


Figure IV-1 Influence de la puissance dissipée volumique sur la concentration maximale en biomasse en fioles de 250 (●), 500 (×) et 1000 mL (□)

La relation entre k_{La} et la concentration maximale de la biomasse a été présentée dans la Figure 4 de l'article. Tout comme dans le cas de fioles de 250 mL, la concentration maximale de la biomasse augmente également avec la puissance dissipée volumique en fioles de 500 et 1000 mL. On note ainsi une rapide augmentation de celle-ci jusque 6 kW.m⁻³ puis une valeur asymptotique de 17 g.L⁻¹ environ au-delà de 6 kW.m⁻³. Néanmoins, globalement, la puissance dissipée et la concentration maximale de la biomasse se corrélaient de manière moins satisfaisante qu'avec le coefficient volumique de transfert d'oxygène (voir la Figure 4 de l'article précédent). Ainsi, pour des valeurs similaires de puissance dissipée volumique, on peut noter une grande variation de la concentration maximale en biomasse. Par exemple, à 4 kW.m⁻³, cette concentration maximale varie entre 10 et 16 g.L⁻¹ environ. Ces variations sont

plus significatives pour les faibles valeurs de puissance dissipée. A noter, que d'un système de culture à l'autre, une valeur identique de puissance n'implique pas une valeur identique de k_La . Il semblerait donc que la concentration maximale de la biomasse soit corrélée au transfert d'oxygène, indépendamment du mélange global de la phase liquide seule. Cette hypothèse sera discutée de manière plus approfondie dans le chapitre VI.

IV.3. Relation entre dissipation volumique et concentration en pristinamycines I et II

La pristinamycine produite par *S. pristinaespiralis* est classiquement composée d'environ 20 à 30 % de pristinamycine P_I et de 70 à 80 % de pristinamycine P_{II}. La Figure IV-2 illustre la relation entre la puissance dissipée volumique et la concentration maximale respective des pristinamycines I et II. Cette figure permet de compléter les résultats de la figure 8 de l'article révélant la corrélation entre la quantité d'antibiotique totale et la puissance dissipée.

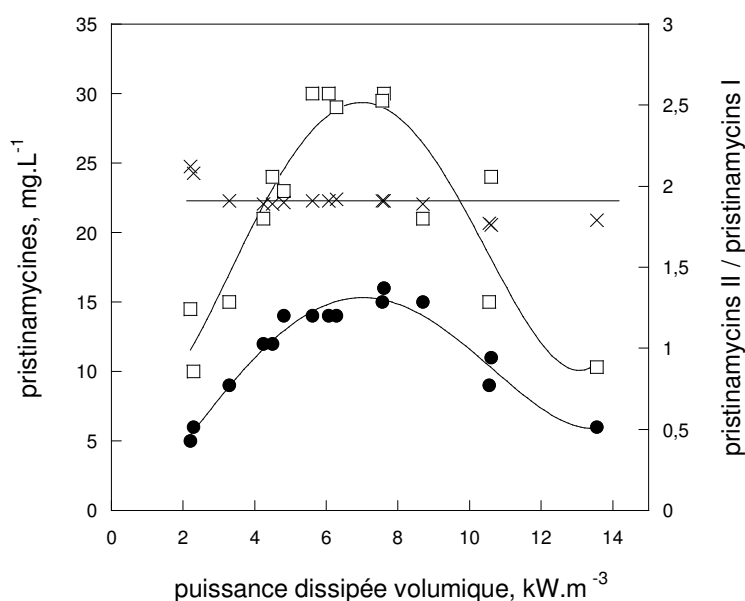


Figure IV-2 Influence de la puissance dissipée volumique sur la concentration maximale de pristinamycine I (●), pristinamycine II (□) et sur le rapport pristinamycine II / pristinamycine I (×).

A l'aide des résultats de la Figure IV-2, on pourra noter que :

- Les fractions respectives de pristinamycines I et II sont, comme attendu, d'à peu près 30 et 70 %, mais également que ce ratio ne dépend pas des conditions hydrodynamiques de culture. Ainsi, les propriétés bactéricides issues du mélange des deux molécules ne devraient pas être altérées par la hausse de la dissipation.

Pour les deux familles de pristinamycines, l'évolution de la concentration avec la puissance dissipée volumique est qualitativement la même que pour le produit total : augmentation jusque des valeurs de 6 kW.m^{-3} puis diminution pour des dissipations supérieures à 8 kW.m^{-3} . Entre ces deux valeurs, un plateau de concentration maximale est obtenu.

IV.4. Relation entre le k_La et la concentration maximale des pristinamycines

Les résultats de la Figure IV-3 fournissent la corrélation entre les concentrations en pristinamycines mesurées et le coefficient volumique de transfert d'oxygène estimé.

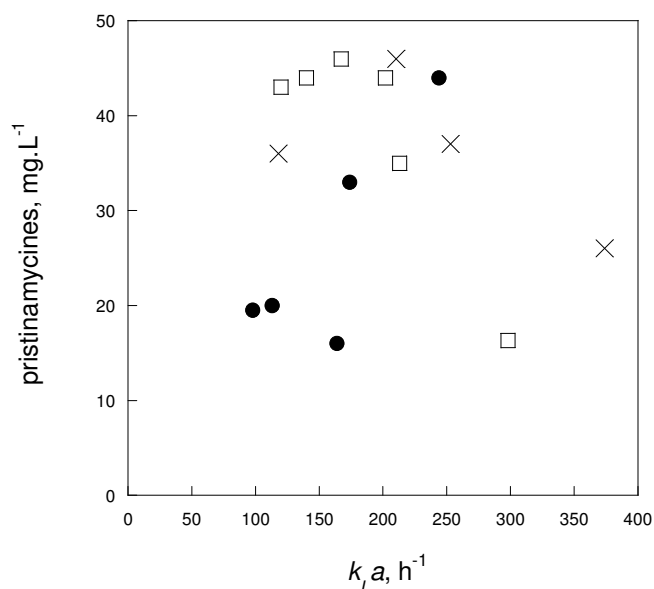


Figure IV-3 Influence du k_La sur la concentration maximale des pristinamycines en fioles de 250 (●), 500 (×) et 1000 mL (□).

Il apparaît clair que les concentrations en antibiotique se corrèlent très mal au k_{La} pour les conditions de culture testées. L'absence de corrélation apparait non seulement lors du passage d'une fiole à l'autre mais également pour un type de fiole donnée. Ainsi, ces résultats semblent indiquer que la quantité de produit obtenue est corrélée à l'agitation du milieu de culture indépendamment du transfert d'oxygène rencontré. Cette hypothèse sera là-encore discutée dans le chapitre VI.

IV.5. Influence de la dissipation et du transfert d'oxygène sur les vitesses spécifiques de croissance et de production des pristinamycines

Afin de compléter les résultats obtenus dans le chapitre III en fioles de 250 mL, les vitesses spécifiques maximales de croissance ont été calculées pour chacune des conditions hydrodynamiques étudiées.

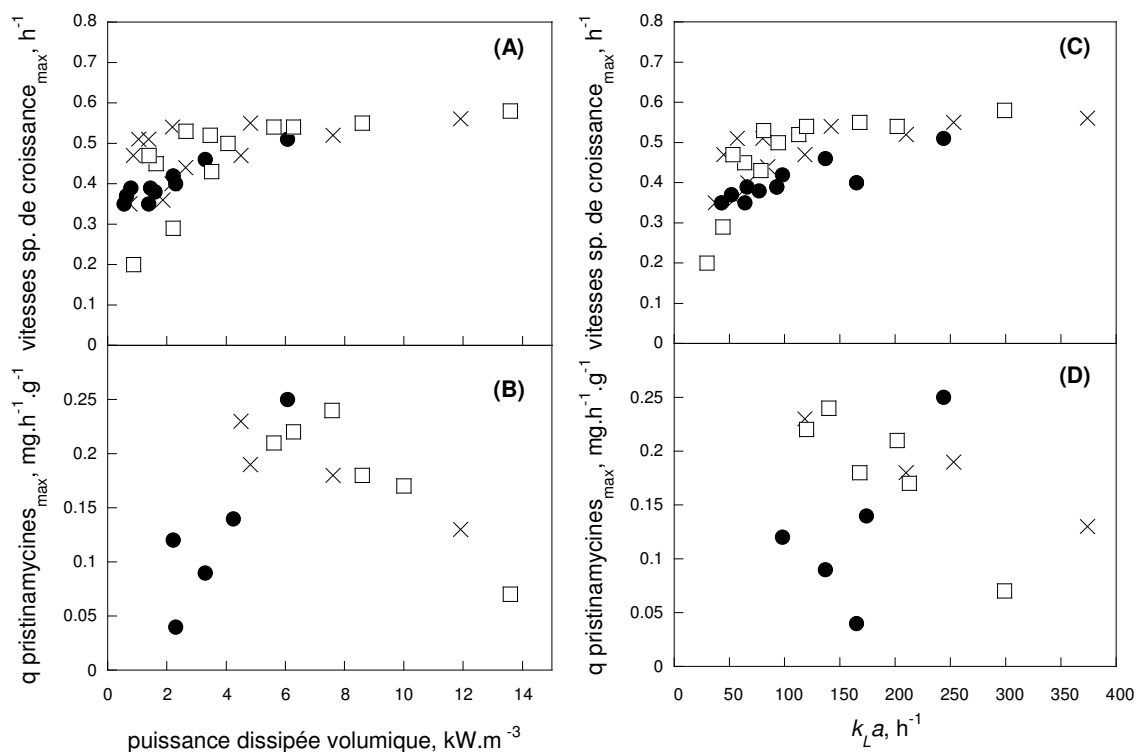


Figure IV-4 Influence de la dissipation volumique sur les vitesses spécifiques maximales de croissance (A) et de production de pristinamycines (B). Influence du k_{La} sur les vitesses spécifiques maximales de croissance (C) et de production de pristinamycines (D) en fioles de 250 (●), 500 (×) et 1000 mL (□).

Ainsi, la vitesse spécifique maximale de croissance μ_{max} augmente sensiblement de 0,35 à 0,55 h⁻¹ avec la dissipation volumique et ce, jusqu'à des valeurs de $P/V = 6 \text{ kW.m}^{-3}$ (Figure IV-4A). Pour des dissipations volumiques supérieures, la vitesse spécifique maximale de croissance reste sensiblement constante. De même, la corrélation entre μ_{max} et le k_La semble satisfaisante (Figure IV-4C). Ainsi, pour les trois systèmes de culture étudiés, μ_{max} augmente jusqu'à $k_La = 100 \text{ h}^{-1}$ puis reste constante au-delà. La vitesse spécifique de la production des pristinamycines (q_p) est bien corrélée à l'agitation et semble indépendante du transfert d'oxygène rencontré (Figure IV-4B et Figure IV-4D).

IV.6. Influence de la dissipation et du transfert d'oxygène sur les vitesses spécifiques de consommation des substrats

Les vitesses spécifiques maximales de consommation de glutamate, d'arginine et de glucose ont été calculées pour chacune des conditions hydrodynamiques étudiées et reportées sur la Figure IV-5 en fonction de la dissipation volumique et du k_La . Nos résultats confirment pour l'essentiel les résultats obtenus au chapitre III en fioles de 250 mL. Ainsi, la vitesse spécifique maximale de consommation du glutamate augmente avec la dissipation volumique en fioles de 250 et 500 mL. Pour les fioles de 1000 mL, certaines conditions opératoires ne respectent pas cette tendance (Figure IV-5A). La vitesse spécifique maximale de consommation d'arginine reste constante entre 0,02 et 0,03 g.h⁻¹.g⁻¹ pour toute la gamme de dissipation (Figure IV-5B). La vitesse spécifique maximale de consommation du glucose reste de l'ordre de 0,15 à 0,25 g.h⁻¹.g⁻¹ pour toute la gamme de P/V . Quelques exceptions sont néanmoins à mentionner pour les fioles de 500 et 1000 mL, aux faibles valeurs de P/V . Dans ces conditions, des valeurs plus fortes de vitesse spécifique maximale de consommation de glucose sont en effet mesurées (Figure IV-5C).

La vitesse spécifique de consommation du glutamate augmente avec k_La jusque 150 h⁻¹ et la dissipation volumique jusque 4 kW.m⁻³ (Figure IV-5A et D). Dans le même temps, la vitesse spécifique de consommation d'arginine reste comprise entre 0,02 et 0,03 g.h⁻¹.g⁻¹ (Figure IV-5E) et que la vitesse spécifique de consommation du glucose reste également stable hormis certaines données recueillies en fioles de 500 et 1000 mL à de faibles valeurs de k_La (Figure IV-5F).

Exceptée la vitesse spécifique maximale de consommation de glutamate qui semble être reliée aux variations de P/V et du k_{La} , aucune tendance particulière ne semble se dessiner pour les vitesses spécifiques maximales de consommation d'arginine et de glucose.

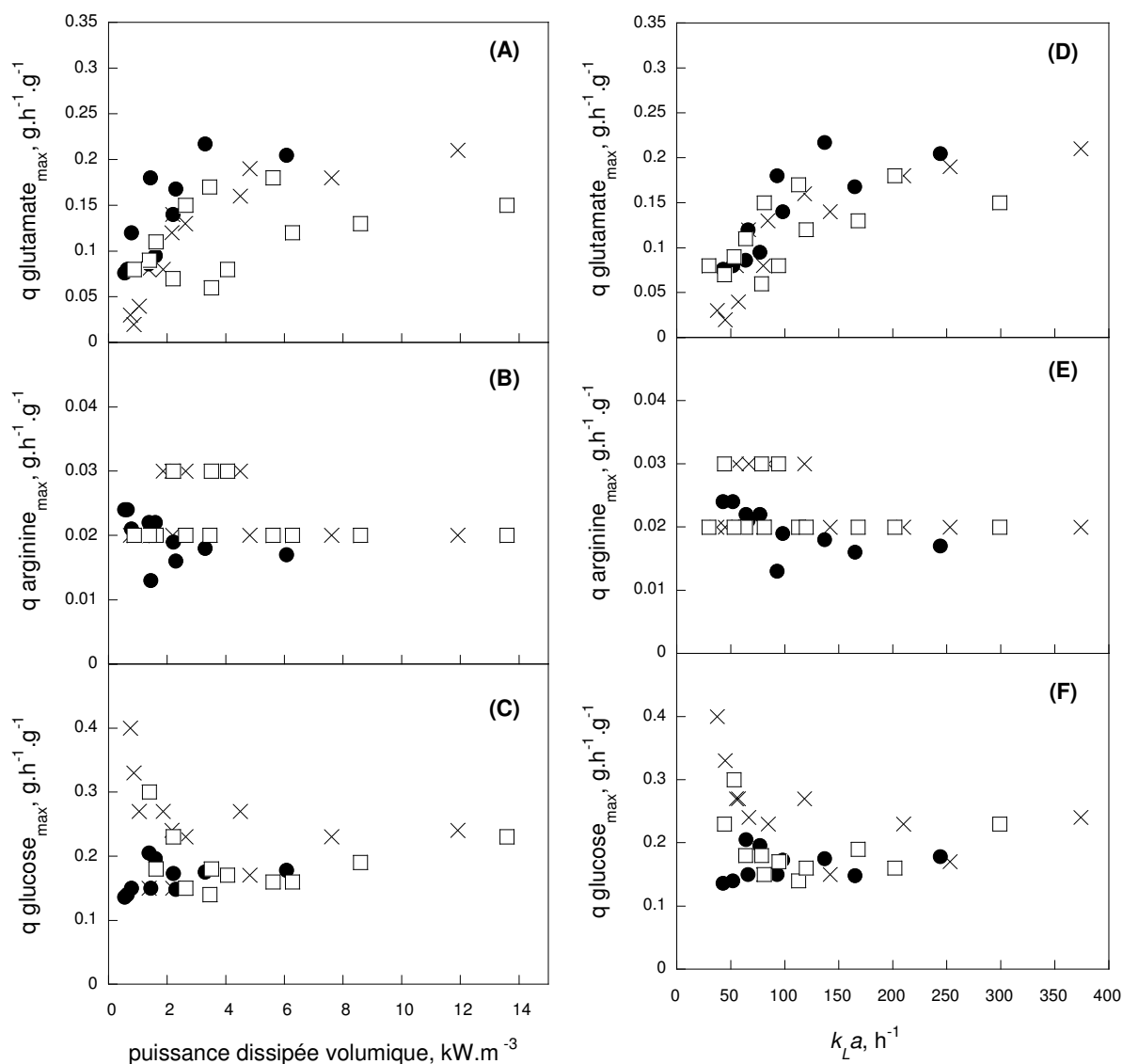


Figure IV-5. Influence de la dissipation volumique sur les vitesses spécifiques maximales de consommation du glutamate (A), de l'arginine (B), du glucose (C). Influence du k_{La} sur les vitesses spécifiques maximales de consommation du glutamate (D), de l'arginine (E) et du glucose (F) en fioles de 250 (●), 500 (×) et 1000 mL (□).

IV.7. Conclusion

La relation entre la dissipation volumique et le coefficient volumique de transfert d'oxygène d'une part et sur la concentration de la biomasse, la consommation des substrats et l'induction de la production des pristinamycines d'autre part, a été étudiée dans des fioles de 250, 500 et 1000 mL. La gamme de dissipation volumique a varié entre 0,55 et 13,6 kW.m⁻³ et le coefficient volumique de transfert d'oxygène a varié entre 29 et 374 h⁻¹. Comme indiqué dans le chapitre III, ces gammes de valeurs sont similaires à celles mesurées, en moyenne, dans des cuves agitées mécaniquement. Pour les fioles lisses considérées, il peut être conclu que :

- La quantité maximale de biomasse, la vitesse spécifique maximale de croissance sont bien corrélées avec le coefficient volumique de transfert d'oxygène.
- La concentration et le rendement de production des pristinamycines produites sont corrélés avec la dissipation volumique.
- Le déclenchement de la production est prédit par utilisation d'un diagramme à deux paramètres $k_La = f(P/V)$. Néanmoins, l'obtention d'un k_La supérieur à 110 ± 10 h⁻¹ pourrait être, en première approximation, une condition nécessaire et suffisante à ce déclenchement.

A l'issue des chapitres III et IV, de premières explications et hypothèses peuvent être avancées quant aux mécanismes sous-jacents aux phénomènes observés.

Déclenchement de la production des pristinamycines

Globalement, il semble que le déclenchement de la production soit conditionné à la présence conjointe d'un ensemble d'éléments. Ainsi, la production ne sera déclenchée que si une limitation en substrat azoté et une absence de limitation en oxygène sont simultanément obtenues. La première de ces conditions (limitation en substrat azoté) est reliée à la consommation globale de substrat et donc au produit de la consommation spécifique et de la quantité totale de biomasse. Par ailleurs, il apparaît que, le glutamate étant limitant dès les premières heures de la fermentation, c'est la limitation en arginine qui est potentiellement responsable du déclenchement de la production. Or, la consommation spécifique de cette molécule est indépendante de la dissipation volumique et du k_La . Ainsi, seule l'augmentation de la quantité totale de biomasse, qui est par ailleurs bien corrélée au coefficient volumique de transfert d'oxygène, est donc responsable de la limitation en arginine.

Concentration en pristinamycines

La concentration et les rendements de production de pristinamycines sont très bien corrélés à la dissipation volumique, indépendamment du coefficient volumique de transfert d'oxygène. Les conditions productrices étant des conditions non-limitées par le transfert d'oxygène à la surface libre, l'effet de la puissance dissipée peut être attribué à une intensification du flux de transfert d'oxygène à la surface ou au sein de la pelote. Ainsi, il semblerait que l'effet de la puissance dissipée volumique soit plutôt d'ordre mécanique sur les pelotes, par diminution de la taille moyenne de celles-ci. Le besoin d'un apport suffisant en oxygène laisse également penser que les cellules productrices sont des cellules métaboliquement actives qui devraient se trouver en périphérie des pelotes. L'épaisseur de la couche de cellules productrices (et donc du ratio biomasse productrice / biomasse totale) pouvant être plus ou moins importante du fait d'une possible limitation diffusionnelle en substrats (oxygène compris). Dans ces conditions, la quantité d'antibiotiques produite serait alors potentiellement reliée à l'aire interfaciale de la pelote, donc à son diamètre et donc à la puissance dissipée volumique appliquée. Ainsi, l'augmentation de la production serait expliquée par la seule augmentation de la fraction de la quantité de cellules productrices sur la quantité de cellules totales, par diminution de la surface totale de pelotes disponible. Cette explication est également valable pour le rendement de production, celui-ci étant calculé sur la biomasse totale et non sur la biomasse viable ou en état de produire. Dans cette optique, la proportion de la quantité de pristinamycines P_I et P_{II} reste logiquement inchangée.

En conclusion, les résultats présentés dans ce chapitre apportent une meilleure maîtrise du procédé de production de la molécule d'intérêt en flacons agités. Il apparaît néanmoins intéressant d'extrapoler ces résultats, obtenus sur une souche industrielle, à une seconde souche de *S. pristinaespiralis*.

5^{ème} Chapitre

V. Les effets de la turbulence et de l'oxygénation peuvent-ils être extrapolés à une autre souche de *S. pristinaespiralis*?

*Comparaison des souches *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 et *S. pristinaespiralis* pr11 cultivées en fioles agitées*

V.1. Introduction

Dans les chapitres précédents, *S. pristinaespiralis* pr11 a été utilisée pour étudier l'influence de la puissance dissipée volumique sur divers paramètres tels que la biomasse, la consommation des substrats, les vitesses de transfert d'oxygène, les diamètres des pelotes, le déclenchement de la production ainsi que la concentration des pristinamycines. Avec *S. pristinaespiralis* pr11, il a été révélé que des valeurs seuils de P / V et de k_{La} étaient nécessaires pour l'induction de la production des pristinamycines. Un diagramme de production (k_{La} vs. P / V) a ainsi été proposé. Dans le même temps, une corrélation entre la puissance dissipée volumique et la concentration de pristinamycines a été observée. Par ailleurs, il a été montré qu'en plus d'une limitation en composés azotés et phosphorés, un apport suffisant en oxygène était nécessaire au déclenchement de la production. Dans ce chapitre, nous nous proposons de tester la validité de ces résultats sur une seconde souche, sauvage, *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, également productrice de pristinamycines.

V.2. Comportement rhéologique de suspensions de *S. pristinaespiralis* pr11 et DSMZ 40338

V.2.1. Mesures rhéologiques

En utilisant la même méthode expérimentale que celle utilisée dans le chapitre IV, le comportement rhéologique des suspensions des deux souches microbiennes a été comparé. La Figure V-1 illustre l'évolution du comportement rhéologique des deux souches étudiées pour des taux de cisaillement compris entre 0,01 et 500 s^{-1} . Globalement, le comportement rhéologique des deux suspensions présente les mêmes caractéristiques mais l'intensité des phénomènes observés est variable d'une souche à l'autre. Ainsi :

- Pour des concentrations faibles en biomasse, les suspensions présentent un comportement Newtonien avec une viscosité indépendante du taux de cisaillement appliqué. Cette viscosité Newtonienne est similaire à celle de l'eau. Dans les deux cas, la valeur seuil de concentration en biomasse au-delà de laquelle un comportement non-Newtonien est noté se situe aux alentours de 12 $g.L^{-1}$.

- Pour des concentrations en biomasse supérieures à 12 g.L⁻¹, si le comportement non-Newtonien est globalement relevé, un plateau Newtonien est identifié pour les deux suspensions de souche. Néanmoins, tandis que ce plateau Newtonien est observé au-delà d'un taux de cisaillement de 10 s⁻¹ dans le cas de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, celui-ci n'apparaît que pour des cisaillements supérieurs à 100 s⁻¹ dans le cas de la souche pr11.

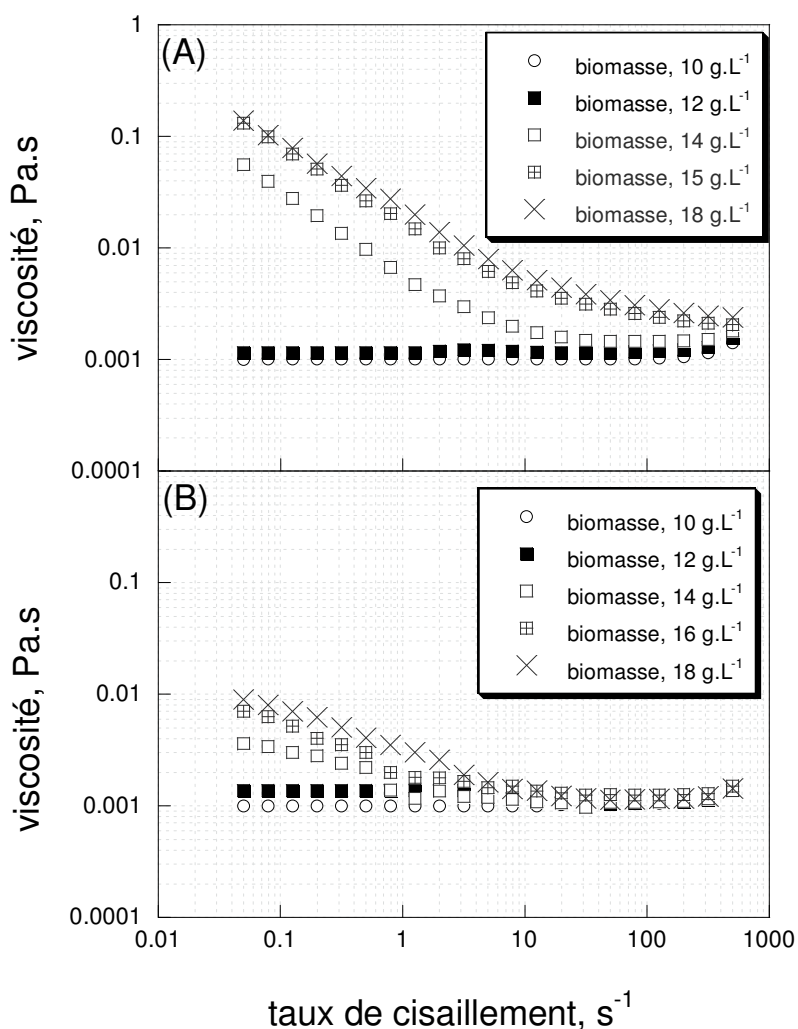


Figure V-1 Comparaison de la rhéologie de suspensions de *S. pristinaespiralis* pr11 (A) et DSMZ 40338 (B) pour différentes concentrations en biomasse.

Dans le cas de *S. pristinaespiralis* pr11, la viscosité à cisaillement infini μ_{∞} semble plus grande (environ 0,003 Pa.s) que pour la souche DSMZ 40338 (0,001 Pa.s). Dans les deux cas,

cette valeur reste du même ordre de grandeur que la viscosité de l'eau. Des viscosités équivalentes ont été calculées précédemment dans le cas de *S. pristinaespiralis* pr11 par CFD (chapitre IV).

Comme il a été indiqué dans le chapitre IV, les taux de cisaillement moyens escomptés expérimentalement dans les fioles agitées utilisées et pour les conditions opératoires choisies sont de l'ordre de quelques centaines de s^{-1} . Ainsi, pour les deux souches, l'hypothèse de faible viscosité et de comportement globalement Newtonien semble *a priori* justifiée.

V.2.2. Vérification de l'hypothèse de viscosité faible

En flacon agité, le nombre de puissance modifié dépend du nombre de Reynolds, même en régime turbulent (*cf.* relation III-1). Ainsi, une modification significative de la viscosité apparente ou du comportement rhéologique de la suspension a une influence sur la puissance dissipée. Or, la puissance dissipée volumique mesurée expérimentalement au cours de la fermentation avec *S. pristinaespiralis* DSMZ40338 reste inchangée, même pour des concentrations en biomasse supérieures à 12 g.L^{-1} (Figure V-1). Ceci confirme que la viscosité des suspensions ne varie pas sensiblement pendant la culture et qu'elle peut donc être assimilée à un liquide Newtonien de viscosité similaire à celle de l'eau.

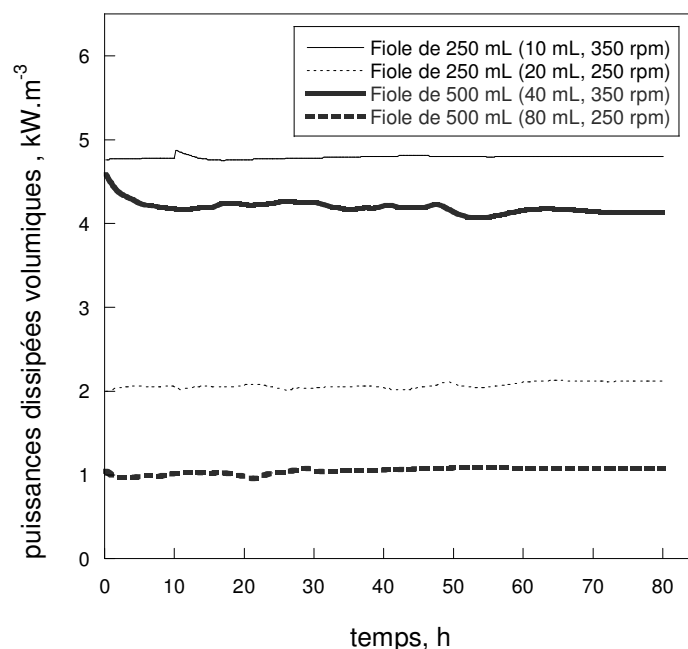


Figure V-2. Mesure expérimentale de la dissipation volumique en cours de culture avec *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 pour quatre conditions opératoires d'agitation).

V.3. Réponse physiologique globale : comparaison de *S. pristinaespiralis* pr11 et de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338

V.3.1. Biomasse, consommation des substrats et production de pristinamycines

La Table V-1. reporte les valeurs calculées de dissipation volumique et de k_{La} avec les deux souches de *S. pristinaespiralis*. Avec des conditions opératoires identiques, les valeurs de la puissance dissipée volumique ont été plus élevées pour la souche pr11 que pour la souche DSMZ 40338, du fait d'une viscosité légèrement plus élevée pour la première. Les valeurs de k_{La} ont été considérées comme identiques pour les deux souches car les viscosités, restant entre 1 et 3 mPa.s, n'ont aucun effet significatif sur les valeurs de k_{La} (Badino et al., 2001).

Chapitre V. Extrapolation à une seconde souche de *S. pristinaespiralis*

Table V-1. Comparaison des valeurs de dissipation volumique et de k_{La} pour *S. pristinaespiralis* pr11 et DSMZ 40338.

<i>S. pristinaespiralis</i> pr11 (diamètre de la table d'agitation 2,5 cm)														
Fioles de 250 mL					Fioles de 500 mL					Fioles de 1000 mL				
volume de remplissage	$P/V, kW.m^{-3}$		k_{La}, h^{-1}		volume de remplissage	$P/V, kW.m^{-3}$		k_{La}, h^{-1}		volume de remplissage	$P/V, kW.m^{-3}$		k_{La}, h^{-1}	
mL	250rpm	350rpm	250rpm	350rpm	mL	250rpm	350rpm	250rpm	350rpm	mL	250rpm	350rpm	250rpm	350rpm
10	2,29	6,07	165	243	10	4,82	10,55	253	374	20	5,62	13,56	202	299
15	1,74	4,24	117	174	20	2,19	7,61	142	210	30	4,29	10	144	213
20	1,44	3,29	77	113	40	1,38	4,50	80	118	40	3,46	8,70	113	168
30	0,78	2,21	66	98	60	1,05	2,63	57	85	50	3,05	7,57	3,05	140
40	0,64	1,60	52	77	80	0,87	2,17	45	67	60	2,64	6,28	81	120
50	0,55	1,38	43	64	100	0,75	1,87	37	55	80	1,63	4,08	64	94,5
										100	1,40	3,51	53	78,5
										200	0,88	2,21	30	44,2

<i>S. pristinaespiralis</i> DSMZ 40338 (diamètre de la table d'agitation 2,5 cm)														
Fioles de 250 mL					Fioles de 500 mL					Fioles de 1000 mL				
volume de remplissage	$P/V, kW.m^{-3}$		k_{La}, h^{-1}		volume de remplissage	$P/V, kW.m^{-3}$		k_{La}, h^{-1}		volume de remplissage	$P/V, kW.m^{-3}$		k_{La}, h^{-1}	
mL	250rpm	350rpm	250rpm	350rpm	mL	250rpm	350rpm	250rpm	350rpm	mL	250rpm	350rpm	250rpm	350rpm
10	1,62	4,02	165	244	10	3,47	8,67	253	374	20	4,1	10,3	202	299
20	1,02	2,5	93	137	20	2,19	5,46	142	210	40	2,58	6,47	113	168
25	0,88	2,18	77	113	40	1,38	3,44	80	118	60	1,97	4,94	81	120
30	0,77	1,93	66	98	60	1,05	2,63	57	85	80	1,63	4,08	64	94,5
40	0,642	1,6	52	77	80	0,868	2,17	45	67	100	1,4	3,51	53	78,5
50	0,55	1,38	43	64	100	0,748	2	37	55	200	0,89	2,21	30	44,2

La Figure V-3 compare les cinétiques de croissance et de production de pristinamycines pour les deux souches de *S. pristinaespiralis* à différentes puissances dissipées volumiques et k_{La} . La souche pr11 se développe plus rapidement que la souche DSMZ 40338 (30 h de croissance contre 50 h). Par contre, à dissipation volumique équivalente, les concentrations maximales en biomasse obtenues sont similaires. Ainsi, pour une puissance dissipée volumique de $1,6 \text{ kW.m}^{-3}$ et un k_{La} de 77 h^{-1} , la concentration maximale de biomasse pour la souche pr11 est de 14 g.L^{-1} tandis qu'elle est de $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ pour la souche DSMZ 40338. La production d'antibiotiques est mesurées à partir des valeurs de P / V et de k_{La} égaux à $2,2 \text{ kW.m}^{-3}$ et 98 h^{-1} pour la souche pr11 et à $1,93 \text{ kW.m}^{-3}$ et 98 h^{-1} pour la souche DSMZ 40338 soit pour des conditions très similaires.

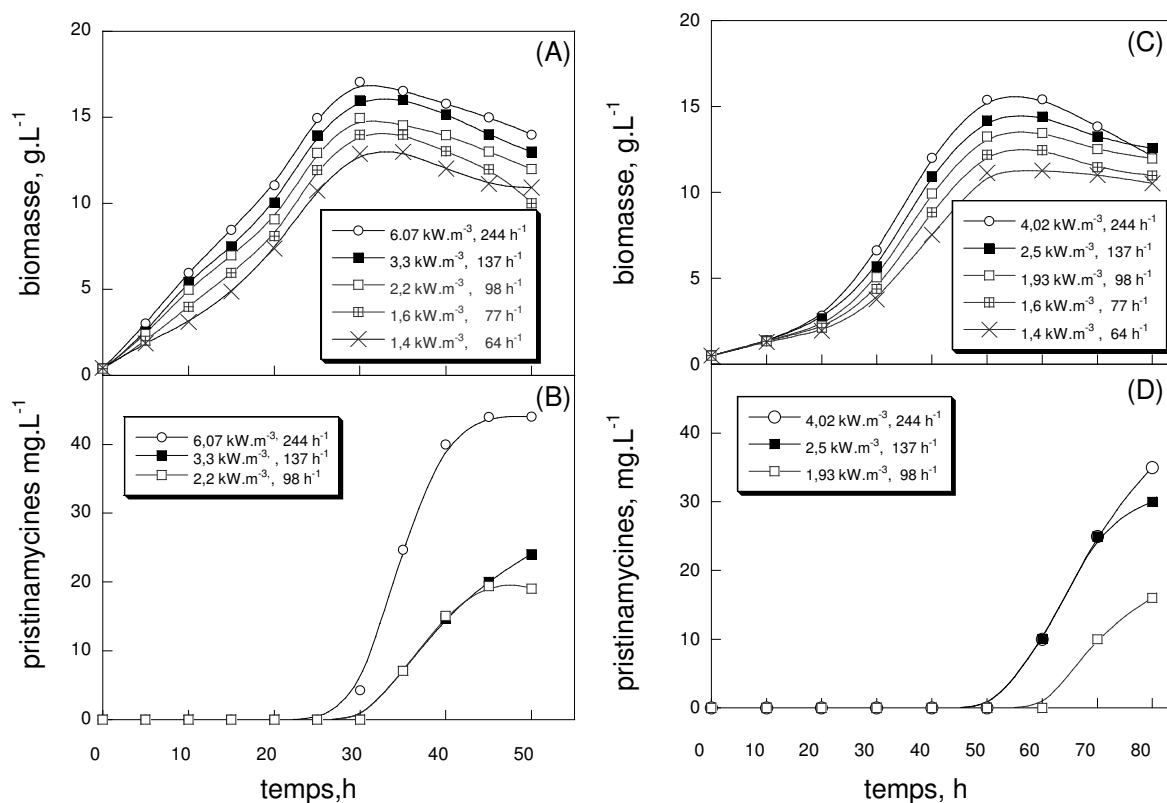


Figure V-3. Cinétiques de croissance et de production de pristinamycines : comparaison entre *S. pristinaespiralis* pr11 (A et B) et DSMZ 40338 (C et D) pour quelques conditions opératoires.

A l'instar des durées de phase de croissance, l'induction de la production de pristinamycines a été plus rapide pour la souche pr11 (entre 25 et 35 h de fermentation) que pour la souche sauvage (entre 50 et 60 h de fermentation) (Figure V-3B&D). Les

concentrations de pristinamycines sont légèrement plus élevées pour *S. pristinaespiralis* pr11 pour les conditions opératoires testées. Rappelons que *S. pristinaespiralis* pr11 est une souche industrielle "hyper-productrice" tandis que *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 est une souche sauvage. Il semblerait donc que, dans les conditions de culture utilisées ici, l'avantage de la souche pr11 soit davantage à relier à la précocité et à la durée de la phase de synthèse, qui est deux fois plus courte, qu'à la concentration produite. Néanmoins, dans le même milieu de culture mais en réacteur mécaniquement agité, des concentrations supérieures à 100 mg.L⁻¹ ont été précédemment obtenues avec la souche pr11 (Corvini, 2000).

Au niveau de la consommation des substrats, *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 consomme en début de culture du glutamate comme source de carbone et d'azote (Figure V-4). Le glutamate est complètement métabolisé entre 30 et 40 h de temps de culture. L'arginine reste inutilisée jusqu'à 10 et 20 h de culture puis s'épuise entre 60 et 70 h. L'ammonium commence à être métabolisé après 10 à 20 h selon les conditions opératoires et l'est complètement entre 60 et 70 h de culture. Tout comme pour la souche pr11, une limitation en azote, seule, n'est donc pas suffisante pour expliquer l'induction de la production des pristinamycines. A 1,4 kW.m⁻³ par exemple, toutes les sources en azote sont épuisées après 70 h de culture pourtant aucune excrétion de pristinamycines n'est détectée.

Pour *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, le glucose commence à être utilisé seulement après 30 h de fermentation (Figure V-4C). Une concentration résiduelle en glucose est encore présente dans le milieu de culture en fin de culture. En règle générale, les fortes puissances dissipées volumiques favorisent une consommation plus précoce du glucose comme pour la souche pr11. L'acide malonique reste inutilisé jusqu'à 40 h de culture et se maintient entre 6 et 7,5 g.L⁻¹ pour toutes les conditions opératoires (données non montrées).

En début de culture, la concentration de phosphate est de 4 mM (Figure V-4E). Les fortes puissances dissipées volumiques favorisent une consommation plus précoce du phosphate. Comme pour le glucose, une concentration résiduelle de phosphate demeure en fin de culture. Ainsi, aucune relation entre une consommation complète du phosphate et l'induction de pristinamycines ne peut être établie pour la souche DSMZ 40338.

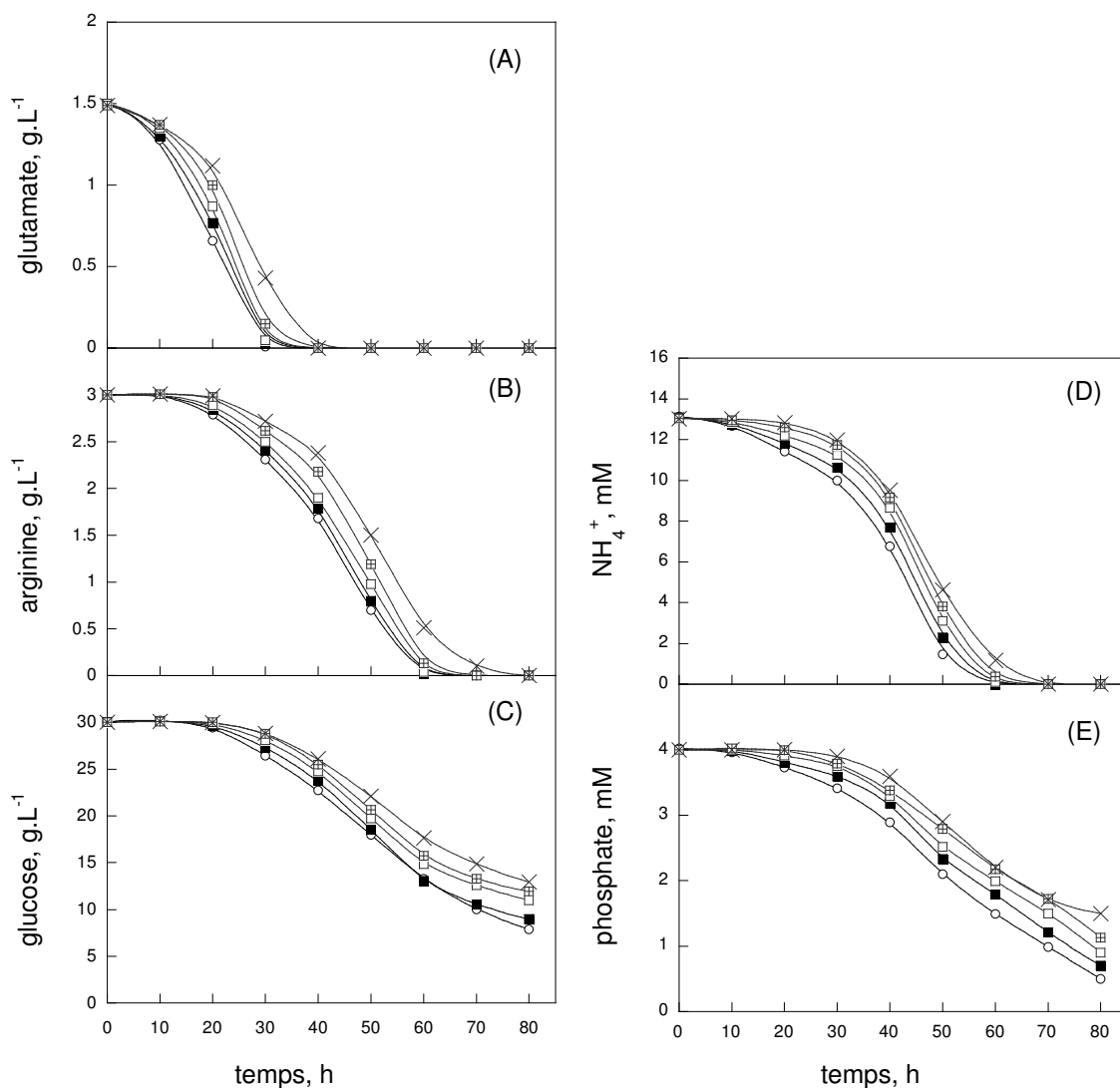


Figure V-4. Cinétiques de consommation du glutamate (A), de l'arginine (B), du glucose (C), de l'ammonium (D) et du phosphate (E) lors de cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. Les valeurs de P / V (kW.m⁻³) et k_{LA} (h⁻¹) sont : (4,02; 244, ○), (2,5; 137, ■), (1,93; 98, □), (1,6; 77, ⊕), (1,4; 64, ×).

V.3.2. Relation entre le k_{LA} et la concentration de biomasse

Il a été montré dans le chapitre IV que pour *S. pristinaespiralis* pr11, la concentration maximale en biomasse se corrélait bien au coefficient volumique de transfert d'oxygène. Cette corrélation est comparée ici à celle obtenue avec la seconde souche (Figure V-5). Deux phases ont été constatées :

- Pour des k_{La} inférieurs à 110 h^{-1} , une augmentation rapide de la concentration maximale en biomasse avec le k_{La} est notée pour les deux souches. Celle-ci est d'ailleurs quasi identique pour les deux souches.
- Pour des k_{La} supérieurs à 110 h^{-1} , lorsque la concentration en biomasse atteint 13 à 15 g.L^{-1} , l'augmentation du k_{La} n'a pas d'effet significatif sur la concentration maximale en biomasse. Il a été montré précédemment que pour la souche pr11, ceci correspondait à une levée de la limitation du transfert surfacique gaz-liquide. Un comportement similaire semble donc observé avec la souche DSMZ 40338. Ce point sera discuté plus loin dans le paragraphe V.4.

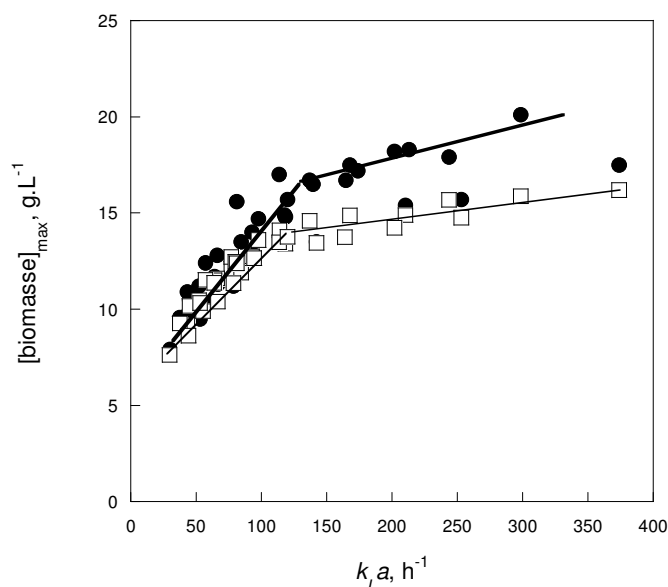


Figure V-5. Relation entre k_{La} et concentration maximale en biomasse pour *S. pristinaespiralis* pr11 (●) et DSMZ 40338 (□).

V.3.3. Vitesses spécifiques maximales

V.3.3.1. Vitesse spécifique maximale de croissance

Les vitesses spécifiques maximales de croissance (μ_{max}) mesurées avec la souche pr11 sont nettement plus élevées (entre $0,2$ et $0,6 \text{ h}^{-1}$) que celles de la souche sauvage qui se situent

à des niveaux de l'ordre de 0,1 à 0,2 h⁻¹ (Figure V-6). L'augmentation sensible du taux de croissance maximal de la souche pr11 avec P / V correspond aux conditions opératoires avec limitation du transfert gaz-liquide (et $k_L a < 150$ h⁻¹ pour des valeurs de P / V comprises entre 0,5 et 5 kW.m⁻³). Une fois cette limitation levée, le taux de croissance augmente sensiblement moins avec le $k_L a$. Ce dernier comportement semble également observé avec *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338.

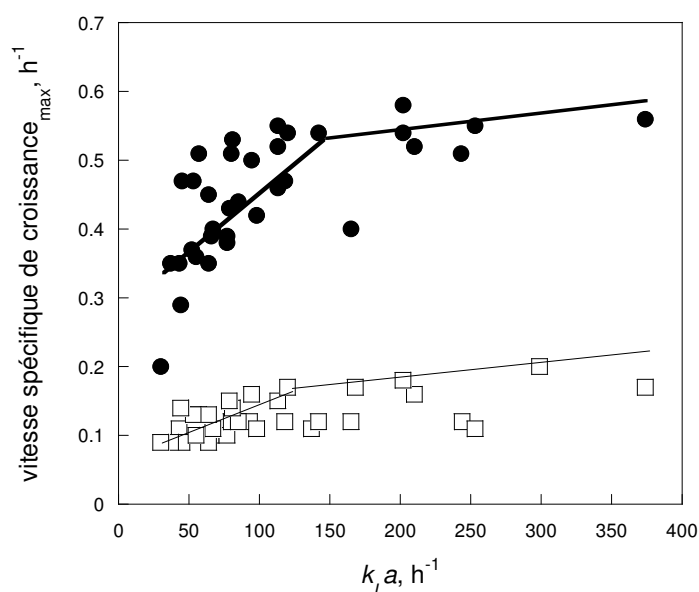


Figure V-6. Influence du $k_L a$ sur la vitesse spécifique maximale de croissance de *S. pristinaespiralis* pr11 (●) et DSMZ 40338 (□).

V.3.3.2. Vitesse spécifique maximale de consommation des substrats

Pour *S. pristinaespiralis* pr11, la puissance dissipée volumique n'a pas d'effet significatif sur les vitesses spécifiques de consommation de l'acide malonique (non montré) et de l'arginine. La vitesse spécifique de consommation du glutamate augmente quant à elle de 0,05 à 0,23 g.h⁻¹.g⁻¹ avec la puissance dissipée volumique. Contrairement à la souche pr11, la dissipation volumique n'a que peu d'effet sur la vitesse spécifique maximale de consommation de glutamate et de glucose chez la souche DSMZ 40338 (Figure V-7). De même, aucun effet n'a été visualisé sur les vitesses spécifiques de consommation de l'arginine et de l'acide malonique (non montré). De plus, les vitesses spécifiques maximales de

consommation de glucose et de glutamate sont globalement plus élevées chez *S. pristinaespiralis* pr11 que chez *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. Ceci peut être une des raisons pour laquelle la souche pr11 présente une croissance plus rapide que la souche DSMZ 40338.

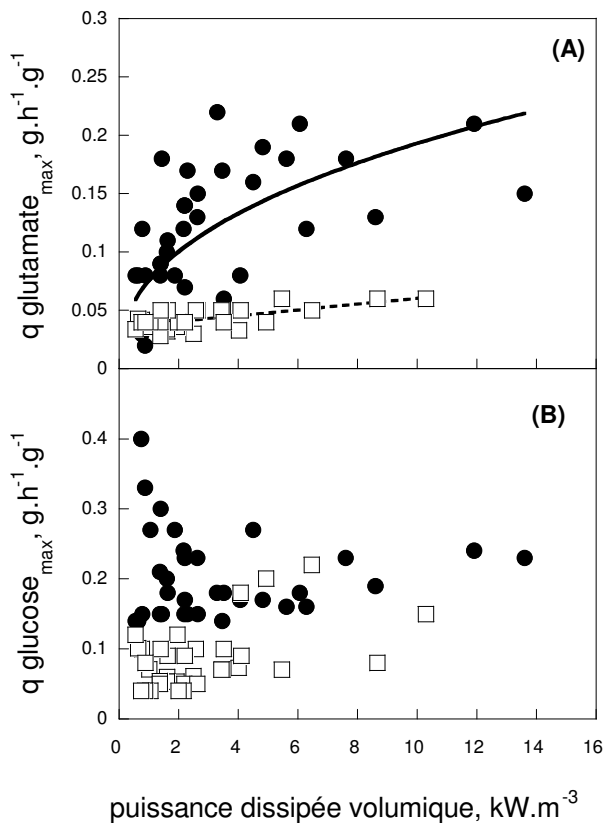


Figure V-7. Influence de la puissance dissipée volumique sur les vitesses spécifiques maximale de consommation du glutamate (A) et de glucose (B) pour *S. pristinaespiralis* pr11 (●) et DSMZ 40338 (□).

V.3.4. Production des pristinamycines

V.3.4.1. Aspect qualitatif : diagramme de production (k_La vs P/V)

Les diagrammes de production pour les deux souches sont donnés sur la Figure V-8. Pour les deux souches, ce type diagramme permet de mettre en évidence deux comportements pour la production des pristinamycines:

- Une zone de faible puissance dissipée volumique et de k_{La} , se traduisant par l'absence de production de pristinamycines ;
- une zone avec des valeurs plus élevées de dissipation (P/V supérieur à 4 kW.m^{-3} et k_{La} supérieur à 100 h^{-1}), favorable à la production de pristinamycines.

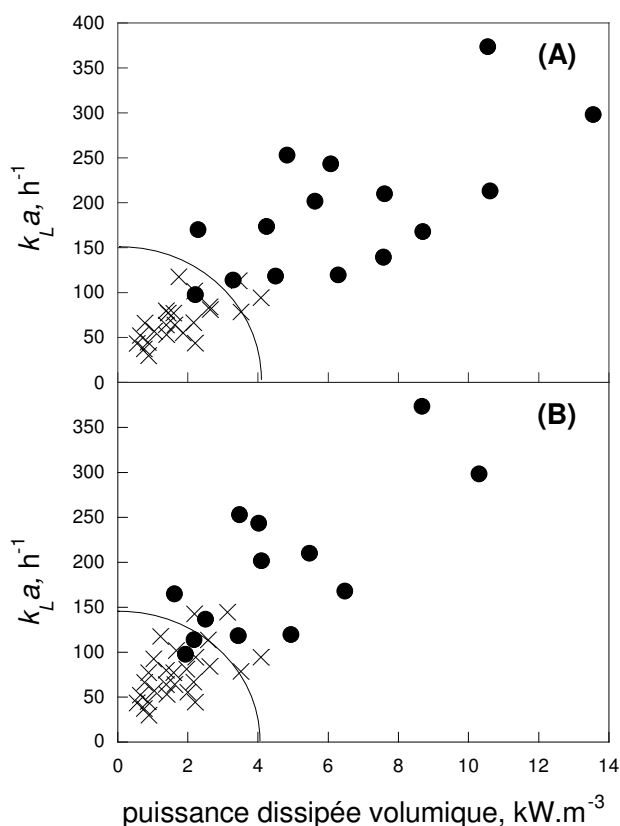


Figure V-8. Diagramme de production de pristinamycines (P/V vs k_{La}) pour *S. pristinaespiralis* pr11 (A) et DSMZ 40338 (B) : production des pristinamycines (●) et non production des pristinamycines (×).

Malgré les différences de cinétiques de croissance et de consommation des substrats observées précédemment, on notera la surprenante similarité du diagramme de production pour ces deux souches. Ceci indique que les phénomènes physiologiques régissant l'induction de la production des pristinamycines et leur interconnexion avec l'hydrodynamique pourraient être similaires chez ces deux souches.

V.3.4.2. Aspect quantitatif : impact de la dissipation sur la concentration de pristinamycines et le rendement (pristinamycines/biomasse)

Des comportements similaires sont observés pour les deux souches en ce qui concerne la concentration de pristinamycines produites et le rendement de cette production.

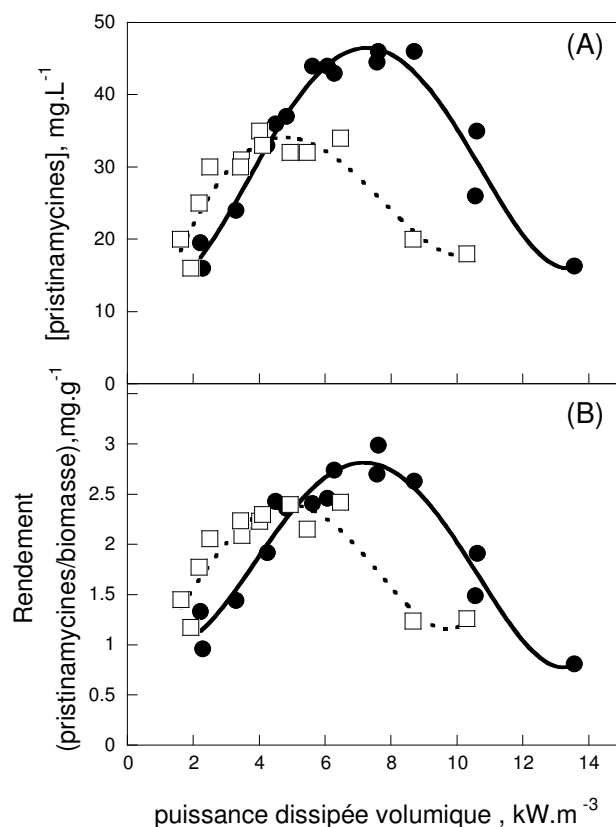


Figure V-9. Influence de la dissipation volumique sur la concentration en pristinamycines produites (A) et le rendement (pristinamycines / biomasse) (B) pour *S. pristinaespiralis* pr11 (●) et DSMZ 40338 (□).

Ainsi, trois zones sont identifiées (Figure V-9) :

- Une augmentation linéaire de la concentration de pristinamycines et du rendement (pristinamycines / biomasse) avec la dissipation volumique jusque 4 kW.m⁻³ pour la souche DSMZ 40338 et jusque 6 kW.m⁻³ pour la souche pr11 ;

- un plateau où la concentration de pristinamycines et le rendement restent constants et maximaux ;
- une baisse linéaire de la concentration de pristinamycines et du rendement (pristinamycines / biomasse).

Néanmoins, il semblerait que la dissipation volumique ne soit pas pas un critère généralisable d'une souche à l'autre pour l'obtention d'une concentration maximale de pristinamycines. De plus, la concentration des pristinamycines et le rendement (pristinamycines / biomasse) sont plus élevés pour *S. pristinaespiralis* pr11 que pour *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 au delà d'environ 5 kW.m⁻³.

V.3.4.3. Vitesse spécifique maximale de production de pristinamycines

Pour les deux souches, et comme précédemment pour la concentration en antibiotiques et le rendement (pristinamycines / biomasse), une augmentation de P / V entraîne une augmentation, une stabilisation et enfin une diminution de la vitesse spécifique maximale de production de pristinamycines qui est plus élevée pour la souche pr11 (0,05 à 0,21 mg.g⁻¹.h⁻¹) que pour la souche DSMZ 40338 (0,07 à 0,15 mg.g⁻¹.h⁻¹) (Figure V-10).

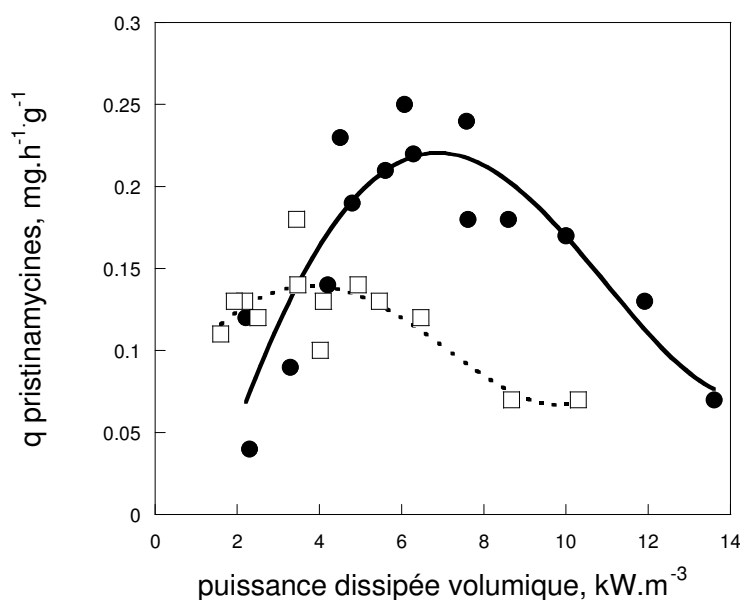


Figure V-10. Influence de la puissance dissipée volumique sur la vitesse spécifique maximale de production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* pr11 (●) et DSMZ 40338 (□).

V.4. Comparaison de l'activité respiratoire de *S. pristinaespiralis* pr11 et DSMZ 40338

L'activité respiratoire peut être caractérisée soit par la détermination de la consommation globale d'oxygène (*OUR*) soit par le suivi de la concentration en oxygène dissous qui est une conséquence de la consommation en oxygène du microorganisme pour un transfert d'oxygène (k_La) donné. Ces deux approches sont abordées dans cette partie du travail.

V.4.1. Comparaison des OUR

Pour compléter les résultats précédents, des mesures de demande en oxygène ont été réalisées sur *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 à l'aide du RAMOS. Celles-ci pourront être comparées à celles déjà présentées pour *S. pristinaespiralis* pr11 (voir chapitre III). Les demandes globales en oxygène sont présentées sur la Figure V-11. Tandis que pour la souche *S. pristinaespiralis* pr11, une limitation du transfert gaz-liquide avait été observée (étêtement des pics d'OUR) lorsque la puissance dissipée volumique et donc le k_La étaient réduits, celle-ci n'apparaît pas pour la souche sauvage. Globalement, à dissipation volumique comparable, les consommations globales d'oxygène de la souche *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sont environ 30 % inférieures à celles de la souche pr11. Ainsi, pour *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, le taux de transfert maximal d'oxygène OTR_{max} reste toujours supérieur à l'OUR, même à faible dissipation volumique (chapitre III). Pour la souche pr11, les deux pics d'OUR observés ont été associés respectivement à la phase de croissance (consommation simultanée d'arginine et de glucose) et à la phase de production de l'antibiotique. Pour la souche DSMZ 40338, à 1,6 kW.m⁻³, seuls 2 pics sont visibles, le premier vers 25 h de culture et le second entre 50 et 60 h de culture. Pour les autres conditions de dissipation représentées sur la Figure V-10B, un troisième pic semble être mesuré vers 60 h de culture. Contrairement à *S. pristinaespiralis* pr11, la consommation des différents substrats (glutamate et le couple glucose-arginine) ainsi que la production des antibiotiques sont différées dans le temps avec la souche DSMZ 40338. Etant donnée la correspondance de temps avec les différentes phases de consommation et de production, ces différents pics d'OUR pourraient représenter la consommation d'oxygène liée respectivement à l'utilisation du (i) glutamate, (ii) de l'arginine et du glucose, et (iii) à la production des pristinamycines. Dans le cas de cette souche,

l'évolution de l'OUR permettrait donc de mettre en évidence une croissance diauxique (Anderlei et Büchs, 2001) mais également la consommation additionnelle observée lors de la synthèse de l'antibiotique.

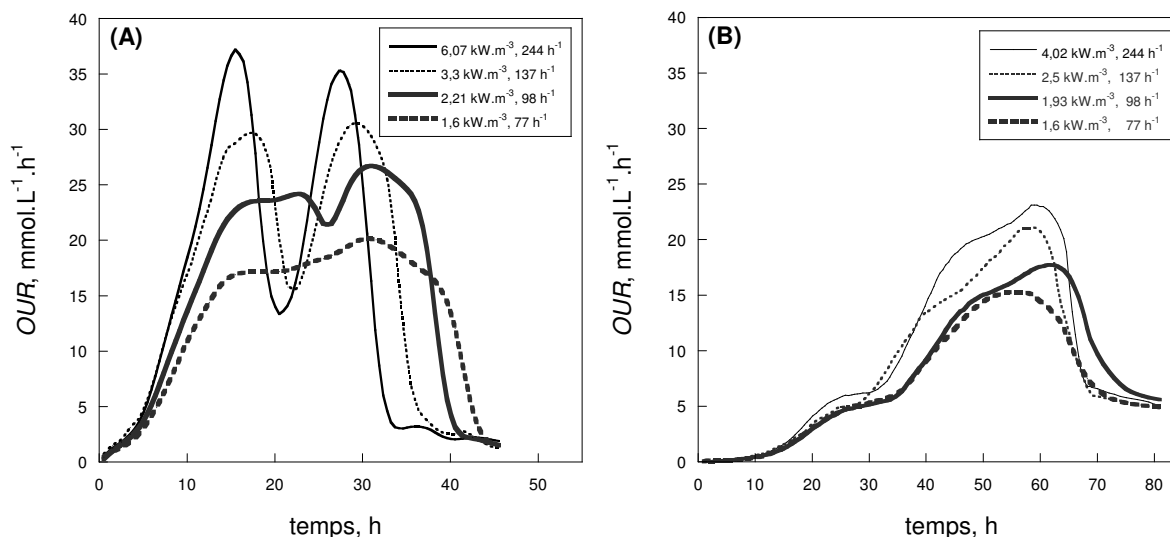


Figure V-11. Comparaison de l'OUR de *S. pristinaespiralis* pr11 (A) et DSMZ 40338 (B) pour quelques conditions opératoires représentatives.

V.4.2. Vitesses spécifiques de consommation d'oxygène

Globalement, les vitesses spécifiques de consommation d'oxygène sont sensiblement plus élevées pour la souche pr11 que pour la souche DSMZ 40338 (Figure V-12). Ainsi, les différences observées précédemment entre ces deux souches sur les OUR ne sont pas dues qu'à la plus forte concentration de biomasse mesurée pour la souche pr11. Dans les deux cas, on constate une augmentation significative des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène avec l'accroissement de la puissance dissipée volumique.

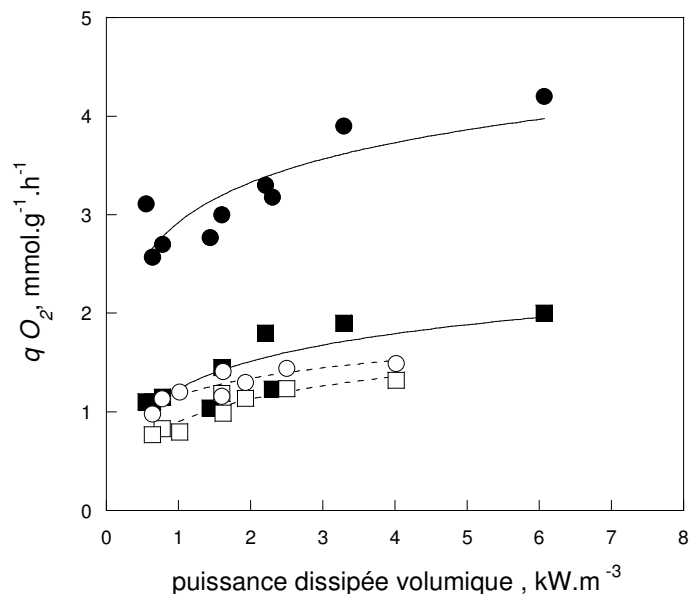


Figure V-12. Influence de la puissance dissipée volumique sur les vitesses spécifiques de consommation d'oxygène pour *S. pristinaespiralis* pr11 à 15 h (●) et 30 h (■) de culture, et DSMZ 40338 à 30 h (○) et 60 h (□) de culture.

V.4.3. Profils d'oxygène dissous

Grâce à la connaissance simultanée du coefficient volumique de transfert gaz-liquide et des consommations globales d'oxygène, il est possible de simuler le profil temporel d'oxygène dissous, pour chaque condition opératoire testée. Cette simulation repose sur le classique bilan d'oxygène suivant :

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_L a ([O_2^*] - [O_2](t)) - OUR(t) \quad (\text{V-1})$$

L'équation différentielle précédente est résolue à l'aide d'une méthode de Runge-Kutta du 4^{ème} ordre (disponible dans le logiciel Matlab®). Les profils obtenus pour les deux souches sont représentés sur la Figure V-13.

Les profils d'oxygène dissous confirment que, dans le cas de la souche pr11, des concentrations nulles en oxygène dissous sont notées pour certaines conditions opératoires, en phase de croissance (15 h de culture) et en phase de production (30 h de culture), entraînant une limitation du transfert gaz-liquide. Pour la souche DSMZ 40338, par contre, les

concentrations en oxygène dissous restent strictement positives, même pour les plus faibles puissances dissipées volumiques. Ainsi, notamment en phase de production, les DOC disponibles pour les microorganismes sont très variables d'une culture à l'autre.

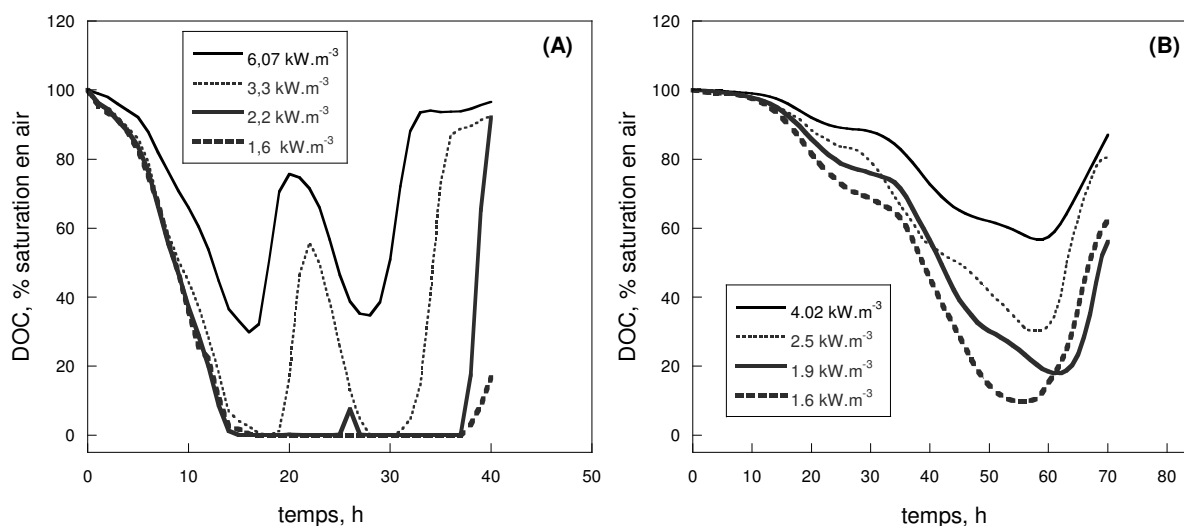


Figure V-13. Profils simulés d'oxygène dissous dans les fioles agitées obtenus par résolution du bilan d'oxygène. Comparaison de *S. pristinaespiralis* pr11 (A) et *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 (B). DOC : concentration en oxygène dissous.

Comme exposé dans le chapitre III, il convient de rappeler ici que le flux de transfert d'oxygène disponible à la surface de la pelote dépend fortement de cette DOC :

$$J = kA([O_2]_b - [O_2]_i) \quad \text{V-2}$$

On peut donc légitimement s'attendre à ce que la DOC ait une influence sur la réponse physiologique des deux souches de *S. pristinaespiralis*. Là encore, il convient d'être prudent quant aux effets directs de la DOC ou à un effet indirect *via* une augmentation des contraintes hydrodynamiques.

V.5. Conclusion

Dans ce chapitre, les relations entre la puissance dissipée volumique, la croissance, la consommation des substrats, la vitesse de transfert de l'oxygène, l'oxygène dissous et la

production de pristinamycines ont été étudiées chez *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 et comparés avec les résultats précédemment obtenus avec la souche pr11.

S. pristinaespiralis DSMZ 40338 est une souche qui se développe plus lentement que la souche pr11. De même, pour une même puissance dissipée volumique et un même k_La , la concentration maximale de biomasse pour la souche DSMZ 40338 est moindre que pour la souche pr11. La puissance dissipée volumique a des effets significatifs sur les vitesses spécifiques maximales de consommation de l'oxygène et de production de pristinamycines chez la souche DSMZ 40338 tandis que les effets sur les vitesses spécifiques maximales de croissance et de consommation des substrats restent faibles, contrairement à ce qui est observé chez la souche pr11. Comme précédemment pour la souche pr11, une limitation en azote ne permet pas à elle seule d'expliquer l'induction de la production des pristinamycines chez *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. Les consommations globales d'oxygène de la souche DSMZ 40338 sont environ 30 % inférieures à celles de la souche pr11 à dissipation volumique comparable. Alors qu'avec la souche pr11 des limitations du transfert gaz-liquide ont été observées, pour la souche DSMZ 40338 l' OUR reste toujours inférieur à l' OTR_{max} , ce qui confirme l'absence de limitation du transfert oxygène (de la phase gaz à la phase liquide), même à faible dissipation volumique. Même si, lors de cultures, une limitation en substrats azotés et un apport surfacique non limitant en oxygène sont observés, il existe certains cas où la production chez *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 n'est pas induite. Des valeurs seuils de P/V et k_La pour l'induction de la production de pristinamycines ont cependant été observées pour les deux souches. Ces valeurs seuils semblent de plus très similaires chez les deux souches.

Même s'il existe des différences au niveau des cinétiques de croissance, de consommation et de production des deux souches de *S. pristinaespiralis* étudiées, l'induction de la production de pristinamycines semble bien être sous l'influence de la dissipation volumique et de l'oxygénation et ce, chez les deux souches. La difficulté à ce niveau de l'étude est que ces deux paramètres sont liés. Une augmentation de la dissipation volumique, par exemple, se traduit par une augmentation du k_La . Il est donc impossible d'attribuer à l'un ou l'autre de ces deux paramètres, un rôle précis lors de la production des pristinamycines.

6^{ème} Chapitre

VI. Découplage des effets de l'agitation et de l'aération sur la production des pristinamycines par S. pristinaespiralis en fioles agitées

*Identification des mécanismes régissant
la production à l'échelle de la pelote*

VI.1. Introduction

Les chapitres précédents nous ont permis de poser l'hypothèse que le déclenchement de la production des pristinamycines, mais également les concentrations obtenues, pouvaient être corrélés soit indirectement (déclenchement) soit directement (concentrations obtenues) à la dissipation volumique. Cependant, la modification de la puissance dissipée a également un impact sur les capacités de transfert de la matière, notamment sur l'oxygène. Ainsi, il est *a priori* difficile d'associer de façon définitive une réponse physiologique donnée de la bactérie, soit au transfert de matière, soit à une modification des contraintes mécaniques.

L'objectif de la dernière partie de ces travaux est donc, dans un premier temps, de découpler le coefficient volumique de transfert d'oxygène (k_{LA}) de la puissance dissipée volumique (P / V) sachant que ce type d'approche est originale dans la littérature en fioles agitées. Les effets de P / V et du k_{LA} ont ainsi été étudiés de manière découplée sur la croissance, le diamètre des pelotes, la consommation des substrats, l'induction de la production et la concentration de pristinamycines produites.

Dans un second temps, la réponse physiologique de la bactérie sera reliée aux évolutions de diamètre de pelotes observées sous différentes conditions opératoires d'agitation. Enfin, la théorie de la turbulence de Kolmogorov sera utilisée pour prédire les échelles de Kolmogorov, les contraintes particulières et donc l'impact de l'agitation sur les diamètres des pelotes et, par voie de conséquence, la réponse physiologique.

Ce chapitre est décomposé en un projet de publication (découplage des mécanismes) et des paragraphes fournissant des résultats complémentaires (relation turbulence - diamètre - physiologie).

VI.2. Decoupling of oxygen transfer and power dissipation for the study of the production of pristinamycins by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks

N. Mehmood¹, E. Olmos¹, J-L. Goergen¹, F. Blanchard¹, P. Marchal¹, D. Ullisch², W. Klöckner², J.Büchs² and S. Delaunay^{1*}

¹Laboratoire Réactions et Génie des Procédés-UPR CNRS 3349, Nancy-Université
ENSAIA-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172 F-54505 Vandœuvre lès Nancy
France

² AVT - Biochemical Engineering, RWTH Aachen University, Worringerweg 1, 52056
Aachen, Germany,

VI.2.1. Abstract

Streptomyces pristinaespiralis is a filamentous bacterium used in the pharmaceutical industry for the production of pristinamycins. In previous works, it was shown that the occurrence of production and the antibiotics concentration could be related to gas-liquid transfer and power dissipation in shaking flasks. Nevertheless, in standard cultures, both mechanisms are coupled. It is then a difficult task to assign a precise physiological response to either oxygen transfer or power dissipation. The aim of the present study was to decouple the oxygen transfer coefficient (k_{La}) and the power dissipation per unit of volume (P / V). During cultures in flasks, the rotation diameter of the shaking table was changed to modify the k_{La} but not the power dissipation P / V . The influence of operating conditions with P / V ranging from 0.55 to 10.3 kW.m⁻³ and k_{La} ranging from 30 to 490 h⁻¹ have been determined on the microbial kinetics and also on the pellet diameters. The final biomass concentration and the onset of the antibiotics production was then related to k_{La} , whereas the final pristinamycin concentrations,

as well as the bacterial pellet diameter were mainly correlated to P / V independently of the $k_L a$. The change in the pellet diameter could be the crucial parameter for the pristinamycin production as it might influence the nutriment transfer inside the pellets and the ratio of active cells in each pellet.

KEYWORDS: pristinamycin, hydrodynamics, power dissipation, gas-liquid mass transfer coefficient, decoupling, pellet diameter.

VI.2.2. Introduction

Streptomyces pristinaespiralis, a filamentous Gram-positive bacterium is industrially used for the simultaneous production of Type I pristinamycins (PI) and type II pristinamycins (PII). PI are cyclic hexadepsipeptides belonging to the streptogramin B group and PII are polyunsaturated cyclic peptolides of the streptogramin A group (Voelker and Altaba, 2001; Thibaut et al., 1995). Pristinamycins depict a strong activity against methicillin-, penicillin-, and vancomycin-resistant bacteria, and a prolonged post-antibiotic effect (Abdel-Hamid and Phillips, 2003; Qadri et al., 1997). Pristinamycins resistant pathogen strains are still rarely encountered (Leclercq et al., 2003; Soussy et al., 1992).

Antibiotics are secondary metabolites generally produced under various nutrient limitations. Limitation of phosphate (Behal, 2002; Biffi et al., 1954; Curdova, 1989; Martin, 1977), nitrogen (Flores and Sanchez, 1985; Jonsbu et al., 2000; Omura et al., 1980; Shen et al., 1984) and carbon (Aharonowitz and Demain, 1978; Demain et al., 1983; Erban et al., 1983; Zhang et al., 1989) sources are well known as promoting antibiotics production. Beside these sources, oxygen is also a key nutrient for the production of antibiotics. As a result of its low solubility in culture media, oxygen is the most commonly limiting substrate in submerged culture. Oxygen uptake by the growing cells reduces the dissolved oxygen concentration (*DOC*) in the medium, reaching thus, in some cases, critical values (Rocha-Valadez et al., 2007). This can entail dramatic negative consequences on process performance (Henriksen et al., 1997; Joshi et al., 1996; Karim, 1996; Lara et al., 2006; Sargantanis and Yegneswaran et al., 1991). To reduce these negative effects, several strategies have been used with the aim of increasing oxygen mass transfer rates throughout the cultures. One of the most common strategies is the increase of the power dissipation per unit of volume P / V , by an increase of

the agitation rate. Power dissipation refers to the amount of energy (in a period of time) required to achieve the movement of the fluid within the vessel. P / V is a key parameter in bioprocess engineering (Ascanio et al., 2004) as it influences heat and mass transfer processes, as well as mixing and circulation times (Lara et al., 2006; Nienow, 1990; Nienow, 1996). Hence, it has been widely used as a bioreactor design and scale-up criterion (Charles, 1985). However, not only gas-liquid but also liquid-biocatalyst mass transfers are also expected to be enhanced through power dissipation increase. It is thus a hard task to study oxygen transfer effects on antibiotics production by only changing agitation levels. Moreover, power dissipation increase also intensifies hydrodynamics stress (abusively called 'shear stress') that could damage the cultured cells (Cui et al., 1997; Joshi et al., 1996; Kelly et al., 2004; Kelly et al., 2006; Makagiansar et al., 1993; Pena et al., 2000; Smith et al., 1990). To better understand the respective influence of oxygenation and mixing on the antibiotic production by *Streptomyces sp.*, it is thus important to consider these parameters independently. The studies dedicated to the decoupled effects of aeration and mixing on *Streptomyces* strains are very rare in literature. Using a blended air / O₂ or N₂ / O₂ stream at constant agitation rate, Yegneswaran and Gray (1991) has shown that an increase in *DOC* resulted in a higher concentration of cephamycin produced by *Streptomyces clavuligerus*.

Besides mixed and sparged bioreactors, shaking flasks are irreplaceable in applications that require a high number of experiments, for example screening for efficient strains or optimization of media (Anderlei and Büchs, 2001). About 90 % of all experiments are conducted in shaking flasks (Büchs, 2001). Moreover, recent advances have made possible the online measurement of various parameters in shake flasks like respiratory quotient (Anderlei and Büchs, 2001; Anderlei et al., 2004), power consumption (Büchs et al., 2000), *DOC* (Gupta and Rao, 2003) and mixing time (Gerson and Kole, 2001; Tan et al., 2011) to enhance bioprocess development using those systems. For these culture systems, oxygen is brought through the gas-liquid free surface, which entails a strong coupling of oxygen transfer with flasks movement. Lastly, shaking flasks appear more appropriate than mechanically mixed bioreactor for the study of the influence of hydrodynamics on cell response due to a more homogeneous flow and the occurrence of a single-phase hydrodynamics.

In previous studies (Mehmood et al., 2010; Mehmood et al., submitted for publication), growth, induction of production as well as concentration of pristinamycins and power dissipation (P / V) and the gas-liquid mass transfer coefficient k_{LA} have been correlated. But,

as these last two parameters were coupled, it was difficult to precisely attribute the physiological responses to mixing or to oxygen transfer alone. As no study showing independent effect of P/V and oxygen transfer in shake flasks on the antibiotic production by *Streptomyces sp.* can be found in literature, an original approach has been adopted to decouple these two phenomena. During the present study, the respective influences of P/V and k_{La} have been thus independently studied on the biomass growth, diameter of pellets, consumption of substrates and induction as well as concentration of pristinamycins produced by *S. pristinaespiralis*.

VI.2.3. Materials and methods

VI.2.3.1. Microorganism

The strain used throughout this study was *Streptomyces pristinaespiralis* DSMZ 40338, a reference strain producing pristinamycins.

VI.2.3.2. Media and culture conditions

Complex medium (ICS): The ICS medium, used for the germination of *S. pristinaespiralis* spores, consisted of sucrose 15 g.L⁻¹, corn steep 5 g.L⁻¹ (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), (NH₄)₂SO₄ 10 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g.L⁻¹, NaCl 3 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0.2 g.L⁻¹ and CaCO₃ 0.2 g.L⁻¹. pH was adjusted at 6.8 prior to sterilization at 121°C for 20 min.

Synthetic medium (MPS2): The buffered synthetic medium MPS2 was used for the culture of *S. pristinaespiralis*. It is composed of glucose 30 g.L⁻¹, malonic acid 7.5 g.L⁻¹, L-arginine 3 g.L⁻¹, L-glutamate 1.5 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0.3 g.L⁻¹, FeSO₄.7H₂O 15 mg.L⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 0.55 g.L⁻¹, 3-morpholinopropanesulfonic acid 20 g.L⁻¹, K₂HPO₄ 0.75 g.L⁻¹ and CaCl₂.2H₂O 0.40 g.L⁻¹. pH was adjusted at 6.8 prior to sterilization for 20 min at 121°C. Concentrated solutions of glucose, CaCl₂ and K₂HPO₄ were sterilized and added separately to avoid Maillard reactions and precipitations.

VI.2.3.3. Culture conditions

Precultures were inoculated with 1 mL of thawed spores calibrated at 3 x 10⁷ CFU.mL⁻¹ and poured into 250 mL unbaffled flasks containing 40 mL of ICS medium. The precultures were performed at 28°C and 250 rpm on an orbital shaker with a 2.5 cm-shaking diameter.

After 20 h, this preculture was used to inoculate MPS2 medium (5 % v/v) contained in 250, 500 or 1000 mL flasks. The dimensions of these flasks have been shown in Mehmood et al. (2010). The cultures were performed during 80 h, at 28°C, either at 250 or 350 rpm and either on a 2.5 or a 5 cm orbital shaker. Depending on the flask size, filling volumes varying between 10 and 200 mL were used. For offline analysis, several flasks with the same filling volume have been used so the flask used once for sampling was never put back on the shaking table.

VI.2.3.4. Experimental measurements

Biomass: The dry biomass concentration was determined by absorbance at 660 nm according to the method described previously Lubbe et al. (1985) and by gravimetric method.

Rheology: The rheology of the culture broth was measured in a home-made rheo-reactor according to the method described by Nzihou et al. (2004).

Glutamate and arginine: Glutamate and arginine concentration were measured by HPLC (LC – 20AD, Shimadzu France, Champs-sur-Marne, France) according to the method described by Mehmood et al. (submitted for publication).

Glucose: An automated chemistry analyzer (VITALAB Selectra 2, Merck, Darmstadt, Germany) was used to measure glucose concentrations by glucose oxidase assays (Bruss, 1997; Sakha et al., 2006).

Pristinamycins concentration: Pristinamycins were extracted from the culture medium and analyzed by HPLC (LC 10 AD-VP, Shimadzu, France) as previously described by Thibaut et al. (1995).

Pellet diameter: The pellet size of the microbial culture was measured by laser diffraction technique (Mastersizer, Malvern, Worcestershire, UK). This system consists of a helium-neon laser as a radiation source and several detectors to measure the light pattern produced over a wide range of angles. The lower and upper limit of obscuration was set at 10 and 30 % respectively. These limits were enough to achieve a good signal to the noise ratio as well as detector dynamics and the algorithm treating multiple scattering. The culture was assumed to possess the optical properties of water (Lin et al., 2010). The angles of scattered laser light from microbial pellets resulted in a specific diffraction pattern, which was collected by the detectors and recorded by the software (Mastersizer, version 2.17).

Oxygen transfer rate (OTR): The *OTR* of the culture was measured with RAMOS device using methods described by Anderlei et Büchs (2001) and Anderlei et al. (2004). *OTR* was assumed to be equal to *OUR* (oxygen uptake rate) (Anderlei et al., 2004).

Power dissipation: The power dissipation per unit of volume was experimentally measured for each operating condition as proposed by Büchs et al. (2000) and Büchs et al. (2001).

VI.2.3.5. Hydrodynamics and mass transfer description

Rheology of culture broth with various concentrations of biomass. The rheology of the suspensions of *S. pristinaespiralis* was obtained for various biomass concentrations (10, 12, 14, 16 and 18 g.L⁻¹), as shown in Figure VI-1.

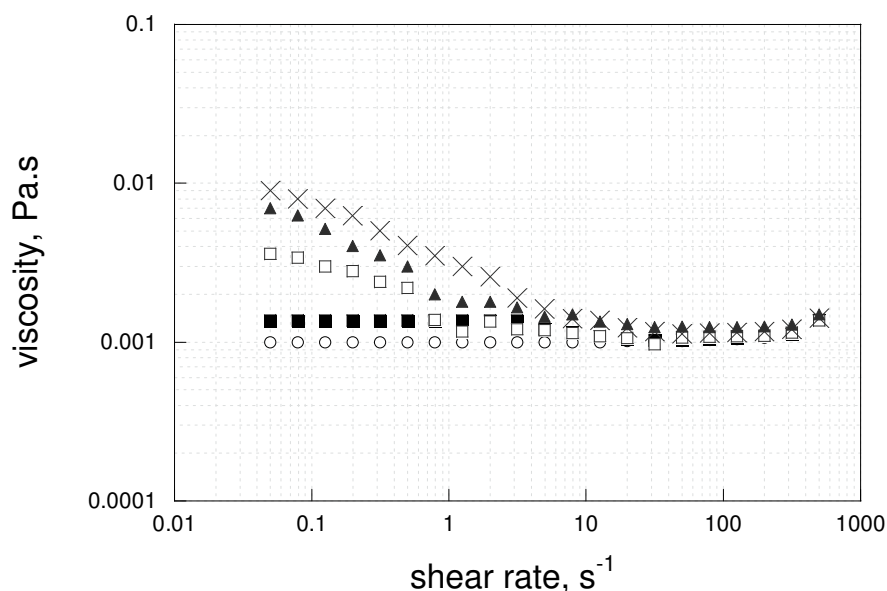


Figure VI-1. Rheological behavior of the microbial suspensions at various concentrations of biomass [10 g.L⁻¹ (○), 12 g.L⁻¹ (■), 14 g.L⁻¹ (□), 16 g.L⁻¹ (▲), 18 g.L⁻¹ (×)].

For the lowest biomass concentrations 10 and 12 g.L⁻¹, biomass suspensions exhibited a Newtonian behavior in the range of shear rates studied and broth viscosity remained around 1 mPa.s. For 14, 16 and 18 g.L⁻¹ biomass concentrations, the culture broth exhibited a non-Newtonian shear-thinning behavior for shear rates lower than 10 s⁻¹. However, for shear rates higher than 10 s⁻¹ (i.e. the range of shear rates encountered in shaking flasks), broth rheology remained Newtonian with viscosities similar to those of water. Our results thus validated the

assumption of Newtonian behavior and water-like viscosities for the biomass suspensions, in the range of operating conditions studied.

Calculation of power dissipation. Büchs et al. (2000) have measured power dissipation in shaking flasks with various filling volumes (100 to 2000 mL), various maximum diameters of flasks (6.1 to 16 cm), various shaking frequencies (80 to 400 rpm) and at two shaking diameter of 2.5 and 5 cm. This study has showed that P / V depends upon density and viscosity of culture medium, filling volumes, diameter of flasks, and agitation speed while at low liquid viscosity, the shaking diameter had no significant effect. The following relation has been proposed for the calculation of the power dissipation:

$$Ne' = 70 Re^{-1} + 25 Re^{-0.6} + 1.5 Re^{-0.2} \quad (VI-1)$$

Where Ne' and Re are respectively the modified Newton and Reynolds numbers given by:

$$Ne' = \frac{P}{\rho N^3 d^4 V^{1/3}} \quad Re = \frac{\rho N d^2}{\mu} \quad (VI-2)$$

Where P (W) is the power dissipation, ρ ($kg \cdot m^{-3}$) the liquid density, N (s^{-1}) the rotational frequency, d (m) the maximum flask diameter, V (m^3) the filling volume and μ (mPa.s) the viscosity of culture medium.

Table VI-1 shows the operating conditions for which power dissipation was measured during cultures. Some of the profiles obtained have been reported in Figure VI-2. No significant variation in power dissipation per unit of volume of culture medium was observed during the cultures. On the basis of the correlations (VI-1) and (VI-2), these results confirmed that broth viscosity kept constant during the culture.

Table VI-1. Operating conditions used for the experimental measurements of power dissipations (P / V) by the set-up proposed by Büchs et al. (2000).

	<i>250 mL flasks</i>				<i>500 mL flasks</i>			
Filling volumes (mL)	10	20	30	40	20	40	60	80
Agitation (rpm)	350	250	350	250	350	350	250	250
P / V ($kW \cdot m^{-3}$)	4.9	2.1	2	0.8	6.2	4	1.2	1.1

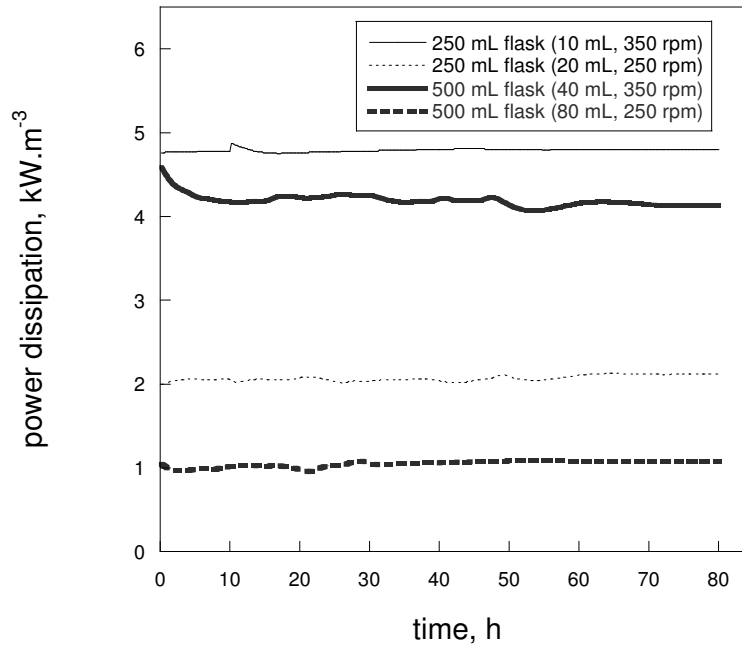


Figure VI-2. Experimental measurement of volume power dissipation (P / V) during culture with various filling volumes and different size of the flasks.

VI.2.3.6. Gas-liquid mass transfer coefficient ($k_L a$)

Various models (Van Suijdam et al., 1978; Henzler and Schedel, 1991; Veljkovic et al., 1995; Veglio et al., 1998) have been proposed to quantify the volumetric gas-liquid mass transfer coefficient in shaking flasks. In the present study, the empirical equation (VI-3) proposed by Maier (2002) and used by Seletzky et al. (2007) was used. This correlation is valid in the range of operating conditions considered.

$$k_L a = 6.67 \cdot 10^{-6} N^{1.16} V_L^{-0.83} d_0^{0.38} d^{1.92} \quad (\text{VI-3})$$

where $k_L a$ is the volumetric gas-liquid mass transfer coefficient (s^{-1}), N the shaking frequency (rpm), V_L (mL) the filling volume, d_0 (cm) the shaking diameter and d (cm) the maximum shake flask diameter.

VI.2.3.7. Decoupling oxygen transfer and power dissipation

On the contrary to power dissipation, the volumetric gas-liquid mass transfer coefficient depends on the shaking diameter by a 0.38 exponent. It can be thus stated that a change of k_La keeping constant P / V can be obtained by a modification of the shaking diameter alone.

Table VI-2 summarizes all the operating conditions studied during this study. Thirty six operating conditions have been thus studied at both 2.5 cm and 5 cm shaking. For each operating conditions, the corresponding values of P / V and k_La were given, using relations (VI-1) and (VI-3).

VI.2.3.8. Calculation of dissolved oxygen concentration

Using experimental OUR and calculated k_La , the dissolved oxygen concentration (DOC) was calculated by the resolution of the equation:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_La \left([O_2]^* - [O_2] \right) - OUR \quad (VI-4)$$

where $[O_2]^*$ was the air saturation DOC and $[O_2]$, the DOC.

Table VI-2. Corresponding values of volume power dissipation (P / V) and gas-liquid mass transfer coefficient (k_{La}) for all operating conditions studied during this study. Agitation frequencies were equal to 250 or 350 rpm and for each, shaking diameter was either 2.5 or 5 cm.

250 mL flasks						
	250rpm			350rpm		
Filling volumes (mL)	P/V ($kW.m^{-3}$)	k_{La} 2.5cm (h^{-1})	k_{La} 5cm (h^{-1})	P/V ($kW.m^{-3}$)	k_{La} 2.5cm (h^{-1})	k_{La} 5cm (h^{-1})
10	1,62	165	215	4,02	244	317
20	1,02	93	121	2,5	137	178
25	0,88	77	100	2,18	113	148
30	0,77	66	86	1,93	98	127,5
40	0,642	52	68	1,6	77	100,3
50	0,55	43	57	1,38	64	83,4
500 mL flasks						
	250rpm			350rpm		
Filling volumes (mL)	P/V ($kW.m^{-3}$)	k_{La} 2.5cm (h^{-1})	k_{La} 5cm (h^{-1})	P/V ($kW.m^{-3}$)	k_{La} 2.5cm (h^{-1})	k_{La} 5cm (h^{-1})
10	3,47	253	329	8,67	374	487
20	2,19	142	185	5,46	210	274
40	1,38	80	104	3,44	118	154
60	1,05	57	74	2,63	85	110
80	0,868	45	59	2,17	67	87
100	0,748	37	49	2	55	72
1000 mL flasks						
	250rpm			350rpm		
Filling volumes (mL)	P/V ($kW.m^{-3}$)	k_{La} 2.5cm (h^{-1})	k_{La} 5cm (h^{-1})	P/V ($kW.m^{-3}$)	k_{La} 2.5cm (h^{-1})	k_{La} 5cm (h^{-1})
20	4,1	202	263	10,3	299	388
40	2,58	113	148	6,47	168	219
60	1,97	81	106	4,94	120	156
80	1,63	64	83	4,08	94,5	123
100	1,4	53	69	3,51	78,5	102
200	0,89	30	39	2,21	44,2	57

VI.2.4. Results

VI.2.4.1. Decoupling oxygen transfer and power dissipation effects on biomass growth

Figure VI-3 depicts the kinetics of biomass growth, antibiotic production, nutrient consumptions and pellet diameters for 3 conditions of power dissipations (4.02, 1.6 and 1.38 kW.m⁻³) and 6 k_{La} values (317, 244, 100, 83, 77 and 64 h⁻¹). For each P / V value, k_{La} has been modified by changing the shaking diameter of the table.

As seen on Figure VI-3A, the biomass concentration increased with the increase in P / V . Moreover, for operating condition exhibiting the same P / V but different k_{La} values, the concentration of biomass increased with the increase in k_{La} value too. The more important the gap of k_{La} was, the more significant the increase in the biomass concentration was.

Figure VI-3 depicts the relationships between P / V , k_{La} , the maximum concentration of biomass (X_{max}) and the occurrence of pristinamycins production for all the operating conditions studied. The contour plot has been obtained by using a cubic interpolation of the three nearest experimental points. As expected, X_{max} globally increased with k_{La} values. For k_{La} inferior to 50 h⁻¹, X_{max} was only 9 g.L⁻¹, while it reached 17.4 g.L⁻¹ with the increase in k_{La} up to 487 h⁻¹. The increase in biomass concentration with k_{La} values was not linear and could be divided into 2 phases. For oxygen transfer coefficients varying between 30 and 100 h⁻¹, X_{max} increased linearly from 9 g.L⁻¹ to 13 g.L⁻¹. Then, for k_{La} higher than 100 h⁻¹, a slower increase in X_{max} was observed as it passed from 13 to 17 g.L⁻¹ for 490 h⁻¹. These results are in accordance with previous results reporting that the maximum concentration of biomass was increasing but not linearly with k_{La} in the case of the industrial strain *S. pristinaespiralis* pr11 (Mehmood et al., 2010).

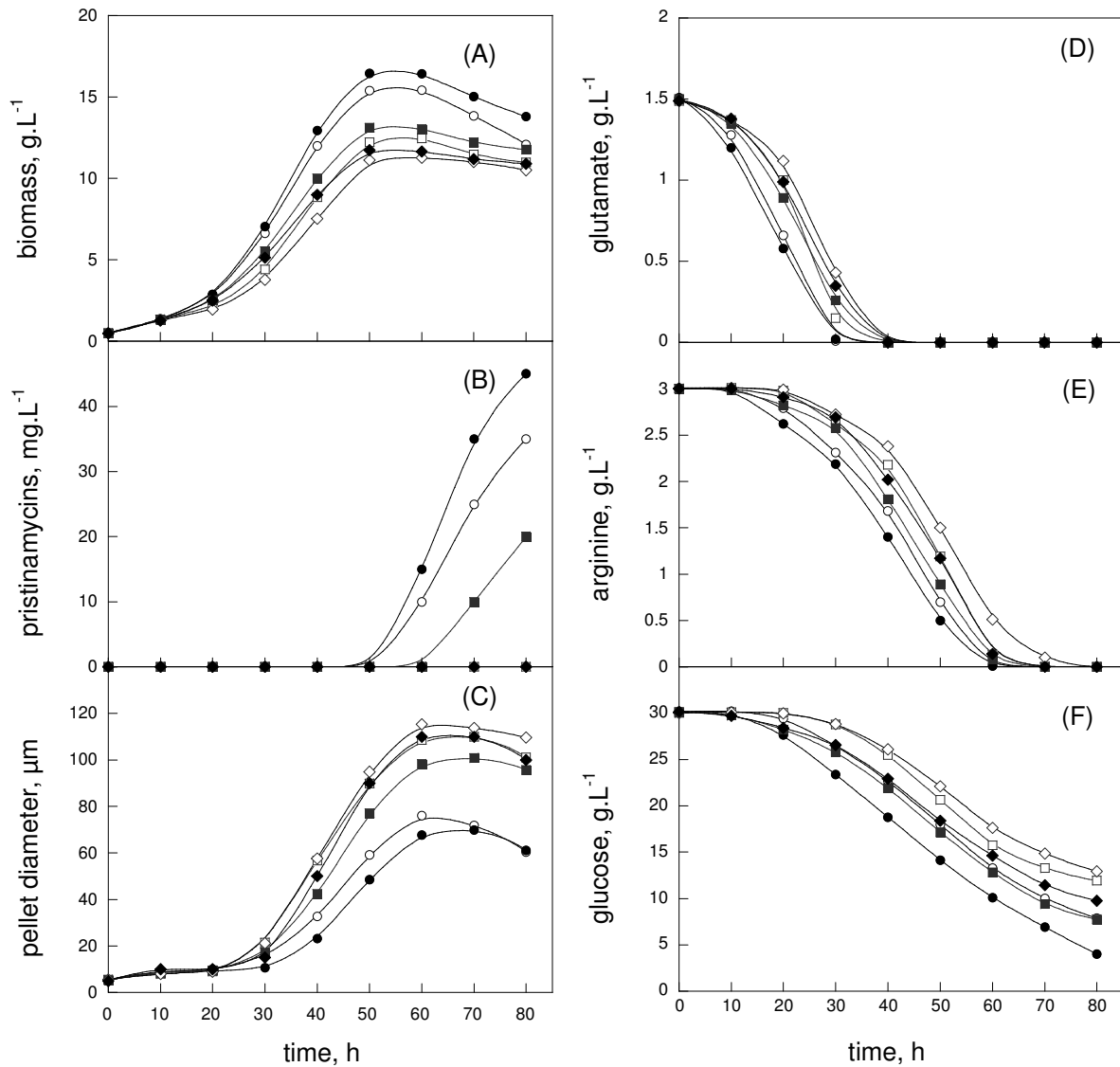


Figure VI-3. Influence of varying gas-liquid mass transfer coefficient (k_{LA}) and volume power dissipation on concentration of biomass (A), induction and concentration of pristinamycins (B), diameter of pellets (C), consumption of glutamate (D), arginine (E) and glucose (F) during course of cultivation time. Values of P / V (kW.m^{-3}) and k_{LA} (h^{-1}): (4.02; 244, ○), (4.02; 317, ●), (1.6; 77, □), (1.6; 100, ■), (1.38; 64, ◇), (1.38; 83, ◆).

By decoupling power dissipation from gas-liquid mass transfer coefficient, biomass concentration at constant P / V and varying k_{LA} could be analysed. For a given power dissipation, the maximum biomass concentration was still sensibly modified. For instance, at a constant power dissipation of 4 kW.m^{-3} , X_{max} could vary from 12 g.L^{-1} for 80 h^{-1} , to 16.5 g.L^{-1} for 320 h^{-1} . No direct relationships could be thus established between power dissipation

and concentration of biomass. On the contrary, keeping constant the values of k_{La} , it could be observed that the maximum concentration of biomass was not sensibly affected by a change of power dissipation. For instance, for $k_{La} = 100 \text{ h}^{-1}$, the concentration of biomass remained equal to 12.5 g.L^{-1} although P / V was varying from 1 to 4 kW.m^{-3} . In the same way, a constant k_{La} value of 200 h^{-1} ensured a constant maximum biomass concentration between 14 and 15 g.L^{-1} whatever the power dissipation applied. These results thus suggested that the effects of mixing on biomass growth were indirect, through an enhancement of oxygen transfer.

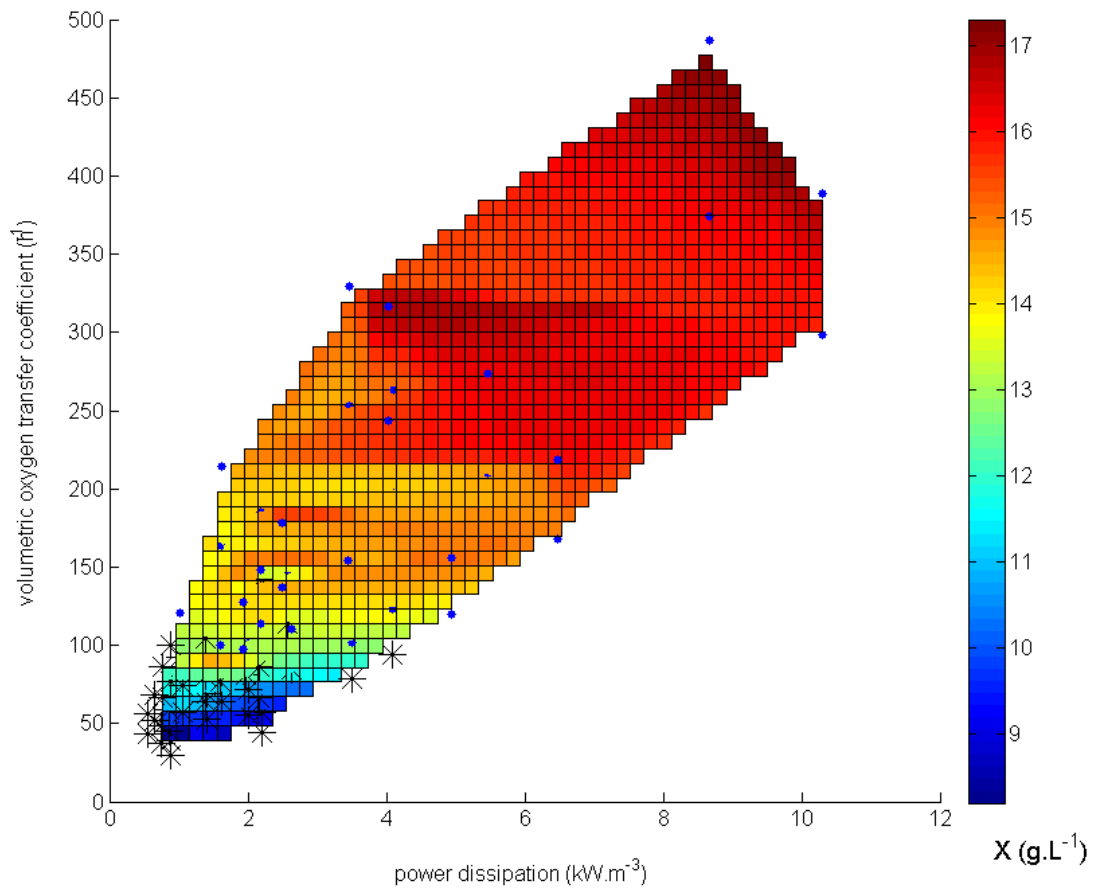


Figure VI-4. Relationships between maximal biomass concentration (X_{max}), power dissipation (P / V) and gas-liquid mass transfer coefficient (k_{La}). (*) and (●) symbols respectively state for non-producing and producing cultures.

VI.2.4.2. Decoupling oxygen transfer and power dissipation effects on oxygen consumption and dissolved oxygen concentration

The influence of the same culture conditions was determined on the oxygen uptake rate (OUR), except $1.38 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$. Indeed, this culture condition could not be studied due to liquid splashing on the cotton plug which perturbed the oxygen transfer. It was thus replaced by two cultures performed at $0.77 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$ and 66 or 86 h^{-1} according to the shaking diameter. For these two conditions, no pristinamycin production occurred.

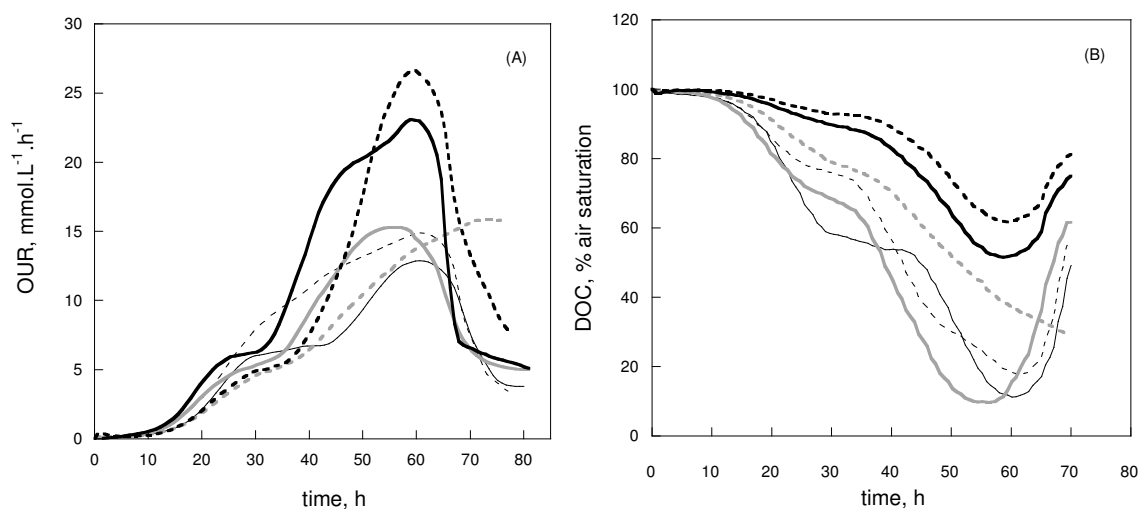


Figure VI-5. Influence of various volume power dissipation (P / V) and gas-liquid mass transfer coefficient (k_{La}) on the oxygen uptake rate (A) and on the dissolved oxygen concentration (DOC) (B) during cultures with *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. Values of P / V ($\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$) and k_{La} (h^{-1}): (4.02; 244 \rightarrow), (4.02; 317 \dashrightarrow), (1.6; 77 \rightarrow), (1.66; 100 \dashrightarrow), (0.77; 66 \rightarrow), (0.77; 83 \dashrightarrow).

An increase in the k_{La} induced a slight enhancement in the OUR. On the contrary, at close values of k_{La} (77 and 83 h^{-1}), the increase in P / V from 0.77 to $1.6 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$ had no significant influence on the OUR (Figure VI-5A). The increase in the OUR with the raise of k_{La} suggested that the oxygen supply might be limiting for the microorganism. This limitation might be a consequence of a limiting gas-liquid transfer at the medium surface. To verify this hypothesis, the DOC was calculated from OUR experimental data. Interestingly, DOC remained over 10% of air saturation whatever the culture condition (Figure VI-5B). Similar DOC values were calculated for all the cultures performed in 250 mL flasks except 0.55 and

1.38 kW.m⁻³ which were not carried out (data not shown). Thus, in these culture conditions, the oxygen transfer at the liquid surface was not limiting.

However, a linear correlation was found between the biomass concentration and the DOC after 30 h culture (end of the growth phase on glutamate as carbon and nitrogen source), after 50 h culture (during growth on glucose and arginine as main carbon and nitrogen source respectively) and after 60 h culture (when pristinamycin production occurred in some culture conditions) (Figure VI-6). When the DOC increased, the biomass concentration was increased too, suggesting that *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 growth could be promoted by an increase in the oxygen mass transfer flux at the pellet-liquid interface or by an enhanced oxygen transfer inside pellets.

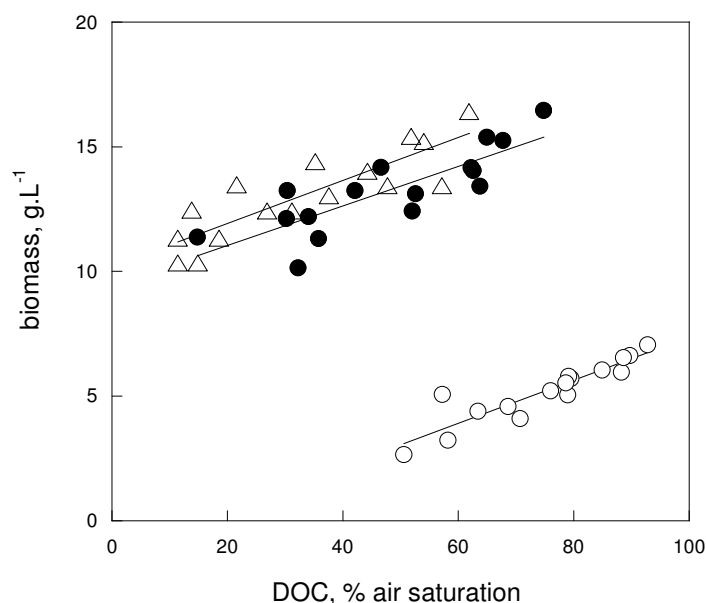


Figure VI-6. Correlation between the biomass concentration and the dissolved oxygen concentration (DOC) after 30 (○), 50 (●) and 60 (△) hours of culture with *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338

VI.2.4.3. Decoupling oxygen transfer and power dissipation effects on the occurrence of pristinamycins production

In our previous study obtained using *S. pristinaespiralis* pr11, it was reported that

threshold values of P / V (2 kW.m^{-3}) and of k_{La} (100 h^{-1}) were necessary to induce the production of pristinamycins but no explanation could be brought on the respective effects of mixing and aeration (Mehmood et al., 2010). Among the six operating conditions considered in the present study, only three led to pristinamycins production between 50 and 60 h of culture (Figure VI-3B). Indeed, while both experiments performed at 4 kW.m^{-3} led to production, the condition (1.6 kW.m^{-3} ; 100 h^{-1}) promoted the production on the contrary to the condition (1.6 kW.m^{-3} ; 77 h^{-1}) despite the power dissipation was the same. At 1.38 kW.m^{-3} , no production occurred whatever the k_{La} value. The hypothesis of a threshold value of k_{La} around 100 h^{-1} to achieve antibiotics production could be confirmed by displaying the whole set of the experiments (Figure VI-7) on a three-dimensional plot of the antibiotics concentration.

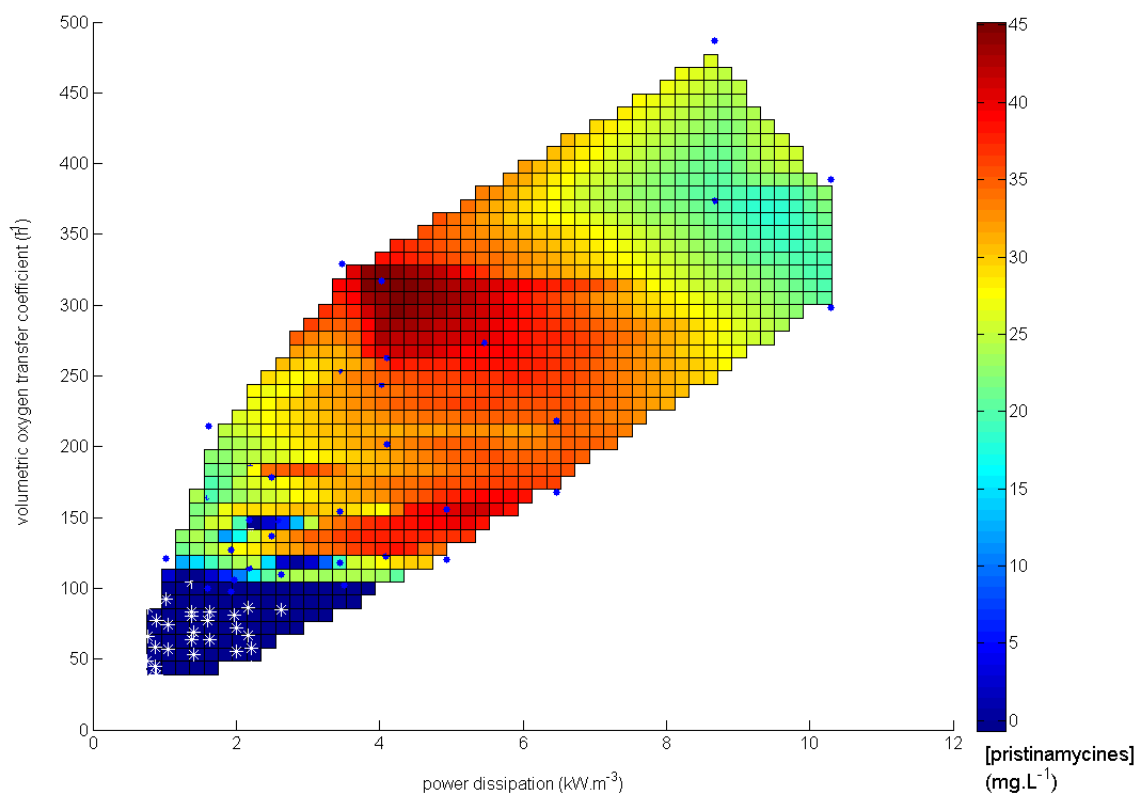


Figure VI-7. Relationships between maximal pristinamycines concentration, power dissipation (P / V) and gas-liquid mass transfer coefficient (k_{La}). (*) and (●) symbols respectively state for non-producing and producing cultures.

Among the 72 operating conditions studied, 35 cultures (13 at 2.5 cm as shaking diameter and 22 at 5 cm) have led to the production of pristinamycins. This meant that for 9 experiments, the increase in the shaking diameter (and thus in k_{La}) entailed the occurrence of production, at a given power dissipation. Next, it can be observed that, maintaining constant power dissipation alone is not a sufficient condition to induce the pristinamycins production, as shown, for example, by the experiments with P/V inferior to 4 kW.m^{-3} . On the contrary, a k_{La} higher than 100 h^{-1} was sufficient to ensure antibiotics production, whatever the power dissipation encountered.

VI.2.4.4. Decoupling oxygen transfer and power dissipation effects on pristinamycins concentration and yield

Figure VI-7 shows the relationships between power dissipation, gas-liquid mass transfer coefficient and concentration of pristinamycins. The maximal concentration of pristinamycins appeared to be strongly dependent on the power dissipation. Three production behaviors have been identified: first, a linear increase in the concentration of pristinamycins for P/V stating between 0.55 and 4 kW.m^{-3} approximately. Then, in the range of power dissipations from 6 to 8 kW.m^{-3} , the concentration of pristinamycins was roughly independent from power dissipation and reached a maximum value around 40 mg.L^{-1} . Lastly, a decrease in the concentration from 40 to 20 mg.L^{-1} was observed when power dissipation increased from 6 to 10 kW.m^{-3} . It can be noted that, for a given power dissipation, the concentration of pristinamycins did not vary significantly despite a change in k_{La} . An exception has been observed for P/V in the range from 2 to 4 kW.m^{-3} and for k_{La} from 100 to 350 h^{-1} . In these culture conditions, the biomass concentration and the pristinamycins concentration simultaneously increased from 12 to 17 g.L^{-1} and from 15 to 45 mg.L^{-1} respectively. As a consequence, the pristinamycins to biomass yield remained almost unchanged. It can be thus concluded that the level of pristinamycins production was strongly coupled to the power dissipation alone.

VI.2.4.5. Decoupling oxygen transfer and power dissipation effects on pellet diameter

As seen above, the maximal biomass concentration was dependent on the oxygen transfer only. However, due to the mechanical stresses, the size of pellets formed by

S. pristinaespiralis during a culture may be affected. The mean pellet diameter was then determined during the 6 culture conditions mentioned previously (Figure VI-3C). The mean diameter of the pellets increased after 30 h of culture and reached a maximum after 60 to 70 h culture. Significant differences between diameters of pellets were observed according to the power dissipation applied in the culture. For $4 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$, the maximum mean pellet diameter varied between $70 \mu\text{m}$ approximately for $4 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$, and $105 \mu\text{m}$ at $1.38 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$. The impact of the oxygen transfer alone seemed to entail an increase of the mean pellet diameter but the differences observed remained weak.

VI.2.4.6. Decoupling oxygen transfer and power dissipation effects on substrates consumption

The exhaustion of substrates was more rapid for operating conditions with highest power dissipations. For $4.02 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$ the glutamate was exhausted at 30 h culture while for 1.6 and $1.38 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$, it was exhausted after 40 h culture (Figure VI-3D). Arginine was totally exhausted at 60 to 70 h of culture (Figure VI-3E). In the operating conditions which entailed pristinamycin production, a limitation in arginine (nitrogen source) was measured when the antibiotic production was effective. For $1.38 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$, although nitrogen supply was limiting, no pristinamycin was produced. Throughout the cultures, no limitation of glucose (main carbon source) was observed (Figure VI-3F).

For operating conditions with same dissipation but different k_{La} values, no significant difference in specific consumption rate of glutamate and arginine could be put into evidence (Table VI-3) and the exhaustion time of glutamate and arginine was almost similar (Figure VI-3D, E). Concerning glucose, the specific consumption rate increased with both P/V and k_{La} for the conditions shown. This suggested that the slight increase in the specific growth that was determined when dissipation and k_{La} were increased might be attributed to an increase in the consumption of the main carbon source.

Table VI-3. Maximal specific growth rate μ_{max} and maximal specific consumption rates q of glutamate, arginine and glucose for the operating conditions shown in Figure VI-3.

P / V (kW.m ⁻³)	4.02		1.6		1.38	
k_{LA} (h ⁻¹)	244	317	77	100	64	83
μ_{max} (h ⁻¹)	0.089	0.094	0.077	0.081	0.08	0.073
q glutamate (g.h ⁻¹ .g ⁻¹)	0.033	0.037	0.034	0.026	0.028	0.026
q arginine (g.h ⁻¹ .g ⁻¹)	0.012	0.011	0.012	0.011	0.008	0.008
q glucose (g.h ⁻¹ .g ⁻¹)	0.073	0.121	0.053	0.087	0.054	0.072

VI.2.5. Discussion

In this work, an approach has been developed to study respective effects of power dissipation and k_{LA} on the physiology of *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 during a pristinamycin producing process. Indeed, changing shaking diameter from 2.5 to 5 cm resulted in a sensible change in k_{LA} values at constant power dissipation.

As it was previously suggested with *S. pristinaespiralis* pr11 (Mehmood et al., 2010), oxygen transfer had a clear effect on the maximal biomass concentration of *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. This suggested that oxygen supply was limiting for the sustaining of the bacterial growth in the Erlenmeyer flasks used throughout this study. The oxygen supply involved the oxygen transfer at the gas-liquid interface then at the pellet-liquid interface and finally inside the pellet. In the tested culture conditions, the first transfer step was clearly not limiting as the DOC remained always over 10%. The increase in the biomass concentration with the DOC suggested that at least one of the two last steps was limiting. In both cases an increase in bulk oxygen concentration promoted the overall oxygen transfer, either directly in the case of a liquid-solid limiting transfer, or indirectly through the increase in the interfacial concentration. Unfortunately, to date, it is impossible to more precise without the knowledge of the oxygen concentration at the pellet-liquid interface. An experimental device has been developed for the determination of this concentration at the surface of fungi pellets (Hille et al., 2005). However, to our knowledge, such measurement

was never carried out with *Streptomyces* pellets. The importance of the oxygen transfer for the growth of antibiotic-producing *Streptomyces* has already been mentioned. As used in this study, El-Enshasy et al. (2000) increased the aeration in *Streptomyces natalensis* cultures performed in flasks by reducing the filling volume or by increasing the agitation rate. In both cases, an increase in the final biomass concentration was observed. A similar observation was performed with *S. fradiae* for which cellular growth was dramatically reduced when the *DOC* fell below 25 % of air saturation (Chen and Wild, 1991). These results suggested that, with *Streptomyces sp.*, the growth could be favored by an increase in the oxygen mass transfer flux at the pellet-liquid interface by increasing the driven force ($[O_2]_{\text{liquid}} - [O_2]_{\text{pellet interface}}$).

The increase in the maximal biomass concentration might also be due to a change in the physiological properties of the bacterial strain such as substrate uptake. With *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, the increase in P / V and also k_{La} appeared to have a positive effect on the specific glucose consumption rate. This raise in the glucose uptake might be performed through an increase in the specific activity of a phosphotransferase system involved in the glucose uptake. Several candidates were identified in *S. coelicolor* (Parche et al., 2000) but, to our knowledge, none of these systems have been biochemically characterised to date. However, the increase in the exchange surface (pellet interfacial area) due to the decrease in the pellet size for a similar biomass concentration might also have as a consequence an increase in the specific rate of glucose uptake. Indeed, a similar observation was previously performed with *S. fradiae* (Tamura et al., 1997) and *S. coelicolor* (Tough and Prosser, 1996). In these two studies, performed in stirred bioreactor, an increase in the impeller speed provoked a reduction in the pellet diameter. Moreover, at constant P / V , the increase in k_{La} induced also a slight decrease in the pellet diameter obtained with *S. pristinaespiralis*. The influence of the oxygen transfer on the microbial morphology has been discussed in many publications. Unfortunately in most of these works, the oxygen transfer was modified by changing the agitation rate, it is then impossible to distinguish the effect of the power dissipation from the influence of the oxygen availability. Nevertheless, some works performed with fungi may be mentioned. Cui et al. (1998) studied the decoupled effect of oxygen transfer on the morphology of *Aspergillus awamori* by modifying the percentage of oxygen in the inlet gas. The aeration rate and the stirrer speed and, as a consequence the power dissipation, were constant in the different experiment. In these conditions, the authors showed that the pellet size was independent of the dissolved oxygen

concentration and that the increase in the mechanical forces induced a decrease in the pellet size. Very recently, it was demonstrated that it was the volumetric power input by aeration which was mainly responsible for the change in the pellet size of *Aspergillus niger* compared to the volumetric power input by agitation (Lin et al., 2010). Nevertheless, both previous studies were performed in mechanically stirred reactor and with fungi pellets.

The pristinamycins production occurred only when k_La was higher than about 100 h^{-1} whatever the volume power dissipation. However, the concentration of pristinamycin that was produced was related to P/V . As previously shown with *S. pristinaespiralis* pr 11 (Mehmood et al., submitted for publication), the exhaustion of nitrogen and phosphate sources was necessary but not sufficient to induce the pristinamycins production. This suggests that the synthesis of antibiotics necessitated a high level of oxygenation and was performed by metabolically active cells. These cells should be located where oxygen availability was expected to be maximal, at the periphery of the pellets. Jonsbu et al. (2000) demonstrated that the core of *S. noursei* pellets lacked metabolic activity. This was confirmed with vital stains such as propidium iodide and SYTO 9 in *S. coelicolor* (Manteca et al., 2008). The cellular death was mainly reported in the centre of the pellets. The presence of this inactive core was also mentioned in *S. fradiae* pellets during cultures in both mechanically stirred and air-lift bioreactors (Park et al., 1997). As P/V increase induced smaller microbial pellets, it could be suggested that ratio of active to inactive cells may be larger for these culture conditions. Indeed, it was recently suggested that in small pellets of *A. niger*, this ratio was enhanced compared to larger pellets (Lin et al., 2010). This would explain why the concentration of produced pristinamycins was only P/V dependant. When the pristinamycins concentration and the pristinamycins on biomass yield are plotted against pellet interfacial area, a linear correlation was obtained (Figure VI-8). Once again, this strongly suggested that the pellet size and then nutriment transfer phenomena may govern not only the induction but also the level of pristinamycins production.

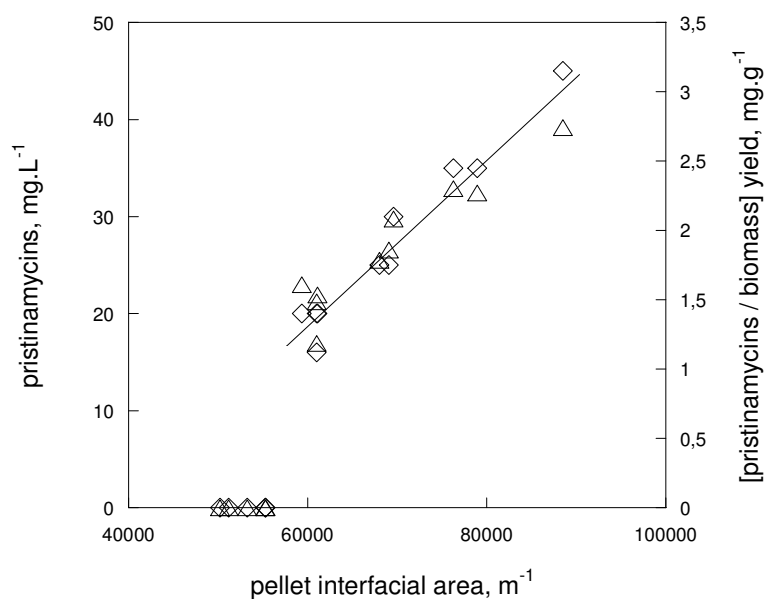


Figure VI-8. Correlation of pristinaamycins concentration (◇) and pristinaamycins / biomass yield (△) and with pellet interfacial area. Pellet interfacial area was obtained by $a_p = 6 / d_p$.

VI.2.6. Conclusion

It was previously shown that the pristinaamycins production (onset and final concentration) by *S. pristinaespiralis* was related to P / V and oxygen supply (Mehmood et al., submitted). Thanks to the decoupling of these two parameters, the influence of each of them has been precised. Dissipation seems to play a crucial role as it controls the pellet size and thus possibly production of pristinaamycins through nutriments (including oxygen) transfer phenomena and the ratio of active cells in each pellet. To test the validity of the preceding hypothesis, the effect of turbulence on pellet diameter and pellet growth kinetics should be discussed more precisely.

VI.2.7. References

- Abdel-Hamid ME, Phillips OA. 2003. LC-MS/MS determination of Synercid® injections. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32(6):1167-1174.
- Aharonowitz Y, Demain AL. 1978. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14(2):159-164.
- Anderlei T, Büchs J. 2001. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem. Eng. J.* 7(2):157-162.

Chapitre VI. Découplage de l'agitation et de l'aération. Effets de la turbulence

- Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J. 2004. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem. Eng. J.* 17(3):187-194.
- Ascanio G, Castro B, Galindo E. 2004. Measurement of power consumption in stirred vessels-a review. *Chem. Eng. Res. Des.* 82(9): 1282-1290.
- Bêhal V. 2002. Antibiotics. *Biotechnol. Ann. Rev.* (8) 227-265.
- Biffi G, Boretti G, Di Marco A, Pennella P. 1954. Metabolic behavior and chlortetracycline production by *Streptomyces aureofaciens* in liquid culture. *Appl. Microbiol.* 2(5):288-293.
- Bruss ML. 1997. Lipids and ketones. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds) *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th edn. Academic, London, pp 83–113
- Büchs J, Lotter S, Milbradt C. 2001. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 7(2):135-141.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol. Bioeng.* 68(6):589-593.
- Büchs J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem. Eng. J.* 7(2):91-98.
- Charles M. 1985. Fermentation design and scale-up. In: Moo-Young M (ed) *Comprehensive biotechnology*, vol. 2. Pergamon Press, Oxford. 57-75 p.
- Chen HC, Wilde F. 1991. The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 37(6):591-595.
- Cui YQ, Van Der Lans RGJM, Luyben KCAM. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 55(5):715-726.
- Cui YQ, Van der Lans RGJM, Luyben KCAM. 1998. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 57(4):409-419.
- Curdova E, Jechova V, Zima J, Vanek Z. 1989. The effect of inorganic phosphate on the production of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *J. Basic Microbiol.* 29(6):341-346.
- Demain AL, Aharonowitz Y, Martin JF. 1983. Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*: 49-72.
- El-Enshasy HA, Farid MA, El-Sayed ESA. 2000. Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J. Basic Microbiol.* 40(5-6):333-342.
- Erban V, Novotná J, Bêhal V, Hošťálek Z. 1983. Growth rate, sugar consumption, chlortetracycline production and anhydrotetracycline oxygenase activity in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol.* 28(4):262-267.
- Flores ME, Sanchez S. 1985. Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 26(2):191-194.
- Gerson DF, Kole MM. 2001. Quantitative measurements of mixing intensity in shake-flasks and stirred tank reactors: Use of the Mixmeter, a mixing process analyzer. *Biochem. Eng. J.* 7(2):153-156.
- Gupta A, Rao G. 2003. A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. *Biotechnol. Bioeng.* 84(3):351-358
- Henriksen CM, Nielsen J, Villadsen J. 1997. Influence of the dissolved oxygen concentration on the penicillin biosynthetic pathway in steady-state cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Prog.* 13(6):776-782.
- Henzler HJ, Schedel M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioprocess Eng.* 7(3):123-131.
- Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H. 2005. Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioeng.* 92(5):614-623.
- Jonsbu E, Ellingsen TE, Nielsen J. 2000. Effect of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by

Chapitre VI. Découplage de l'agitation et de l'aération. Effets de la turbulence

- Streptomyces noursei*. J. Antibiot. 53(12):1354-1362.
- Joshi JB, Elias CB, Patole MS. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. Biochem. Eng. J. 62(2):121-141.
- Kelly S, Grimm LH, Bendig C, Hempel DC, Krull R. 2006. Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. Process Biochem. 41(10):2113-2117.
- Kelly S, Grimm LH, Hengstler J, Schultheis E, Krull R, Hempel DC. 2004. Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. Bioprocess Biosystems Eng. 26(5):315-323.
- Lara AR, Galindo E, Ramirez OT, Palomarès LA. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors: Understanding the effects of environmental gradients on cells. Mol. Biotechnol. 34(3):355-381.
- Leclercq R, Soussy CJ, Weber P, Moniot -Ville N, Dib C. 2003. In vitro activity of the pristinamycin against the isolated staphylococci in the french hospitals in 1999-2000. Pathol. Biol. 51(7):400-404.
- Lin PJ, Scholz A, Krull R. 2010. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. Biochem. Eng. J. 49(2):213-220.
- Lubbe C, Demain AL, Bergman K. 1985. Use of controlled-release polymer to feed ammonium to *Streptomyces clavuligerus* cephalosporin fermentations in shake flasks. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22(6):424-427.
- Maier U. 2002. Gas-Flüssigkeits-Stofftransfer im Schüttelkolben. RWTH Aachen University. Aachen, PhD thesis.
- Makagiansar HY, Ayazi Shamlou P, Thomas CR, Lilly MD. 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. Bioprocess Eng. 9(2-3):83-90.
- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 74(12):3877-3886.
- Martín J. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. Adv. Biochem. Eng. Volume 6. p 105-127.
- Mehmood N, Olmos E, Marchal P, Goergen JL, Delaunay S. 2010. Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_{La} . Process Biochem. 45(11):1779-1786.
- Nienow AW. 1990. Agitators for mycelial fermentations. Trends Biotechnol. 8(8):224-233.
- Nienow AW. 1996. Gas-liquid mixing studies: A comparison of Ruston turbines with some modern impellers. Chem. Eng. Res. Des. 74 (4):417-423.
- Nzihou A, Bournonville B, Marchal P, Choplin L. 2004. Rheology and heat transfer during mineral residue phosphatation in a rheo-reactor. Chem. Eng. Res. Des. 82(5):637-641.
- Omura S, Tanaka Y, Kitao C. 1980. Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. Antimicrob. Agents Chemother. 18(5):691-695.
- Parche S, Nothaft H, Kamionka A, Titgemeyer F. 2000. Sugar uptake and utilisation in *Streptomyces coelicolor*: A PTS view to the genome. Antonie van Leeuwenhoek. 78(3-4):243-251.
- Park, Y, Tamura, S, Koike, Y, Toriyama, M, Okabe, M. 1997. Mycelial pellet intrastucture visualization and viability prediction in a culture of *Streptomyces fradiae* using confocal scanning laser microscopy. J. Ferment. Bioeng. 84(5):483-486.
- Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E. 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. Enzyme Microb. Technol. 27(6):390-398.
- Qadri SMH, Ueno Y, Mostafa FMA, Halim M. 1997. In vitro activity of quinupristin/dalfopristin, RP59500, against gram-positive clinical isolates. Chemotherapy 43(2):94-99.
- Rocha-Valadez JA, Albitar V, Caro MA, Serrano-Carreón L, Galindo E. 2007. A fermentation system designed to independently evaluate mixing and/or oxygen tension effects in microbial processes: Development, application and

- performance. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 30(2):115-122.
- Sakha M, Ameri M, Rohbakhsh A. 2006. Changes in blood β -hydroxybutyrate and glucose concentrations during dry and lactation periods in Iranian Holstein cows. *Comp. Clin. Pathol.* 15(4):221-226.
- Sargantanis IG, Karim MN. 1996. Effect of oxygen limitation on B-lactamase production. *Biotechnol. Prog.* 12(6):786-792.
- Seletzky JM, Noak U, Fricke F, Welk E, Eberhard W, Knocke C, Büchs J. 2007. Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnol. Bioeng.* 98(4):800-811.
- Shen YQ, Heim J, Solomon NA. 1984. Repression of β -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.* 37(5):503-511.
- Smith JJ, Lilly MD, Fox RI. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 35(10):1011-1023.
- Soussy CJ, Acar JF, Cluzel R, Courvalin P, Duval J, Fleurette J, Megraud F, Meyran M, Thabaut A. 1992. A collaborative study of the in-vitro sensitivity to RP 59500 of bacteria isolated in seven hospitals in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 30(SUPPL. A):53-58.
- Tamura S, Park Y, Toriyama M, Okabe M. 1997. Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 83(6):523-528.
- Tan RK, Eberhard W, Büchs J. 2011. Measurement and characterization of mixing time in shake flasks. *Chem. Eng. Sci.* 66(3): 440-447.
- Thibaut D, Ratet N, Bisch D, Faucher D, Debussche L, Blanche F. 1995. Purification of the two-enzyme system catalyzing the oxidation of the D- proline residue of pristinamycin II (B) during the last step of pristinamycin II (A) biosynthesis. *J. Bacteriol.* 177(18):5199-5205.
- Tough AJ, Prosser JJ. 1996. Experimental verification of a mathematical model for pelleted growth of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in submerged batch culture. *Microbiology* 142(3):639-648.
- Van Suijdam JC, Kossen NWF, Joha AC. 1978. Model for oxygen transfer in a shake flask. *Biotechnol. Bioeng.* 20(11):1695-1709.
- Veglio F, Beolchini F, Ubaldini S. 1998. Empirical models for oxygen mass transfer: A comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganiferous ore bioleaching. *Process Biochem.* 33(4):367-376.
- Veljkovic V, Nikolic S, Lazic M, Engeler C. 1995. Oxygen transfer in flasks shaken on orbital shakers. *Hem. Ind.* 49 (6) 265-272.
- Voelker F, Altaba S. 2001. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology* 147(9):2447-2459.
- Yegneswaran PK. 1991. Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentations. *Biotechnol. Prog.* 7(3):246-250.
- Zhang J, Wolfe S, Demain AL. 1989. Carbon source regulation of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium* C-10. *Curr. Microbiol.* 18(6):361-367.

VI.3. Influence de la dissipation volumique sur les cinétiques de croissance de pelotes et leur diamètre

Lors des paragraphes précédents, l'influence du diamètre des pelotes sur la réponse physiologique a été fortement suspectée. Néanmoins, dans un processus biologique actif, la relation entre le diamètre des pelotes et son environnement hydrodynamique apparaît encore plus complexe que dans le cas de particules non-biologiques. En effet, aux processus standards d'agrégation et de rupture observés pour des agrégats inertes, par exemple, doivent être ajoutés les processus de croissance biologique qui tendent à favoriser une croissance conjointe des pelotes microbiennes. Nous étudierons donc ici successivement non seulement l'impact de l'agitation sur la vitesse de croissance des pelotes mais aussi son impact sur la rupture des pelotes.

VI.3.1. Agitation et croissance des pelotes.

La littérature propose quelques modèles de croissance de pelotes. Le plus connu d'entre eux propose une loi d'évolution cubique pour la masse des pelotes (Emerson, 1950). Une autre méthode de caractérisation de la cinétique de croissance des pelotes est le calcul d'un taux de croissance des pelotes R_p ($\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$) basé sur les mesures expérimentales de diamètre (Kelly et al., 2006). Pour la détermination de ce taux de croissance, les mesures de diamètre ont été interpolées à l'aide de fonctions splines par morceaux. Le taux de croissance R_p est alors donné par $R_p = d d_p(t)/dt$. Le taux de croissance R_p a été calculé chez les 2 souches et pour toutes les conditions d'écoulement rencontrées. Une représentation de R_p aux conditions extrêmes de dissipation appliquées à chacune d'elles (0,55 et 4,02 $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$ pour *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 et 0,5 et 6,07 $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$ pour *S. pristinaespiralis* pr11), est donnée sur la Figure VI-9. Il apparaît que :

- Les taux de croissance des pelotes des souches pr11 et DSMZ 40338 sont du même ordre de grandeur avec des valeurs maximales comprises entre 1 et 5 $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$.
- La vitesse de croissance des pelotes varie sensiblement d'une souche à une autre. Dans le cas de la souche pr11, le taux de croissance des pelotes reste constant en début de culture, traduction d'une évolution linéaire du diamètre des pelotes au cours du temps.

Dans un second temps, le taux R_p atteint un maximum aux alentours de 20 h de culture, ce qui correspond à la phase de ralentissement de la croissance bactérienne. Par ailleurs, le passage d'une dissipation volumique de 0,55 à 6,07 kW.m^{-3} entraîne une chute très importante du taux de croissance des pelotes. Dans le cas de la souche DSMZ 40338, le taux de croissance R_p augmente progressivement au cours du temps pour atteindre un maximum aux alentours de 40 h de culture, ce qui correspond, là encore, au début de la phase de ralentissement de la croissance microbienne. Par contre, le passage de 0.5 à 4.02 kW.m^{-3} entraîne moins de variations sur R_p que dans le cas de la souche pr11.

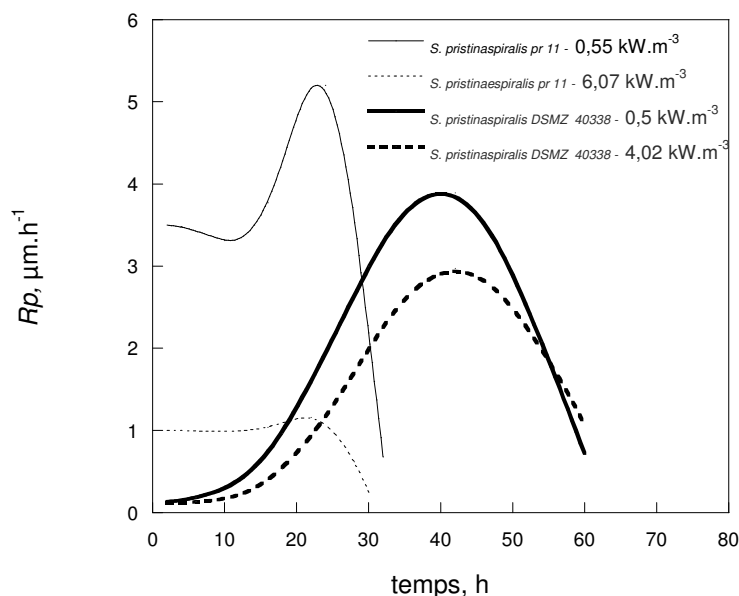


Figure VI-9. Calculs des taux de croissance des pelotes R_p . Les résultats sont donnés pour *S. pristinaespiralis* pr11 et DSMZ 40338 et les dissipations volumiques extrêmes appliquées à chacune de ces deux souches.

Pour confirmer ou infirmer l'effet de la turbulence sur le taux de croissance des pelotes, l'évolution du taux de croissance maximal des pelotes $R_{p_{max}}$ avec la dissipation volumique a été représentée (Figure VI-10). En effet, selon Kelly et al. (2006), le taux maximal de croissance des pelotes dépend du taux de dissipation moyen selon la loi de proportionnalité suivante : $R_{p_{max}} \propto \langle \varepsilon \rangle^{-0.21}$. Dans le cas de *S. pristinaespiralis*, $R_{p_{max}}$ diminue également avec

la dissipation, cet effet étant beaucoup plus marqué chez la souche pr11 que chez la souche DSMZ 40338. Néanmoins, si les contraintes mécaniques sont plus fortes, lorsque P / V est augmentée, le k_{La} est lui aussi augmenté ce qui favorise, comme nous l'avons constaté précédemment, la croissance cellulaire et donc potentiellement l'accroissement du diamètre des pelotes. L'évolution observée sur la Figure VI-10 est donc la résultante de ces deux phénomènes antagonistes. Afin de vérifier l'importance respective de la dissipation volumique et de la croissance cellulaire, *via* l'apport d'oxygène, sur le diamètre des pelotes, le taux de croissance des pelotes a été calculé lors des manipulations découplées, réalisées à dissipation volumique identique mais suivant deux évolutions de 2 k_{La} différentes (Table VI-2 du projet de publication et Figure VI-11).

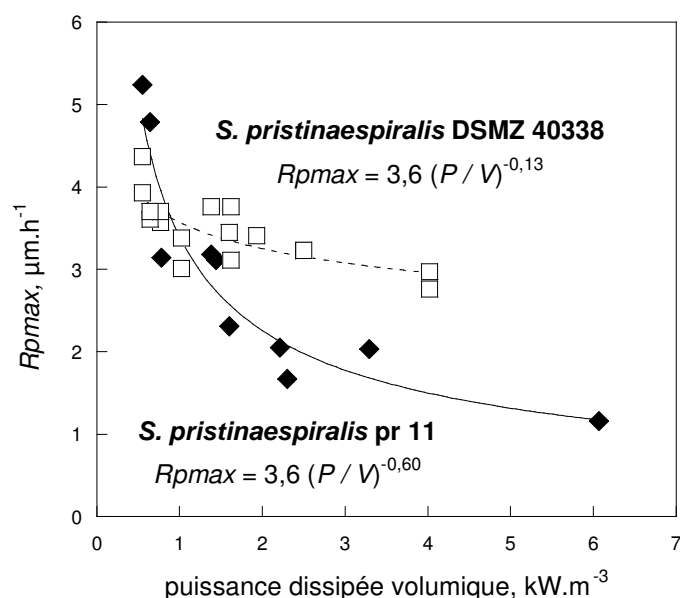


Figure VI-10. Relation entre le taux de croissance maximal des pelotes R_{pmax} et la dissipation volumique P / V pour *S. pristinaespiralis* pr11 (◆) et DSMZ 40338 (□).

L'augmentation du k_{La} pour une même valeur de dissipation se traduit, soit par une augmentation, soit par une diminution du taux de croissance sans qu'aucune tendance précise n'apparaissent (Figure VI-11). Il semble que l'augmentation du transfert d'oxygène ait peu d'influence sur le taux de croissance des pelotes. Celui-ci semble donc être régi uniquement par la dissipation volumique.

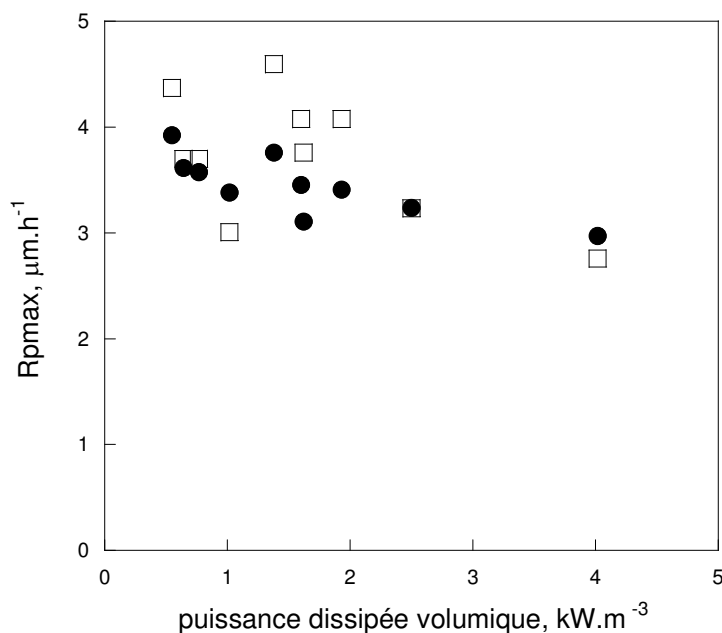


Figure VI-11. Influence respective de la puissance dissipée volumique et du coefficient volumique de transfert d'oxygène sur le taux de croissance maximal R_{pmax} des pelotes de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. Manipulations réalisées avec un diamètre d'agitation de 2,5 cm (●) ou de 5 cm (□).

VI.3.2. Impact de la turbulence sur les diamètres de pelotes et les contraintes particulières

VI.3.2.1. Diamètre et échelle de dissipation (rupture)

Lors de leur culture en flacons agités, les microorganismes sont soumis à une turbulence générée par la mise en rotation de la table d'agitation. Pour les conditions de culture utilisées dans le cadre de ce chapitre, les nombres de Reynolds sont compris entre 27000 et 37000 (voir chapitre IV). Selon Peter et al. (2006), la transition du régime laminaire vers le régime turbulent s'effectue pour des Reynolds de 60 000. Ainsi, les conditions de cultures utilisées ici favorisent un écoulement « tout juste » turbulent. Par ailleurs, compte-tenu de l'écoulement rotatif généré, il semble difficile de supposer une isotropie de la turbulence, au moins aux grandes échelles. Selon ces mêmes auteurs, le ratio entre la dissipation maximale et la

dissipation moyenne en flacons agités est environ 10 fois inférieur à celui escompté en bioréacteurs agités mécaniquement, ce qui permet de supposer une homogénéité relative de la turbulence dans ces systèmes. Par des mesures expérimentales, ces auteurs ont également montré que les diamètres maximaux de gouttes en flacons lisses se corrélaient très bien à la dissipation moyenne. Malgré une non-vérification *a priori* des hypothèses requises, il semble raisonnable :

- d'appliquer la théorie de Kolmogorov à ce système, celle-ci supposant l'homogénéité et l'isotropie de la turbulence ;
- de relier les grandeurs globales de la turbulence aux mesures, notamment de diamètres, réalisées sur les pelotes microbiennes.

Il n'existe aucune donnée dans la littérature proposant une description locale de la turbulence en flacons agités et celle-ci n'est d'ailleurs pas le propos de ce travail de thèse. En conséquence, nous nous contenterons de relier les grandeurs moyennes de la turbulence à celles de la phase biologique. L'application de cette théorie devra nous permettre de quantifier :

- L'échelle de dissipation de Kolmogorov ;
- la zone de turbulence (inertielle ou visqueuse) dans laquelle sont transportées les pelotes bactériennes ;
- la contrainte hydrodynamique appliquée sur celles-ci.

Pour rappel, l'échelle moyenne de dissipation de la turbulence $\langle l_K \rangle$ est fournie par la relation suivante :

$$\langle l_K \rangle = \left(\frac{\nu^3}{\langle \varepsilon \rangle} \right)^{0,25} \quad (\text{VI-5})$$

avec ν ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) la viscosité cinématique du milieu de culture et $\langle \varepsilon \rangle$ ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$) ou ($\text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$) le taux de dissipation moyen sur le volume. Celui-ci est obtenu à partir de la puissance dissipée volumique par:

$$\langle \varepsilon \rangle = \frac{1}{\rho} \frac{P}{V} \quad (\text{VI-6})$$

N'ayant pas accès aux distributions de valeurs de dissipation ou de diamètre, nous supposons par la suite que $\langle l_K \rangle = l_K$, $\langle \varepsilon \rangle = \varepsilon$ et $\langle d_p \rangle = d_p$. L'évolution du diamètre des pelotes en cours de cinétiques et en fonction de l'échelle de dissipation est donnée sur la Figure VI-12. Ces résultats montrent que :

- A tout instant de la culture, les diamètres de pelotes se corrèlent linéairement avec l'échelle de dissipation et ce, pour les deux souches étudiées et toutes les conditions opératoires.
- A l'exception des premières heures de cinétique, le diamètre des pelotes est plus grand que l'échelle de Kolmogorov, les pelotes sont donc transportées dans la zone inertielle de la turbulence. Ainsi, on peut supposer que les contraintes visqueuses sont minoritaires à l'échelle de la particule, celle-ci étant surtout soumise à des contraintes turbulentes issues des fluctuations locales de vitesse.

La taille des pelotes n'excède jamais 4 fois l'échelle de Kolmogorov. Cet intervalle de diamètre a déjà été relevé par Coufort et al. (2005) lors de l'étude de la rupture d'agrégats inertes en réacteur de Taylor-Couette.

Pour expliquer les tendances observées, Coufort et al. (2005) ont proposé un modèle de rupture, que nous nous proposons de reprendre ici dans le cas de pelotes de *S. pristinaespiralis*.

Lors de son transport dans la zone inertielle de la turbulence (l_K inférieur à d_p), la pelote est soumise à des gradients de vitesse donnés par :

$$\frac{\sqrt{u'^2(d_p)}}{d_p} = \sqrt{\frac{3C_1}{2}} \left(\frac{\varepsilon}{d_p^2} \right)^{1/3} \quad (\text{VI-7})$$

$\sqrt{u'^2(d_p)}$ (m.s^{-1}) est la moyenne quadratique des fluctuations de vitesses à l'échelle de la particule, C_1 est une constante.

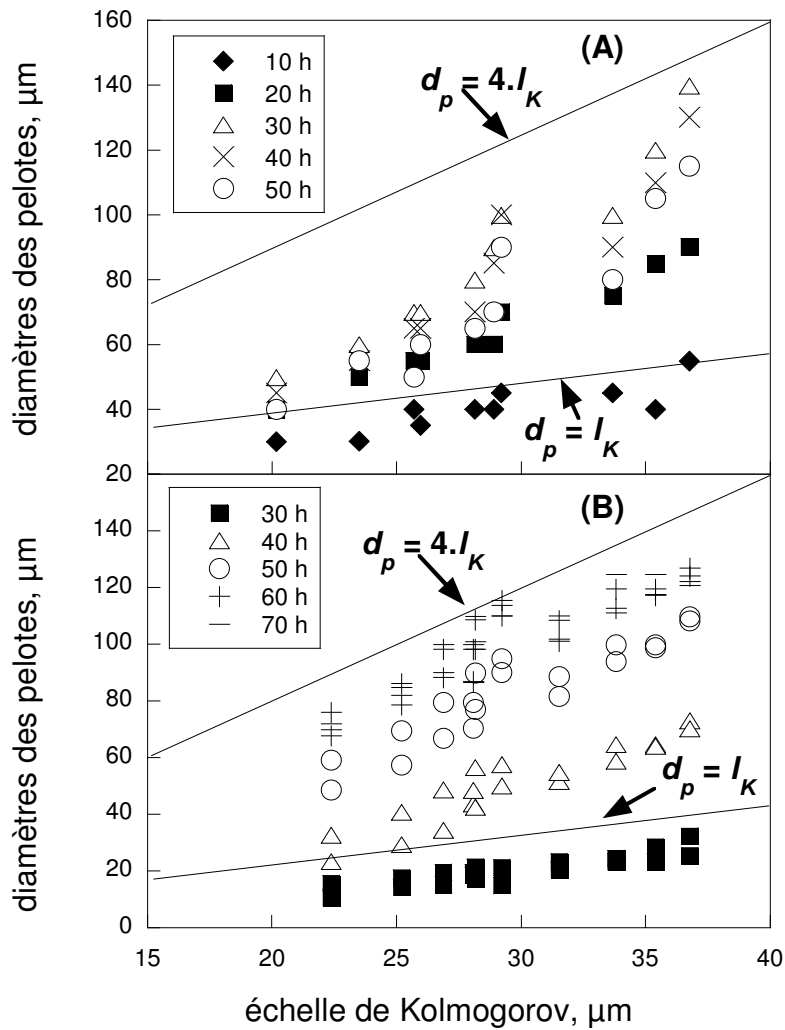


Figure VI-12. Evolution des diamètres moyens de pelotes pour différents temps de culture en fonction de l'échelle moyenne de Kolmogorov. Comparaison des souches pr11 (A) et DSMZ 40338 (B). l_K est l'échelle (moyenne) de Kolmogorov, d_p est la taille moyenne des pelotes.

Dans cette zone inertielle, les particules sont soumises à des contraintes hydrodynamiques particulières τ (Pa) données par Thomas (1964) :

$$\tau = \rho \overline{u^2(d_p)} \quad (\text{VI-8})$$

et, d'après la relation (VI-7) :

$$\overline{u^2(d_p)} = C_2 (\varepsilon d_p)^{2/3} \quad (\text{VI-9})$$

avec $C_2 = 0,7$. La contrainte particulière est alors donnée par :

$$\tau = C_2 \rho (\varepsilon d_p)^{2/3} \quad (\text{VI-10})$$

De cette contrainte, il est possible d'obtenir une tendance générale pour la force hydrodynamique F_H (N) appliquée à la particule de diamètre d_p sous une dissipation ε :

$$F_H \propto \tau d_p^2 \propto \varepsilon^{2/3} d_p^{8/3} \quad (\text{VI-11})$$

Coufort et al. (2005) ont proposé que le diamètre de particules placées en champ turbulent soit fonction de la force hydrodynamique F_H à l'échelle particulière et de la force de cohésion de la particule F_C . Lorsque la force issue des contraintes hydrodynamiques dépasse les forces de cohésion, la particule se brise. Dans le cas contraire, la particule ne se brise pas. Il est alors possible d'introduire un rapport adimensionnel de rupture BREAK quantifiant le ratio entre ces deux forces :

$$\text{BREAK} = \frac{F_H}{F_C} \quad (\text{VI-12})$$

La limite de rupture est donnée par $\text{BREAK} = 1$, soit $F_H \propto 1$ ou encore:

$$d_p \propto \varepsilon^{-0.25} \quad (\text{VI-13})$$

Les résultats expérimentaux présentés dans la Figure VI-12 montrent une relation linéaire entre le diamètre moyen des pelotes et l'échelle moyenne de Kolmogorov (l'échelle moyenne de dissipation varie également comme $\varepsilon^{-0.25}$, $l_K \propto \varepsilon^{-0.25}$) et confirment donc parfaitement ce qui était prédit par le modèle précédent. On notera également que les diamètres des pelotes sont du même ordre de grandeur que l'échelle de dissipation. Ceci confirme également l'hypothèse selon laquelle la force de cohésion des pelotes microbiennes est indépendante du diamètre de celle-ci. De plus, les diamètres de pelote atteignent des valeurs quelques fois plus grandes que l'échelle de dissipation. En effet, en pratique, l'énergie cinétique turbulente est dissipée à des échelles plus grandes que l_K . Ainsi, à grands nombres de Reynolds (ce qui n'est pas notre cas ici), l'énergie se dissipe dans des structures au moins 8 fois plus grandes que l'échelle de Kolmogorov (Pope, 2000).

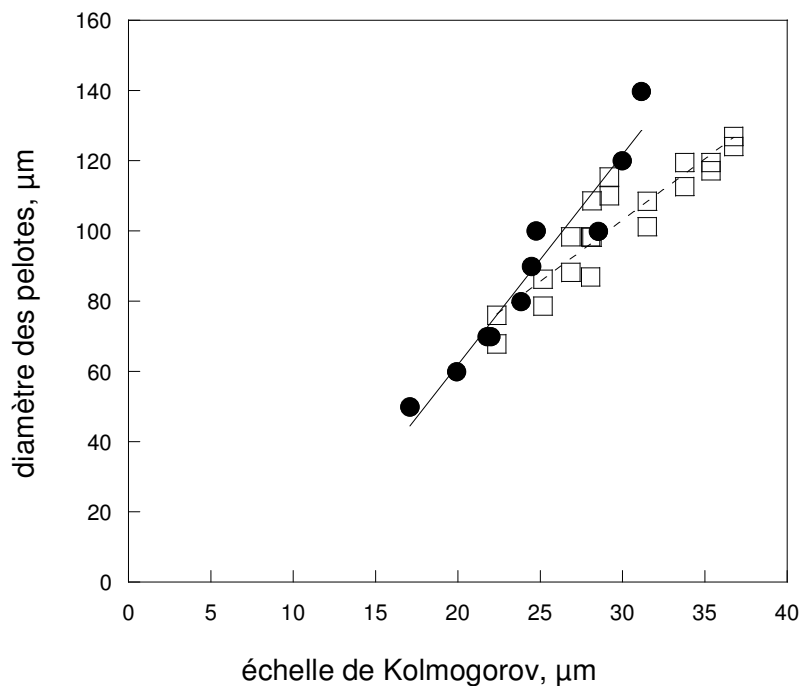


Figure VI-13. Corrélations entre l'échelle de Kolmogorov et le diamètre des pelotes lors du déclenchement de la production avec *S. pristinaespiralis* pr11 après 30 h de culture (●) et avec *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 après 60 h de culture (□).

Des résultats présentés Figure VI-12, il est possible de déduire des corrélations reliant le diamètre des pelotes aux échelles de dissipation, lors du déclenchement de la production des pristinamycines. Ces corrélations permettront d'accéder à une estimation de la taille des pelotes pour les expériences au cours desquelles celles-ci n'ont pas été mesurées. Ainsi, les corrélations suivantes sont obtenues (Figure VI-13) :

$$d_p = 6,0l_K - 57,9 \text{ pour la souche pr11} \quad (\text{VI-14})$$

$$d_p = 3,5l_K - 1,75 \text{ pour la souche DSMZ 40338} \quad (\text{VI-15})$$

La littérature propose quelques lois d'évolution du diamètre des pelotes avec la turbulence mais avec des champignons et donc avec des tailles de pelotes plus grandes (de l'ordre du millimètre). Ainsi, la taille des hyphes de *P. chrysogenum* a été reliée à $\langle \varepsilon \rangle^{-0,33}$ par Dion et al. (1954), à $\langle \varepsilon \rangle^{-0,2}$ par Ayazi Shamlou et al. (1994) et à $\langle \varepsilon \rangle^{-0,17}$ par Metz (1977). Les relations mises en évidence dépendent donc soit sensiblement des microorganismes étudiés,

soit de la précision de l'interpolation réalisée. Van Suijdam and Metz (1981) ont ainsi rapporté que le diamètre de pelotes diminue par le facteur $\langle \varepsilon \rangle^{-0,36}$ avec *P. chrysogenum* alors qu'avec *A. awamori*, il diminue par le facteur $\langle \varepsilon \rangle^{-0,17}$ (Cui et al. 1997).

Le choix d'une dissipation moyenne a été discuté dans la littérature (Coufort et al., 2005) car lors du changement de design du réacteur, les diamètres de particules inertes se corrélaient moins bien à la dissipation moyenne. Coufort et al. (2005) ont ainsi montré que le choix d'une échelle de dissipation « la plus fréquente » était un choix plus judicieux car plus représentative des échelles effectivement rencontrées par les particules. Dans notre cas, l'augmentation de puissance dissipée est non seulement obtenue par augmentation de la vitesse de rotation mais également par une diminution du volume de milieu de culture placé dans les fioles, ce qui implique un non-respect de la similitude géométrique. Malgré cela, il semblerait que le choix de la dissipation moyenne demeure valable dans des fioles agitées lisses. La faible dispersion de dissipation volumique observée par Peter et al. (2006) ainsi que les nombres de Reynolds proches du seuil de transition semblent être des explications possibles à ces observations. Des expériences dans des fioles de 500 et 1000 mL de volume total seraient judicieuses pour asseoir définitivement cette affirmation.

VI.3.2.2. Contraintes particulières

Dans les chapitres précédents, une hypothèse avait été avancée quant aux effets possibles des contraintes particulières sur la physiologie des souches étudiées. A l'aide de la relation (VI-10), il est possible d'estimer les contraintes sur les pelotes microbiennes, au cours du temps et selon le taux de dissipation volumique appliqué (Figure VI-14).

Comme l'indique la relation (VI-10), la contrainte particulière augmente en cours de culture, le diamètre des pelotes augmentant et la dissipation d'énergie n'étant pas modifiée (pas d'effet de la viscosité). Un facteur 3, environ, est noté entre les contraintes particulières extrêmes relevées pour un temps de culture donné mais un facteur 6 peut être atteint entre le début et la fin de cinétique, notamment dans le cas de la souche DSMZ 40338 cultivée à 4,02 kW.m⁻³.

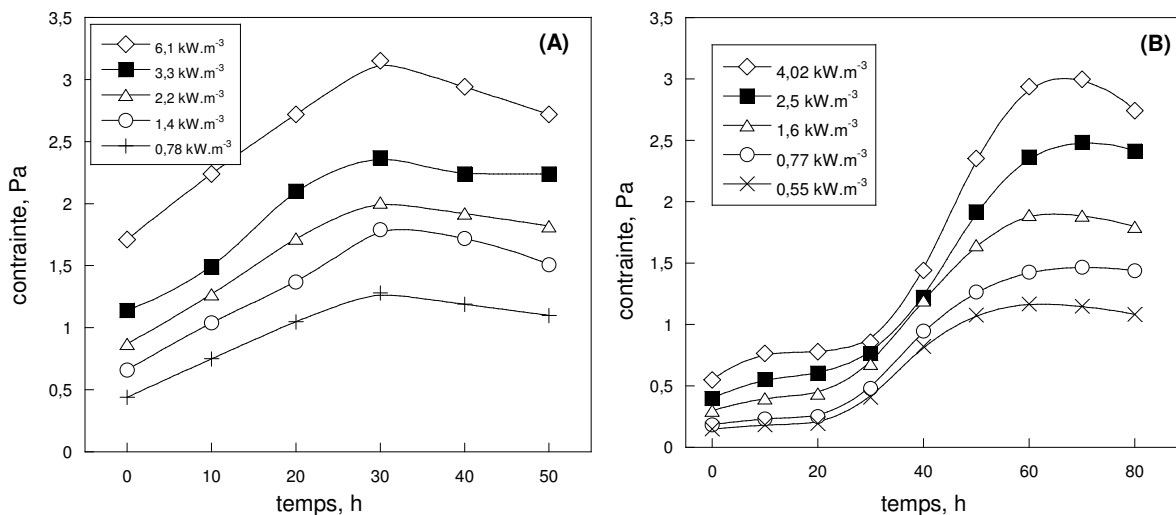


Figure VI-14. Evolution des contraintes particulières pour quelques dissipations volumiques. Comparaison des souches *S. pristinaespiralis* pr11 (A) et DSMZ 40338 (B).

Il est également intéressant de remarquer qu'une intensité de contrainte rencontrée en début de cinétique et sous une dissipation volumique donnée peut également l'être sous une plus faible dissipation volumique mais pour un plus grand temps de culture. Ainsi, par exemple, pour la souche DSMZ 40338, une contrainte particulière de 0,75 Pa est calculée à 10 h pour une dissipation de 4,02 kW.m⁻³, mais également pour une dissipation de 0,55 kW.m⁻³ à 40 h. Ceci établit clairement que le diamètre des pelotes ne peut être considéré comme une fonction de la seule turbulence de la phase liquide et qu'une contribution de la phase biologique est indéniable. Ainsi, pour une caractérisation complète des cinétiques de diamètres de pelotes sous différentes dissipations volumiques, il est nécessaire de s'intéresser conjointement à la croissance de celles-ci.

VI.4. Impact des diamètres de pelotes sur la consommation d'oxygène et la production

L'agitation vient d'être reliée au diamètre des pelotes. Cette observation a ensuite été reliée aux capacités respiratoires et productrices des deux souches étudiées.

VI.4.1. Relation entre le diamètre des pelotes et la consommation d'oxygène

Les échanges entre les pelotes et le milieu extracellulaire étant liés à l'aire interfaciale des pelotes, celle-ci a été calculée à partir des mesures expérimentales de diamètre au cours des différentes cultures réalisées. Une unique corrélation linéaire reliant la consommation d'oxygène spécifique à l'aire interfaciale est établie pour les deux souches (Figure VI-15). De plus, les résultats obtenus pour les deux souches se confondent. Ceci implique que les plus grandes capacités respiratoires notées pour *S. pristinaespiralis* pr11 ne sont la conséquence que du fait que les pelotes sont plus petites que pour la souche DSMZ 40338 à même dissipation volumique. Cette nouvelle observation renforce l'hypothèse, déjà émise, que le ratio biomasse active / biomasse totale serait plus important dans les pelotes de faible diamètre que dans les grandes pelotes.

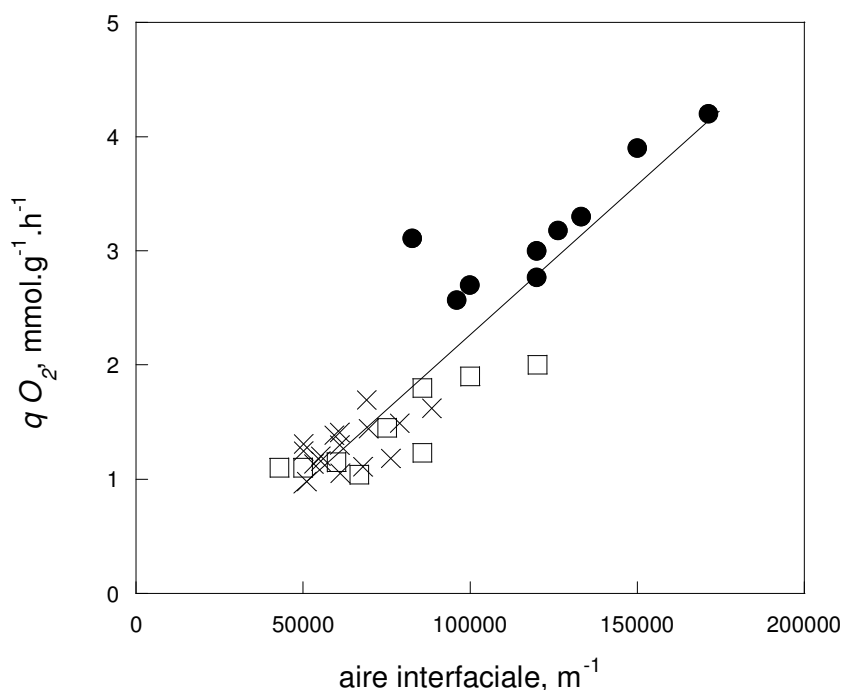


Figure VI-15. Relation entre aire interfaciale et vitesse spécifique de consommation d'oxygène pour *S. pristinaespiralis* pr 11 à 15 h (●) et 30 h (□) de culture, et DSMZ 40338 à 60 h (×) de culture.

VI.4.2. Relation entre le diamètre des pelotes et la production de pristinamycines

En reprenant l'hypothèse selon laquelle seules les cellules actives sont productrices de l'antibiotique, il serait attendu que la quantité produite soit reliée à l'aire interfaciale des pelotes a_p . L'évolution de la concentration d'antibiotiques avec l'aire interfaciale est donnée sur la Figure VI-16 pour les expériences menées en fioles de 250 mL.

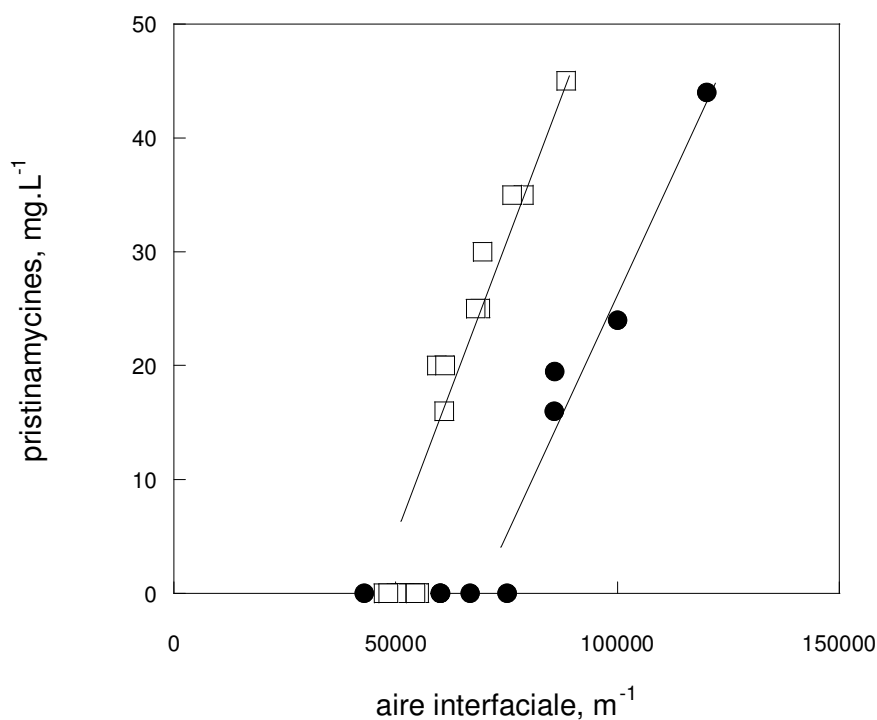


Figure VI-16. Relation entre l'aire interfaciale, déterminée à partir des mesures expérimentales des diamètres des pelotes de *S. pristinaespiralis* pr11 (●) et DSMZ 40338 (□) et la concentration en pristinamycines.

Pour les deux souches utilisées, la concentration en antibiotique augmente linéairement avec l'aire interfaciale, ce qui confirme l'hypothèse précédemment établie. A noter que, pour une aire interfaciale donnée, la souche pr11 produit moins que la souche sauvage. Cependant, il est difficile d'apporter des explications avec les éléments dont nous disposons dans le cadre de cette étude. Plusieurs pistes sont envisageables, notamment des différences de structures

internes et en périphérie de pelotes, des masses volumiques différentes ou des capacités intrinsèques de production différentes. Du fait de cette différence entre les 2 souches, l'aire interfaciale des pelotes ne semble donc pas pouvoir être utilisée comme seul critère de prédiction du déclenchement de la production de pristinamycines et de l'estimation de la concentration produite.

VI.4.3. Impact des contraintes hydrodynamiques sur la production

Les résultats du paragraphe V.3.4.2 ont montré que la concentration en pristinamycines diminuait à forte dissipation volumique. L'hypothèse apportée était des dommages cellulaires issus des contraintes turbulentes. Il est donc intéressant de relier cette concentration aux contraintes hydrodynamiques rencontrées par les cellules (Figure VI-17).

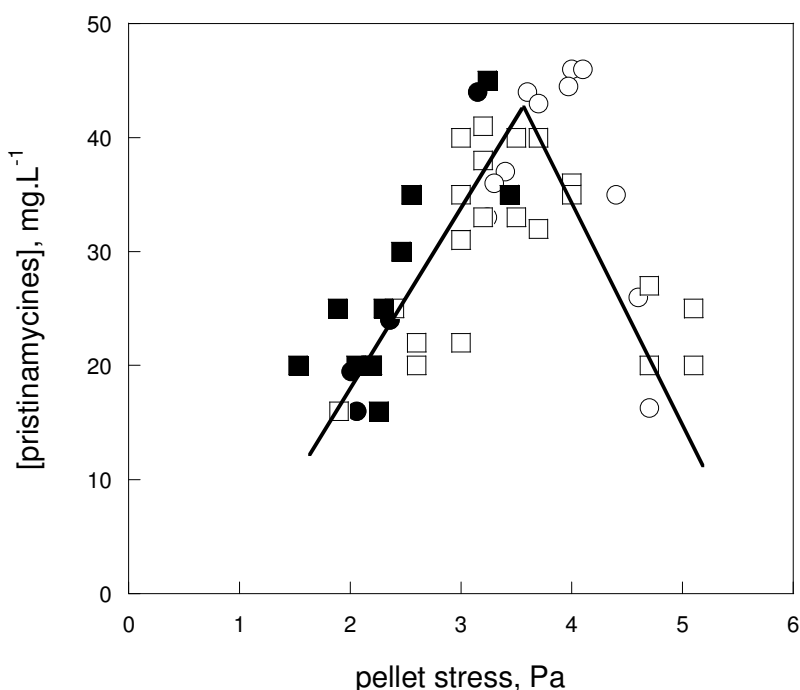


Figure VI-17. Prédiction de la relation liant la concentration en pristinamycines et la contrainte s'exerçant sur la pelote. Résultats donnés pour *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 (□, ■) et pr11 (○, ●). Pour les expériences avec symboles pleins, les contraintes sont calculées à partir de mesures expérimentales du diamètre. Pour les expériences avec symboles vides, les contraintes sont calculées à partir des diamètres extrapolés par les relations (VI-14) et (VI-15).

Ces résultats montrent globalement que:

- Compte-tenu des erreurs et des hypothèses réalisées, la corrélation entre la concentration en pristinamycines et la contrainte particulaire est tout à fait satisfaisante. A noter que cette corrélation se généralise assez bien aux différentes tailles de fioles et aux deux souches étudiées.
- Le passage d'une augmentation à une diminution de la quantité produite apparaît lorsque les contraintes particulières dépassent environ 3,5 Pa, et ce pour les deux souches. Ainsi, l'existence d'une contrainte seuil est mise en évidence avec les hypothèses réalisées. Il conviendra néanmoins de rester prudent, les diamètres des pelotes étant extrapolés, et non mesurés, pour les 6 expériences indiquant une baisse de la production à partir de contraintes d'environ 5 Pa. Pour celles-ci, une surestimation du diamètre par la loi d'extrapolation peut conduire à un alignement de ces expériences avec toutes les autres et donc également à l'absence de contrainte "limite".

VI.5. Conclusion

La réponse physiologique globale des deux souches semble dépendre fortement de la surface externe et donc du diamètre de la pelote. Le diamètre des pelotes est une fonction double de la dissipation volumique (pour l'érosion et la rupture) et de l'oxygénation ($k_L a$ ou DOC). Il est désormais possible d'identifier les couplages directs ou indirects dans le système de culture étudié (Table VI-4).

Dans ce chapitre, les influences respectives de la dissipation volumique et du transfert d'oxygène gaz-liquide sur la concentration de biomasse, la consommation de substrats, le diamètre des pelotes ainsi que sur la production des pristinamycines ont été étudiées chez 2 souches de *S. pristinaespiralis*. Il a été mis en évidence que la concentration maximale en biomasse et le déclenchement de la production d'antibiotiques pouvaient être liés au transfert d'oxygène gaz-liquide, indépendamment de la puissance dissipée volumique. Dans tous les cas, une limitation supplémentaire en azote s'est avérée nécessaire au déclenchement de cette production. A l'inverse, on a constaté que les concentrations d'antibiotiques et le diamètre des pelotes sont fortement corrélés à la puissance dissipée volumique indépendamment du coefficient de transfert d'oxygène gaz-liquide. De plus, les vitesses spécifiques de

consommation d'oxygène (qO_2) et la concentration des pristinamycines augmentent linéairement avec l'aire interfaciale des pelotes. Cela semblerait indiquer que seule la périphérie des pelotes est impliquée dans la production d'antibiotiques tandis que le corps interne des pelotes ne participe pas à la production des pristinamycines. Cette hypothèse est confortée par les résultats du chapitre III indiquant que la production ne se déclenche qu'en présence d'un transfert d'oxygène suffisant.

Table VI-4 Identification des couplages entre les phénomènes observés. (D) direct, (I) indirect, (*) absence. Les lignes du tableau donnent les paramètres modifiés et les colonnes les phénomènes observés.

<i>Paramètres</i>	<i>P / V</i>	<i>k_{La}</i>	<i>DOC</i>	<i>OUR</i>	<i>d_p</i>	<i>X</i>	<i>μ</i>	[pristinamycines.]
<i>P / V</i>		D	D	I	D	I	I	D
<i>k_{La}</i>	*		D	I	*	D	I	*
<i>DOC</i>	*	*		I	*	D	D	*
<i>OUR</i>	*	*	D		*	*	*	*
<i>d_p</i>	*	*	I	D		I	I	D
<i>X</i>	I (via la viscosité)	*	I	D	*		*	I

L'impact de la turbulence générée dans la fiole sur le diamètre et la croissance des pelotes ainsi que sur la production, a alors été étudié. Ainsi, il a été montré que, tout au long de la culture (excepté au début de la cinétique), les diamètres des pelotes se corrèlent parfaitement avec l'échelle de dissipation moyenne de Kolmogorov sans dépasser la taille de $4.l_k$. Néanmoins, une contribution de la phase biologique sur l'évolution des diamètres de pelotes est indéniable. Pour décrire la cinétique de la taille des pelotes, le taux maximal de croissance des pelotes R_{pmax} a été utilisé. Celui-ci semble imposé par la dissipation. Enfin, la concentration des pristinamycines s'accroît jusqu'à des contraintes particulières de 3,5 Pa puis commence à diminuer pour les deux souches; une probable détérioration des pelotes est suspectée.

CONCLUSION GENERALE

PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

Les objectifs de cette étude étaient de caractériser les couplages entre l'hydrodynamique et le transfert d'oxygène d'une part et la physiologie de *Streptomyces* d'autre part. Lors de leur culture en bioréacteur, les *Streptomyces* sont soumis à une hydrodynamique complexe qui conditionne, entre autres, les contraintes particulières, les flux de transfert de substrats (carbonés, azotés, phosphatés et oxygène) et les structures d'écoulement. Par ailleurs, les limitations ou contraintes nutritionnelles (carbone, azote ou phosphate) sont bien connues pour le déclenchement de la production des antibiotiques. De plus, les contraintes hydrodynamiques peuvent impacter potentiellement la réponse physiologique. Partant du constat de la complexité combinée de l'hydrodynamique rencontrée dans les bioréacteurs et de la réponse cellulaire, nous avons développé une approche pluridisciplinaire et multiéchelle à l'interface entre génie des procédés et physiologie quantitative. Ce type d'approche intégrative se démarque ainsi de la grande majorité des études de la littérature.

Dans un premier temps, les grandeurs macroscopiques de l'hydrodynamique des flacons agités lisses ont été caractérisées en termes de dissipation volumique, de coefficient volumique de transfert gaz-liquide, de rhéologie, d'échelles de dissipation et de contraintes hydrodynamiques. Dans un second temps, la réponse physiologique de cultures de *S. pristinaespiralis* a été décrite en termes de cinétiques de croissance, de consommations de substrats (dont l'oxygène), de production d'antibiotiques et de diamètre de pelotes. Enfin, grâce au développement d'une approche permettant le découplage de la dissipation volumique et du transfert d'oxygène, nous avons pu apporter des connaissances originales sur les couplages hydro-biologiques précédemment identifiés.

Parmi les résultats obtenus lors de nos travaux, nous avons résumé ci-dessous ceux qui méritent le plus d'attention.

Description de l'hydrodynamique des fioles agitées

- La **rhéologie** des suspensions de *S. pristinaespiralis* pr11 et DSMZ 40338 ne présentent un comportement non-Newtonien que pour des concentrations en biomasse

supérieures à 14 g.L^{-1} . Néanmoins, dans la gamme de cisaillements escomptés dans nos systèmes de culture ($> 100 \text{ s}^{-1}$), les rhéogrammes obtenus indiquent un **plateau Newtonien** pour ces concentrations.

- De manière originale, une approche **CFD-VOF** a été utilisée pour caractériser l'hydrodynamique en fioles agitées (calcul d'une **viscosité équivalente** dans le cas d'un comportement non-Newtonien et des dissipations volumiques). La dissipation volumique calculée a été validée par des mesures expérimentales et des corrélations semi-empiriques. Un **très bon accord** a été obtenu entre ces différentes approches. Les viscosités équivalentes obtenues restent par ailleurs du même ordre de grandeur que celle de l'eau.
- La puissance dissipée volumique (P / V) et le coefficient de transfert d'oxygène ($k_L a$) sont généralement reliés en bioréacteur, il est donc difficile d'attribuer une réponse physiologique spécifiquement au transfert d'oxygène ou à P / V , sans **découpler** ces deux grandeurs. Cependant, par la modification du diamètre de la table d'agitation, nous sommes parvenus à imposer des **conditions variables de $k_L a$ sans modifier la dissipation volumique**.
- Enfin, la turbulence dans les fioles agitées a été décrite par utilisation de la théorie de Kolmogorov. Ceci nous a permis de calculer les échelles de dissipation et les contraintes hydrodynamiques s'appliquant sur les pelotes microbiennes.

Couplages hydro / biologiques

A. Diamètre de pelotes

- Le **taux de croissance maximal** des pelotes R_{pmax} a été corrélé avec la dissipation volumique. Nos résultats montrent qu'une augmentation de la dissipation défavorise la vitesse de croissance des pelotes. Par exemple, pour *S. pristinaespiralis* pr11, la corrélation suivante a été établie :

$$R_{p \max} = 3,6 \left(\frac{P}{V} \right)^{-0,6}$$

- Sur la base de la théorie de Kolmogorov de la turbulence, un modèle de rupture des pelotes microbiennes a été appliqué. Les résultats escomptés de ce modèle ont été parfaitement validés par les mesures expérimentales. En effet, **les diamètres des**

pelotes sont proportionnels à l'échelle de dissipation moyenne de Kolmogorov $\langle l_k \rangle$ pour toutes les conditions étudiées (souches, agitation). Leur taille reste principalement comprise entre $\langle l_k \rangle$ et $4 \cdot \langle l_k \rangle$, ce qui montre que les pelotes sont transportées dans **la zone inertielle de turbulence**. Des corrélations semi-empiriques originales pour les *Streptomyces* reliant d_p à l_K sont ainsi déduites pour les deux souches.

B. Croissance et consommations

- Nos résultats montrent que la concentration en biomasse maximale augmente avec le $k_L a$, indépendamment de la dissipation volumique mais non linéairement. Ces résultats indiquent que, pour les deux souches étudiées, une **limitation du transfert d'oxygène** est observée dans nos systèmes. Cette limitation est soit issue du transfert gaz-liquide surfacique (pour la souche pr11), soit suspectée au niveau de la pelote (pour les deux souches étudiées). Cette production accrue de biomasse favorise les consommations globales de substrats et donc **des limitations nutritionnelles plus précoces**.
- Les vitesses spécifiques maximales de croissance, la **consommation d'oxygène** et de **glutamate** augmentent avec la puissance dissipée tandis que l'influence est moins marquée avec les vitesses spécifiques de consommation du glucose, de l'arginine, des ions ammonium et du phosphate.

C. Déclenchement de la production

- Notre étude révèle, pour la première fois, que la limitation nutritionnelle, en particulier ici en substrats azotés, n'est pas suffisante pour déclencher la production de pristinamycines. Celle-ci doit en effet être accompagnée d'un **apport en oxygène suffisant**. De plus, une **consommation accrue d'oxygène** est observée lors de la production des pristinamycines.
- Des valeurs seuils similaires de dissipation volumique et de $k_L a$ ont été obtenues pour la **prédiction du déclenchement** de la production pour les deux souches étudiées. Ceci valide l'utilisation de ces grandeurs macroscopiques comme **critères d'extrapolation** en fioles agitées.

D. Concentrations en antibiotiques

- Lorsqu'il y a production des pristinamycines, des corrélations non rapportées dans la littérature, entre la dissipation et la concentration de pristinamycines ont été établies dans le cadre de cette étude. Ainsi, dans un premier temps, une phase pour laquelle la concentration des pristinamycines augmente avec la dissipation est observée. Nos résultats montrent que c'est spécifiquement l'augmentation de l'aire interfaciale aux fortes dissipations qui favorise la quantité de pristinamycines. Cela semble indiquer que seules les cellules proches de la surface sont actives pour la production et que le ratio cellules actives/inactives augmente avec l'aire interfaciale.
- Lorsqu'il y a production des pristinamycines, et après une phase intermédiaire pour laquelle la concentration en pristinamycines reste indépendante de la dissipation et maximale, on note une diminution rapide de cette concentration aux plus fortes dissipations. Le couplage de ces résultats avec les calculs de contraintes particulières montrent que, pour les deux souches, cette diminution apparaît pour des contraintes supérieures à 3,5 Pa. Des dommages cellulaires et des déstructurations des pelotes microbiennes sont fortement suspectées.

Notre étude présente un certain nombre d'avancées significatives sur la compréhension de l'influence respective de l'agitation et de l'aération sur la réponse physiologique de cultures de *S. pristinaespiralis* en fioles agitées. Même si, pour la plupart de ces résultats, les données recueillies nous ont permis de conclure sans ambiguïté, certaines des hypothèses réalisées mériteraient probablement des expériences complémentaires. Nous proposons ainsi ci-dessous un certain nombre de perspectives de recherche à cette étude.

PERSPECTIVES

Pour confirmer certaines de nos hypothèses, des manipulations supplémentaires seraient à réaliser. Ainsi, dans certaines conditions, la mesure expérimentale des diamètres de pelotes n'a pas été effectuée. Il s'agit notamment des cultures réalisées dans des fioles agitées d'un volume total autre que 250 mL. Ces mesures nous permettraient de valider les corrélations entre le diamètre des pelotes et l'échelle de Kolmogorov que nous avons établies pour chaque souche. De même, un lien fort entre la concentration en pristinamycines produites et les contraintes particulières est suspecté. Une valeur limite de contrainte a pu être définie, au-delà de laquelle en concentration en pristinamycines déclinerait. L'existence de cette valeur limite devra être vérifiée expérimentalement en se plaçant dans des conditions de culture permettant d'atteindre ces hauts niveaux de contrainte particulière.

Plusieurs perspectives de ce travail portent sur la forme morphologique prédominante dans les cultures réalisées, les pelotes. En effet, certaines des réponses physiologiques mesurées ont été corrélées aux variations du diamètre maximum des pelotes et de l'aire interfaciale de celles-ci. Nous avons fait l'hypothèse que ces modifications avaient pour conséquence la modification du rapport entre la biomasse métaboliquement active, située à la périphérie des pelotes et la biomasse totale. Il va de soi que cette hypothèse devra être vérifiée expérimentalement. Ceci pourrait être réalisé en observant par microscopie confocale les pelotes bactériennes après marquage avec des marqueurs vitaux. Des travaux similaires ont déjà été réalisés chez d'autres espèces de *Streptomyces* et devraient donc pouvoir être facilement extrapolables à *S. pristinaespiralis*.

Une autre interrogation concernant les pelotes est l'évolution du nombre de pelotes ou de leur densité au cours du procédé de production de pristinamycines. Toutes les vitesses spécifiques mesurées au cours de ce travail ont été ramenées, classiquement, à une quantité totale en biomasse en tenant donc compte d'une partie de biomasse qui n'est sans doute pas métaboliquement active. Ramener les vitesses spécifiques, non plus à une quantité de biomasse, mais à une pelote pourrait nous donner une indication peut être plus précise du métabolisme au sein de ces structures et donc sur la proportion de cellules actives.

Nous avons émis l'hypothèse que chez les deux souches étudiées, le transfert d'oxygène entre la couche limite et la pelote ou intra-pelote pouvait être limitant. A ce jour, nous ne connaissons pas la valeur de la diffusivité de l'oxygène au sein des pelotes. Or la connaissance de cette donnée nous permettrait, de renseigner les modèles et ainsi de pouvoir simuler plus précisément l'évolution du gradient en oxygène au sein de ces structures. Une mesure expérimentale de la concentration en oxygène au sein des pelotes serait également particulièrement intéressante. Cette approche a déjà été développée pour des pelotes des champignons. Malheureusement, les capteurs permettant ce genre de mesure n'ont pas encore été suffisamment miniaturisés pour pouvoir réaliser le même travail sur les pelotes, plus petites, des *Streptomyces*.

Au cours de cette étude, l'influence de la puissance dissipée volumique a été étudiée à l'échelle macroscopique sur les cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production des pristinamycines. Des modifications à l'échelle du métabolisme cellulaire peuvent également être envisagées. Pour vérifier cette hypothèse, il apparaît très intéressant de mesurer les activités des enzymes de certaines voies métaboliques impliquées dans la consommation des différents substrats mais aussi dans la voie de biosynthèse des pristinamycines. Une relation éventuelle entre niveau d'activités enzymatiques et dissipation pourrait ainsi être mise en évidence. L'existence d'une telle relation serait une explication supplémentaire, ou autre, que la modification de la proportion de cellules actives au sein des pelotes, à la variation des vitesses spécifiques qui a été observée au cours de ce travail.

Un des apports de ce travail est l'établissement de diagrammes de production qui permettent de prédire les conditions hydrodynamiques auxquelles la production de pristinamycines peut avoir lieu en fioles lisses. Ces diagrammes ne s'appliquent qu'à *S. pristinaespiralis*, pour la production de pristinamycines. Il serait intéressant de tester ces diagrammes pour d'autres micro-organismes et d'autres antibiotiques. Des résultats très préliminaires, menés il y a quelques années au sein de notre laboratoire laissent penser que la production de certains antibiotiques par *S. ambofaciens* pourrait être soumise aux mêmes phénomènes.

La culture en fioles agitées ne nous a pas permis d'explorer les conséquences physiologiques de certaines conditions hydrodynamiques notamment celles sous forte oxygénation et faible dissipation. De telles conditions nous permettraient de préciser si c'est bien un couple (k_{La} ; P / V) qui doit être appliqué ou bien si, comme nous l'avons parfois supposé, une valeur de k_{La} supérieure à environ 100 h^{-1} était une condition suffisante pour

déclencher la production de pristinamycines. De telles conditions de dissipation ne pourront pas être atteintes en fioles agitées. Pour les obtenir, il faut envisager l'utilisation d'autres types de réacteurs comme les air-lifts.

Enfin, à l'issue de ce travail, nous avons une vision plus précise des mécanismes régissant le déclenchement de la production des pristinamycines et de leur niveau d'accumulation mais uniquement dans un système de culture simple, la fiole lisse de type Erlenmeyer. A l'échelle industrielle, les antibiotiques sont produits dans des réacteurs agités mécaniquement. Une extrapolation de l'approche qui a été suivie ici serait donc particulièrement intéressante. Mais elle serait également beaucoup plus ardue en raison de la complexité des écoulements retrouvés dans ce type de système de culture.

REFERENCES

Références

Références

- Abbas AS, Edwards C. 1990. Effects of metals on *Streptomyces coelicolor* growth and actinorhodin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(3):675-680.
- Abdel-Hamid ME, Phillips OA. 2003. LC-MS/MS determination of Synercid[®] injections. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 32(6):1167-1174.
- Abou Zeid AZ. 1972. Production of cycloheximide by *Streptomyces* sp. *Acta microbiologica Polonica. Series B: Microbiologia applicata* 4(2):83-88.
- Abou-Zeid AA, El-Diwany AI, Shaker HM, Salem HM. 1981. Role of nitrogen sources in fermentative production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus* 93060. *Agricultural Wastes* 3(4):257-265.
- Abou-Zeid AZA, Baeshin NA. 1992. Utilization of date seed lipid and hydrolysate in the fermentative formation of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *Bioresour. Technol.* 41(1):41-43.
- Aharonowitz Y, Demain AL. 1977. Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Arch. Microbiol.* 115(2):169-173.
- Aharonowitz Y, Demain AL. 1978. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14(2):159-164.
- Aharonowitz Y, Demain AL. 1979. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.* 25(1):61-67.
- Aharonowitz Y, Friedrich CG. 1980. Alanine dehydrogenase of the β -lactam antibiotic producer *Streptomyces clavuligerus*. *Arch. Microbiol.* 125(1-2):137-142.
- Aharonowitz Y. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:209-233.
- Aït-Kadi A, Marchal P, Choplin L, Chrissemant AS, Bousmina M. 2002. Quantitative analysis of mixer-type rheometers using the couette analogy. *Can. J. Chem. Eng.* 80(6):1166-1174.
- Amanullah A, Justen P, Davies A, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.* 5(2):109-114.
- Anderlei T, Büchs J. 2001. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem. Eng. J.* 7(2):157-162.
- Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J. 2004. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem. Eng. J.* 17(3):187-194.
- Arias P, Fernandez-Moreno MA, Malpartida F. 1999. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *J. Bacteriol.* 181(22):6958-6968.
- Ascanio G, Castro B, Galindo E. 2004. Measurement of power consumption in stirred vessels-a review. *Chem. Eng. Res. Des.* 82(9): 1282-1290.
- Ashy MA, Abou-Zeid AA, El-Diwany AI, Gad MR. 1982. Fermentative production of spiramycins. *Enzyme Microb. Technol.* 4(1):20-24.
- Atkinson DE, Walton GM. 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J. Biol. Chem.* 242(13):3239-3241.

- Auro M, Hodge H, Roth N. 1957. Oxygen absorption rates in shaken flasks. *Ind. Eng. Chem.* 49(8):1237.
- Ayazi Shamlou P, Makagiansar HY, Ison AP, Lilly MD, Thomas CR. 1994. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 49(16):2621-2631.
- Ayazi Shamlou P, Makagiansar HY, Ison AP, Lilly MD, Thomas CR. 1994. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 49(16):2621-2631.
- Badino AC, Facciotti MCR, Schmidell W. 2001. Volumetric oxygen transfer coefficients (k_La) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. *Biochem. Eng. J.* 8(2):111-119.
- Bamas-Jacques N, Lorenzon S, Lacroix P, De Swetschin C, Crouzet J. 1999. Cluster organization of the genes of *Streptomyces pristinaespiralis* involved in pristinamycin biosynthesis and resistance elucidated by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.* 87(6):939-948.
- Bandyopadhyay SK, Majumdar SK. 1974. Regulation of the formation of alkaline phosphatase during neomycin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5(4):431-434.
- Barbouche N. 2008. Réponse biologique de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques: simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire. PhD thesis. Nancy-Université, Nancy, France.
- Barriere JC, Berthaud N, Beyer D, Dutka-Malen S, Paris JM, Desnottes JF. 1998. Recent developments in streptogramin research. *Curr. Pharm. Des.* 4(2):155-180.
- Basak K, Majumdar SK. 1973. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4(1):6-10.
- Basak K, Majumdar SK. 1975. Mineral nutrition of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8(4):391-395.
- Bêhal V, Neuzil J, Hostalek Z. 1983. Effect of tetracycline derivatives and some cations on the activity of anhydrotetracycline oxygenase. *Biotechnol. Lett.* 5(8):537-542.
- Bêhal V. 2002. Antibiotics. *Biotechnol. Ann. Rev.* (8) 227-265.
- Behrmann I, Hillemann D, Puhler A, Strauch E, Wohlleben W. 1990. Overexpression of a *Streptomyces viridochromogenes* gene (*glnII*) encoding a glutamine synthetase similar to those of eucaryotes confers resistance against the antibiotic phosphinothricyl-alanyl-alanine. *J. Bacteriol.* 172(9):5326-5334.
- Bellgardt KH. 1998. Process models for production of beta-lactam antibiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 60:153-194.
- Belmar-Beiny MT, Thomas CR. 1991. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: Effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 37(5):456-462.
- Belousova II, Lishnevskaja EB, Elgart RE, Tereshin IM. 1970. Comparative study of synthesis of levorin and fatty acids by the mycelium of *Actinomyces levoris* Krass 26-I during its growth in native solutions of different times of fermentation. *Antibiotiki.* 15(9):779-782.

Références

- Berdy J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J Antibiot* 58(1):1-26.
- Bhatnagar RK, Doull JL, Vining LC. 1988. Role of the carbon source in regulating chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae*: studies in batch and continuous cultures. *Can. J. Microbiol.* 34(11):1217-1223.
- Bhatnagar RK, Doull JL, Vining LC. 1988. Role of the carbon source in regulating chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae*: studies in batch and continuous cultures. *Can. J. Microbiol.* 34(11):1217-1223.
- Bhattacharyya BK, Pal SC, Sen SK. 1998. Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1.5. Cultural effect. *Rev. Microbiol.* 29(3):167-169.
- Bhattacharyya BK, Sen SK. 2002. Ester antibiotic accumulation by *Streptomyces hygroscopicus*. *New Microbiol.* 25(4):477-484.
- Bibb MJ. 2005. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* 8(2):208-215.
- Biffi G, Boretti G, Di Marco A, Pennella P. 1954. Metabolic behavior and chlortetracycline production by *Streptomyces aureofaciens* in liquid culture. *Appl. Microbiol.* 2(5):288-293.
- Biffi G, Boretti G, Di Marco A, Pennella P. 1954. Metabolic behavior and chlortetracycline production by *Streptomyces aureofaciens* in liquid culture. *Appl. Microbiol.* 2(5):288-293.
- Bouyer D, Coufort C, Line A, Do-Quang Z. 2005. Experimental analysis of floc size distributions in a 1-L jar under different hydrodynamics and physicochemical conditions. *J. Colloid Interface Sci.* 292(2):413-428.
- Brana AF, Demain AL. 1988. Nitrogen control of antibiotic biosynthesis in actinomycetes. *Nitrogen Source Control of Microbial Processes*: Edited by S. Sanchez-Esquivel. Boca Raton, FL: CRC Press. p 99-119.
- Brana AF, Paiva N, Demain AL. 1986. Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Gen. Microbiol.* 132(5):1305-1317.
- Brana AF, Wolfe S, Demain AL. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.* 31(8):736-743.
- Braun S, Vecht-Lifshitz SE. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends Biotechnol.* 9(2):63-68.
- Brown DD, Hitchcock MJM, Katz E. 1980. Evidence for a constitutive and inducible form of kynurenine formamidase in an actinomycin-producing strain of *Streptomyces parvulus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 202(1):18-22.
- Bruss ML (1997). Lipids and ketones. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds) *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th edn. Academic, London, pp 83–113.
- Büchs J, Lotter S, Milbradt C. 2001. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 7(2):135-141.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol. Bioeng.* 68(6):589-593.
- Büchs J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem. Eng. J.* 7(2):91-98.

Références

- Bulchandani BD, Parvateesam M. 2007. Antibiotic production by *Streptomyces* sp. and influence of various C and N sources on its production. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* 9(1):123-128.
- Byrne KM, Greenstein M. 1986. Nitrogen repression of gilvocarcin V production in *Streptomyces arenae* 2064. *J. Antibiot.* 39(4):594-599.
- Bystrykh LV, Fernandez-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA, Dijkhuizen L. 1996. Production of actinorhodin-related blue pigments by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.* 178(8):2238-2244.
- Cai P, Kong F, Fink P, Ruppen ME, Williamson RT, Keiko T. 2007. Polyene antibiotics from *Streptomyces mediocidicus*. *J. Nat. Prod.* 70(2):215-219.
- Castro JM, Liras P, Cortes J, Martín JF. 1985. Regulation of α -aminoadipyl-cysteinylyl-valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in *Streptomyces lactamdurans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22(1):32-40.
- Charles M. 1985. Fermentation design and scale-up. In: Moo-Young M (ed) *Comprehensive biotechnology*, vol. 2. Pergamon Press, Oxford. p 57-75.
- Chatterjee S, Vining LC, Westlake DWS. 1983. Nutritional requirements for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. *Can. J. Microbiol.* 29(2):247-253.
- Chattopadhyay D, Sen SK. 1997. Optimisation of cultural conditions for antifungal antibiotic accumulation by *Streptomyces rochei* G164. *Hindustan Antibiot. Bull.* 39(1-4):64-71.
- Chen C, Si S, He Q, Xu H, Lu M, Xie Y, Wang Y, Chen R. 2008. Isolation and characterization of antibiotic NC0604, a new analogue of bleomycin. *J. Antibiot.* 61(12):747-751.
- Chen HC, Wilde F. 1991. The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 37(6):591-595.
- Chen K-C, Lin Y-H, Wu J-Y, Hwang S-CJ. 2003. Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. *Enzyme Microb. Technol.* 32(1):152-156.
- Chen Y, Krol J, Sterkin V, Fan W, Yan X, Huang W, Cino J, Julien C. 1999. New process control strategy used in a rapamycin fermentation. *Process Biochem.* 34(4):383-389.
- Cheng YR, Hauck L, Demain AL. 1995. Phosphate, ammonium, magnesium and iron nutrition of *Streptomyces hygroscopicus* with respect to rapamycin biosynthesis. *J. Ind. Microbiol.* 14(5):424-427.
- Chipeva V, Dumanova E, Todorov T, Ivanova I. 1991. Impact of nitrogen assimilation on regulation of antibiotic production in *Streptomyces hygroscopicus* 155. *Antibiotiki i Khimioterapiya* 36(3):5-8.
- Choi D, Choi OY, Shin HJ, Chung DO, Shin DY. 2007. Tylosin production by *Streptomyces fradiae* using raw cornmeal in airlift bioreactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(7):1071-1078.
- Choi DB, Park EY, Okabe M. 2000. Dependence of apparent viscosity on mycelial morphology of *Streptomyces fradiae* culture in various nitrogen sources. *Biotechnol. Prog.* 16(4):525-532.

Références

- Cimburkova E, Zima J, Novak J, Vanek Z. 1988. Nitrogen regulation of avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* in a chemically defined medium. J. Basic Microbiol. 28(8):491-499.
- Clark GJ, Langley D, Bushell ME. 1995. Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: Investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. Microbiology 141(3):663-669.
- Clark MM, Flora JRV. 1991. Floc restructuring in varied turbulent mixing. J. Colloid Interface Sci. 147(2):407-421.
- Cocito C. 1979. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. Microbiol. Rev. 43(2):145-198.
- Corvini PFX, Delaunay S, Maujean F, Rondags E, Vivier H, Goergen JL, Germain P. 2004. Intracellular pH of *Streptomyces pristinaespiralis* is correlated to the sequential use of carbon sources during the pristinamycins-producing process. Enzyme Microb. Technol. 34(2):101-107.
- Corvini PFX, Gautier H, Rondags E, Vivier H, Goergen JL, Germain P. 2000. Intracellular pH determination of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* by image analysis. Microbiology 146(10):2671-2678.
- Corvini PFX. 2000. Etude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines : Activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du pH intracellulaire. PhD thesis, Nancy-University. Nancy, France.
- Coufort C, Bouyer D, Line A. 2005. Flocculation related to local hydrodynamics in a Taylor-Couette reactor and in a jar. Chem. Eng. Sci. 60(8-9 SPEC. ISS.):2179-2192.
- Cruz R, Arias ME, Soliveri J. 1999. Nutritional requirements for the production of pyrazoloisoquinolinone antibiotics by *Streptomyces griseocarneus* NCIMB 40447. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53(1):115-119.
- Cui YQ, Van Der Lans RGJM, Luyben KCAM. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. Biotechnol. Bioeng. 55(5):715-726.
- Cui YQ, Van der Lans RGJM, Luyben KCAM. 1998. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. Biotechnol. Bioeng. 57(4):409-419.
- Curdova E, Jechova V, Zima J, Vanek Z. 1989. The effect of inorganic phosphate on the production of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. J. Basic Microbiol. 29(6):341-346.
- Deeble VJ, Lindley HK, Fazell MR, Cove JH, Baumberg S. 1995. Depression of streptomycin production by *Streptomyces griseus* at elevated growth temperature: Studies using gene fusions. Microbiology 141(10):2511-2518.
- Deianova OA, Vinogradova KA, Polin AN. 1988. Kinetic aspects of the relation of the growth of the producer and the biosynthesis of heliomycin depending on the carbon source in the medium. Antibiot. Khimioter. 33(4):253-257.
- Dekleva ML, Titus JE, Strohl WR. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. Can. J. Microbiol. 31(3):287-294.

Références

- Delafosse A, Morchain J, Guiraud P, Line A. 2009. Trailing vortices generated by a Rushton turbine: Assessment of URANS and large Eddy simulations. *Chem. Eng. Res. Des.* 87(4):401-411.
- Demain AL, Aharonowitz Y, Martin JF. 1983. Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. In: Vining, Editor. *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*. London: Addison-Wesley. P.49-72.
- Demain AL, Inamine E. 1970. Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (α -D-mannosidase) formation. *Bacteriol. Rev.* 34(1):1-19.
- Demain AL. 1989. Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes. Shapiro S Ed. Boca Raton F, editor: CRC Press. p 127-134.
- Demain AL. 2009. Antibiotics: Natural products essential to human health. *Med. Res. Rev.* 29(6):821-842.
- Deutscher J. 2008. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 11(2):87-93.
- D'Huys PJ, Lule I, Van Hove S, Vercammen D, Wouters C, Bernaerts K, Anne J, Van Impe JFM. 2010. Amino acid uptake profiling of wild type and recombinant *Streptomyces lividans* TK24 batch fermentations. *J. Biotechnol.* Article in press.
- Dick O, Onken U, Sattler I, Zeeck A. 1994. Influence of increased dissolved oxygen concentration on productivity and selectivity in cultures of a colabomycin-producing strain of *Streptomyces griseoflavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41(4):373-377.
- Dion WM, Calrilli A, Sermonti G, Chain EB. 1954. The effect of mechanical agitation on the morphology of *Penicillium chrysogenum* in stirred fermenters. *Istituto Superiore di Sanita (Eng.E.)* 17:187-205.
- Dobson LF, O'Cleirigh CC, O'Shea DG. 2008. The influence of morphology on geldanamycin production in submerged fermentations of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79(5):859-866.
- Douaire M. 2010. Etude expérimentale et numérique de la réponse de *Lactococcus Lacits* NCDO2118 aux conditions hydrodynamiques locales en réacteur Couette. PhD Thesis. INSA, Toulouse, France.
- Doull JL, Vining LC. 1989. Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* 65(3):265-268.
- Doull JL, Vining LC. 1990. Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): Suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32(4):449-454.
- Drouin JF, Louvel L, Vanhoutte B, Vivier H, Pons MN, Germain P. 1997. Quantitative characterization of cellular differentiation of *Streptomyces ambofaciens* in submerged culture by image analysis. *Biotechnol. Tech.* 11(11):819-824.
- Dulaney EL. 1948. Observations on *Streptomyces griseus*: II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. *J. Bacteriol.* 56(3):305-13.
- Dunstan GH, Avignone-Rossa C, Langley D, Bushell ME. 2000. The Vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen-limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC

Références

- 19795) cultures that do not produce antibiotic. *Enzyme Microb. Technol.* 27(7):502-510.
- Efthimiou G, Thumser AE, Avignone-Rossa CA. 2008. A novel finding that *Streptomyces clavuligerus* can produce the antibiotic clavulanic acid using olive oil as a sole carbon source. *J. Appl. Microbiol.* 105(6):2058-2064.
- El-Enshasy HA, Farid MA, El-Sayed ESA. 2000. Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J. Basic Microbiol.* 40(5-6):333-342.
- Elibol M, Mavituna F. 1995. Effect of perfluorodecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(2):206-210.
- Elibol M, Mavituna F. 1997. Effect of sucrose on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Process Biochem.* 33(3):307-311.
- Elibol M, Mavituna F. 1998. A remedy to oxygen limitation problem in antibiotic production: Addition of perfluorocarbon. *Biochem. Eng. J.* 3(1):1-7.
- Elibol M, Ulgen K, Kamaruddin K, Mavituna F. 1995. Effect of inoculum type on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biotechnol. Lett.* 17(6):579-582.
- Elibol M. 2002. Product shifting by controlling medium pH in immobilised *Streptomyces coelicolor* A3(2) culture. *Process Biochem.* 37(12):1381-1386.
- El-Shirbmy SA, Ghaly MF, El-Ayoty YM, Fleafil NS. 2007. Niromycin A: An antialgal substance produced by *Streptomyces endus* N40. *Res. J. Microbiol.* 2(8):606-618.
- Emerson S. 1950. The growth phase in *Neurospora* corresponding to the logarithmic phase in unicellular organisms. *J. Bacteriol.* 60(3):221-223.
- Erban V, Novotna J, Běhal V, Hostalek Z. 1983. Growth rate, sugar consumption, chlortetracycline production and anhydrotetracycline oxygenase activity in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol.* 28(4):262-267.
- Escalante L, Lopez H, Del Carmen R. 1982. Transient repression of erythromycin formation in *Streptomyces erythraeus*. *J. Gen. Microbiol.* 128(9):2011-2015.
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E, Sanchez S. 1999. Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52(4):572-578.
- Farid MA, El-Enshasy HA, El-Diwany AI, El-Sayed ESA. 2000. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J. Basic Microbiol.* 40(3):157-166.
- Fazeli MR, Cove JH, Baumberg S. 1995. Physiological factors affecting streptomycin production by *Streptomyces griseus* ATCC 12475 in batch and continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 126(1):55-61.
- Feren CJ, Squires RW. 1969. The relationship between critical oxygen level and antibiotic synthesis of capreomycin and cephalosporin C. *Biotechnol. Bioeng.* 11(4):583-592.
- Flores ME, Sanchez S. 1985. Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythraeus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 26(2):191-194.

Références

- Folcher M, Gaillard H, Nguyen LT, Nguyen KT, Lacroix P, Bamas-Jacques N, Rinkel M, Thompson CJ. 2001. Pleiotropic functions of a *streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 276(47):44297-44306.
- Fourati-Ben Fguira L, Fotso S, Ben Ameer-Mehdi R, Mellouli L, Laatsch H. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Res. Microbiol.* 156(3):341-347.
- Galindo E, Flores C, Larralde-Corona P, Corkidi-Blanco G, Rocha-Valadez JA, Serrano-Carreón L. 2004. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochem. Eng. J.* 18(1):1-8.
- Gallo M, Katz E. 1972. Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.* 109(2):659-667.
- Gao H, Liu M, Liu J, Dai H, Zhou X, Liu X, Zhuo Y, Zhang W, Zhang L. 2009. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 100(17):4012-4016.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.* 27(2):153-176.
- Garner HR, Koffler H, Tetrault PA, Fahmy M, Mallett MV, Faust RA, Phillips RL, Bohonos N. 1953. Factors affecting streptomycin yield. *Am. J. Bot.* 40(5):289-296.
- Gersch D, Skurk A, Römer W. 1979. Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Streptomyces hygroscopicus* and its reversal by cyclic AMP. *Arch. Microbiol.* 121(1):91-96.
- Gersch D, Strunk C. 1980. Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate as "first messenger" in *Streptomyces hygroscopicus* - Bimodal regulation of germination and growth. *Curr. Microbiol.* 4(5):271-275.
- Gerson DF, Kole MM. 2001. Quantitative measurements of mixing intensity in shake-flasks and stirred tank reactors: Use of the Mixmeter, a mixing process analyzer. *Biochem. Eng. J.* 7(2):153-156.
- Gesheva V, Ivanova V, Gesheva R. 2005. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.* 160(3):243-248.
- Ghonaim SA, Khalil AM, Abou-Zeid AA, El-Diwany AI. 1980. Factors affecting fermentative production of magnamycin by *Streptomyces halsted* II. *Agricultural Wastes* 2(1):31-36.
- Glazebrook MA, Vining LC, White RL. 1992. Growth morphology of *Streptomyces akiyoshiensis* in submerged culture: Influence of pH, inoculum, and nutrients. *Can. J. Microbiol.* 38(2):98-103.
- Görke B, Stülke J. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(8):613-624.
- Gouveia ER, Baptista-Neto A, Badino Jr AC, Hokka CO. 2001. Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Lett.* 23(2):157-161.

Références

- Grafe U, Bocker H, Thrum H. 1977. Regulative influence of o-aminobenzoic acid on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of *Streptomyces noursei* JA 3890b. II. Regulation of glutamine synthetase and the role of glutamine synthetase/glutamate synthase pathway. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 17:201-209.
- Guimaraes LM, De Araujo Furlan RL, Garrido LM, Ventura A, Padilla G, Facciotti MCR. 2004. Effect of pH on the production of the antitumor antibiotic retamycin by *Streptomyces olindensis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40(1):107-111.
- Gunnarsson N, Bruheim P, Nielsen J. 2003. Production of the glycopeptide antibiotic A40926 by *Nonomuraea* sp. ATCC 39727: Influence of medium composition in batch fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30(3):150-156.
- Gupta A, Rao G. 2003. A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. *Biotechnol. Bioeng.* 84(3):351-358.
- Gupte MD, Kulkarni PR. 2002. A study of antifungal antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design. *Lett. Appl. Microbiol.* 35(1):22-26.
- Gupte TE, Naik SR. 1998. Optimisation of nutritional requirements and process control parameters for the production of HA-2-91, a new tetraene polyene antibiotic. *Hindustan antibiotics bulletin.* 40(1-4):5-13.
- Hall MJ, Hassall CH. 1970. Production of the monamycins, novel depsipeptide antibiotics. *Appl. Microbiol.* 19(1):109-112.
- Haque SF, Sen SK, Pal SC. 1995. Nutrient optimization for production of broad spectrum antibiotic by *Streptomyces antibioticus* SR15.4. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 42(2):155-162.
- Hassan MA, El-Naggar MY, Said WY. 2001. Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. *Egypt. J. Biol.* 3:1-10.
- He JY, Vining LC, White RL, Horton KL, Doull JL. 1995. Nutrient effects on growth and armentomycin production in cultures of *Streptomyces armentosus*. *Can. J. Microbiol.* 41(2):186-193.
- Henriksen CM, Nielsen J, Villadsen J. 1997. Influence of the dissolved oxygen concentration on the penicillin biosynthetic pathway in steady-state cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Prog.* 13(6):776-782.
- Henzler HJ, Schedel M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioprocess Eng.* 7(3):123-131.
- Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H. 2005. Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioeng.* 92(5):614-623.
- Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H. 2009. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnol. Bioeng.* 103(6):1202-1213.
- Hirt CW, Nichols BD. 1981. Volume of fluid (VOF) method for the dynamics of free boundaries. *J. Comput. Phys.* 39(1):201-225.
- Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Flett F, Oliver SG. 1990. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): Kinetics and the influence of nutrients. *J. Gen. Microbiol.* 136(11):2291-2296.

Références

- Hobbs G, Obanye AIC, Petty J, Mason JC, Barratt E, Gardner DCJ, Flett F, Smith CP, Broda P, Oliver SG. 1992. An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 174(5):1487-1494.
- Hoeksema H, Smith CG. 1961. Novobiocin. *Prog. Ind. Microbiol.* 3:91-139.
- Hohmann C, Schneider K, Bruntner C, Irran E, Nicholson G, Bull AT, Jones AL, Brown R, Stach JEM, Goodfellow M and others. 2009. Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *J. Antibiot.* 62(2):99-104.
- Hostallek Z, Tinterova M, Jechova V, Blumauerova M, Suchy J, Vanek Z. 1969. Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. I. Biosynthesis of chlortetracycline and tricarboxylic acid cycle activity. *Biotechnol. Bioeng.* 11(4):539-548.
- Huang JW, Shih HD, Huang HC, Chung WC. 2007. Effects of nutrients on production of fungichromin by *Streptomyces padanus* PMS-702 and efficacy of control of *Phytophthora infestans*. *Can. J. Plant. Pathol.* 29(3):261-267.
- Huchet F, Line A, Morchain J. 2009. Evaluation of local kinetic energy dissipation rate in the impeller stream of a Rushton turbine by time-resolved PIV. *Chem. Eng. Res. Des.* 87(4):369-376.
- Hunt G, Stieber R. 1986. Inoculum development. In: Solon AL. (ed.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington. p 32-40.
- Hurley LH, Bialek D. 1974. Regulation of antibiotic production: catabolite inhibition and the dualistic effect of glucose on indolmycin production. *J. Antibiot.* 27(1):49-56.
- Ilic SB, Konstantinovic SS, Veljkovic VB, Savic DS, Lazic ML, Gojgic-Cvijovic G. 2008. Impact of carboxymethylcellulose on morphology and antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus*. *Curr. Microbiol.* 57(1):8-11.
- Inoue OO, Netto WS, Padilla G, Facciotti MCR. 2007. Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Braz. J. Microbiol.* 38(1):58-61.
- Jakeman DL, Graham CL, Young W, Vining LC. 2006. Culture conditions improving the production of jadomycin B. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(9):767-772.
- James PDA, Edwards C, Dawson M. 1991. The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat. *J. Gen. Microbiol.* 137(7):1715-1720.
- James PDA, Edwards C. 1989. The effects of temperature on growth and production of the antibiotic granaticin by a thermotolerant streptomycete. *J. Gen. Microbiol.* 135(7):1997-2003.
- Jensen AL, Schultz JS, Shu P. 1966. Scale-up of antibiotic fermentations by control of oxygen utilization. *Biotechnol. Bioeng.* 8(4):525-537.
- Jhang J, Wolfe S, Demain AL. 1989. Phosphate regulation of ACV synthetase and cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 57(2):145-150.

Références

- Jiang H, Jiang HL, Lin R, Zheng W, Cheng YR. 2003. Effect of metal ions and phosphate salts on a lipopeptide antibiotic FW99608 biosynthesis by *Streptomyces* sp. FIM99608. *Chin. J. Antibiot.* 28(9):513-516.
- Jolles G, Terlain B, Thomas JP. 1965. Metabolic investigations on pristinamycin. *Nature* 207(4993):199-200.
- Jones GH. 1985. Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* 163(3):1215-1221.
- Jonsbu E, Christensen B, Nielsen J. 2001. Changes of in vivo fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(1-2):93-100.
- Jonsbu E, Ellingsen TE, Nielsen J. 2000. Effect of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by *Streptomyces noursei*. *J. Antibiot.* 53(12):1354-1362.
- Joshi JB, Elias CB, Patole MS. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Biochem. Eng. J.* 62(2):121-141.
- Kahar P, Kobayashi K, Iwata T, Hiraki J, Kojima M, Okabe M. 2002. Production of alpha-polylysine in an airlift bioreactor (ABR). *J. Biosci. Bioeng.* 93(3):274-280.
- Kaiser D, Onken U, Sattler I, Zeeck A. 1994. Influence of increased dissolved oxygen concentration on the formation of secondary metabolites by manumycin-producing *Streptomyces parvulus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41(3):309-312.
- Kato Y, Hiraoka S, Tada Y, Shirai S, Ue T, Koh ST, Yamaguchi T. 1995. Power consumption of horizontally shaking vessel with circulating motion. *Kagaku Kogaku Ronbunshu* 21:365-371.
- Katz E, Pienta P, Sivak A. 1958. The role of nutrition in the synthesis of actinomycin. *Appl. Microbiol.* 6(4):236-241.
- Kavitha A, Vijayalakshmi M. 2009. Influence of cultural conditions on the production of bioactive metabolites by *Streptomyces tendae* TK-VL-333. *Res. J. Biotechnol.* 4(4):56-64.
- Kelly S, Grimm LH, Bendig C, Hempel DC, Krull R. 2006. Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. *Process Biochem.* 41(10):2113-2117.
- Kelly S, Grimm LH, Bendig C, Hempel DC, Krull R. 2006. Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. *Process Biochem.* 41(10):2113-2117.
- Kelly S, Grimm LH, Hengstler J, Schultheis E, Krull R, Hempel DC. 2004. Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosystems Eng.* 26(5):315-323.
- Khaoua S, Lebrihi A, Germain P, Lefebvre G. 1991. Cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces cattleya*: Nitrogen source regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35(2):253-257.
- Kim ES, Hong HJ, Choi CY, Cohen SN. 2001. Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of afsR2 gene transcription. *J. Bacteriol.* 183(7):2198-2203.
- Kim JH, Hancock IC. 2000. Pellet forming and fragmentation in liquid culture of *Streptomyces griseus*. *Biotechnol. Lett.* 22(3):189-192.

Références

- Kimura A. 1967. Biochemical studies on *Streptomyces sioyanensis* II. Mechanism of the inhibitory effect of glucose on siomycin formation. *Agric. Biol. Chem.* 31:845-852.
- Kishimoto K, Park YS, Okabe M, Akiyama SI. 1996. Effect of ferrous ion on mildiomycin production by *Streptoverticillium rimofaciens*. *J. Antibiot.* 49(8):770-774.
- Kishimoto K, Park YS, Okabe M, Akiyama SI. 1997. Effect of ferrous ion on amino acid metabolism in mildiomycin production by *Streptoverticillium rimofaciens*. *J. Antibiot.* 50(3):206-211.
- Kojima I, Cheng YR, Mohan V, Demain AL. 1995. Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 14(6):436-439.
- Kominek LA. 1972. Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1(2):123-134.
- Kudo K, Suto T, Yoshida Y, Edo K, Ishida N. 1993. Improved production of a chromophore component of antitumor antibiotic neocarzinostatin (NCS) by addition of threonine in a chemically defined medium. *J. Ferment. Bioeng.* 75(3):223-225.
- Kumada Y, Takano E, Nagaoka K, Thompson CJ. 1990. *Streptomyces hygroscopicus* has two glutamine synthetase genes. *J. Bacteriol.* 172(9):5343-5351.
- Kurobane I, Dale PL, Vining LC. 1987. Characterization of new viridomycins and requirements for production in cultures of *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.* 40(8):1131-1139.
- Laakel M, Lebrihi A, Khaoua S, Schneider F, Lefebvre G, Germain P. 1994. A link between primary and secondary metabolism: Malonyl-CoA formation in *Streptomyces ambofaciens* growing on ammonium ions or valine. *Microbiology* 140(6):1451-1456.
- Lamsaïf D. 1992. Effects des sources d'azote sur la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Etude des enzymes impliquées dans l'assimilation des ions ammonium. PhD Thesis. Nancy-University. Nancy, France.
- Lara AR, Galindo E, Ramirez OT, Palomares LA. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors: Understanding the effects of environmental gradients on cells. *Mol. Biotechnol.* 34(3):355-381.
- Large KP, Ison AP, Williams DJ. 1998. The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biotechnol.* 63(2):111-119.
- Larpent J, Sanglier J. 1989. *Biotechnologies des antibiotiques*. Edition Masson. p 1-70.
- Lebrihi A, Germain P, Lefebvre G. 1988. Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26(2):130-135.
- Lebrihi A, Lamsaïf D, Lefebvre G, Germain P. 1992. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37(3):382-387.
- Leclercq R, Soussy CJ, Weber P, Moniot -Ville N, Dib C. 2003. In vitro activity of the pristinamycin against the isolated staphylococci in the french hospitals in 1999-2000. *Pathol. Biol.* 51(7):400-404.
- Lee H-N, Im J-H, Lee M-J, Lee SY, Kim E-S. 2009. A putative secreted solute binding protein, SCO6569 is a possible AfsR2-dependent down-regulator of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Process Biochem.* 44(3):373-377.

Références

- Lee MS, Kojima I, Demain AL. 1997. Effect of nitrogen source on biosynthesis of rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19(2):83-86.
- Lee SD, Park SW, Oh KK, Hong SI, Kim SW. 2002. Improvement for the production of clavulanic acid by mutant *Streptomyces clavuligerus*. Lett. Appl. Microbiol. 34(5):370-375.
- Lee SH, Lee KJ. 1993. Aspartate aminotransferase and tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. Appl. Environ. Microbiol. 59(3):822-827.
- Liao Y, Wei ZH, Bai L, Deng Z, Zhong JJ. 2009. Effect of fermentation temperature on validamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. J. Biotechnol. 142(3-4):271-274.
- Lin PJ, Scholz A, Krull R. 2010. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. Biochem. Eng. J. 49(2):213-220.
- Liu CM, McDaniel LE, Schaffner CP. 1974. Factors affecting the production of candicidin. Antimob.Agents Chemother. 7(2):196-202.
- Liu TJ, Xu WL, Sun WB, Zhang YZ. 2000. Effect of dissolved oxygen on mutanolysin fermentation. Chin. J. Biotechnol. 16(2):229-231.
- Lounes A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1995a. Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. Can. J. Microbiol. 41(9):800-808.
- Lounes A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1995b. Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. Curr. Microbiol. 31(5):304-311.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1996a. Effect of nitrogen/carbon ratio on the specific production rate of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. Process Biochem. 31(1):13-20.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1996b. Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effects of glucose and inorganic phosphate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45(1-2):204-211.
- Lubbe C, Demain AL, Bergman K. 1985. Use of controlled-release polymer to feed ammonium to *Streptomyces clavuligerus* cephalosporin fermentations in shake flasks. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22(6):424-427.
- Lubbe C, Demain AL, Bergman K. 1985. Use of controlled-release polymer to feed ammonium to *Streptomyces clavuligerus* cephalosporin fermentations in shake flasks. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22(6):424-427.
- Luo JM, Jin ZH, Cen PL. 2005. Effects of cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces gilvosporeus*. Journal of Zhejiang University (Engineering Science) 39(2):296-300.
- Lyui H, Nefelova MV, Zakharchuk LM. 2000. Heat shock effect on production and composition of actinomycins. Antibiotiki i Khimioterapiya 45(2):5-9.
- Magnolo SK, Leenutaphong DL, DeModena JA, Curtis JE, Bailey JE, Galazzo JL, Hughes DE. 1991. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of

Références

- Streptomyces lividans* are improved by the expression of bacterial hemoglobin. Nat. Biotechnol. 9(5):473-476.
- Maier U, Büchs J. 2001. Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. Biochem. Eng. J. 7(2):99-106.
- Maier U, Losen M, Büchs J. 2004. Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. Biochem. Eng. J. 17(3):155-167.
- Maier U. 2002. Gas-Flüssigkeits-Stofftransfer im Schüttelkolben. PhD thesis. RWTH Aachen University. Aachen, Germany.
- Majumdar MK, Majumdar SK. 1971. Synthesis of neomycin by washed mycelium of *Streptomyces fradiae* and some physiological considerations. Folia Microbiol. 16(4):285-292.
- Makagiansar HY, Ayazi Shamlou P, Thomas CR, Lilly MD. 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. Bioprocess Eng. 9(2-3):83-90.
- Makarevich VG, Upiter GD, Slugina MD. 1975. Effect of phosphate on growth rate tetracycline biosynthesis of *Actinomyces aureofaciens*. Antibiotiki. 20(4):295-299.
- Mansour FA, El-Shirbiny SA, El-Metwaly NA. 1996. Demethyltetracycline biosynthesis by *Streptomyces aureofaciens* Sub-species *viridulans* as influenced by medium composition. Egypt. J. Microbiol. 31:221-235.
- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 74(12):3877-3886.
- Mao X, Wang F, Zhang J, Chen S, Deng Z, Shen Y, Wei D. 2009. The pH Shift and Precursor Feeding Strategy in a Low-Toxicity FR-008/Candicidin Derivative CS103 Fermentation Bioprocess by a Mutant of *Streptomyces* sp. FR-008. Appl. Biochem. Biotechnol. 159(3):673-686.
- Markl H, Bronnenmeier R, Wittek B. 1991. Resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. Int. Chem. Eng. 31(2):185-197.
- Martin J. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. Adv. Biochem. Eng. 6: 105-127.
- Martin JF, Demain AL. 1977. Control by phosphate of candicidin production. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71(4):1103-1109.
- Martin JF, Demain AL. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. 44(2):230-251.
- Martin JF, Liras P, Demain AL. 1978. ATP and adenylate energy charge during phosphate-mediated control of antibiotic synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83(3):822-828.
- Martin J-F, Liras P. 2010. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. Curr. Opin. Microbiol. 13(3):263-273.
- Martin JF. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: An unfinished story. J. Bacteriol. 186(16):5197-5201.
- Martins RA, Guimaraes LM, Pamboukian CR, Tonso A, Facciotti MCR, Schmidell W. 2004. The effect of dissolved oxygen concentration control on cell growth and antibiotic

Références

- retamycin production in *Streptomyces olindensis* So20 fermentations. Braz. J. Chem. Eng. 21(2):185-192.
- Masuma R, Tanaka Y, Omura S. 1983. Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthetic regulation of the antibiotic. J. Ferment. Technol. 61(6):607-614.
- Masuma R, Tanaka Y, Tanaka H, Omura S. 1986. Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. J. Antibiot. 39(11):1557-1564.
- Masurekar PS. 2008. Nutritional and engineering aspects of microbial process development. Prog. Drug Res. p 292-328.
- Mateles RI, Ben Bassat A. 1973. Production of actinomycin D in complex media. Part I. The influence of metal ions. Agric. Biol. Chem. 37(10):2215-2217.
- Mehmood N, Olmos E, Marchal P, Goergen JL, Delaunay S. 2010. Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_{La} . Process Biochem. 45(11):1779-1786.
- Mertz FP, Doolin LE. 1973. The effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of vancomycin. Can. J. Microbiol. 19(2):263-270.
- Miller AL, Walker JB. 1970. Accumulation of streptomycin-phosphate in cultures of streptomycin producers grown on a high-phosphate medium. J. Bacteriol. 104(1):8-12.
- Morchain J. 2009. Instantaneous substrate uptake rate calculation from dynamic simulation of mass transfer around a living cell. Congrès de la SFGP, Marseille, 14-16 octobre 2009.
- Motkova MO, Gladkikh EG, Korobkova TP. 1981. Inoculum effect on biosynthesis of tobramycin. Antibiotiki 26(7):492-496.
- Mrotzek C, Anderlei T, Henzler HJ, Büchs J. 2001. Mass transfer resistance of sterile plugs in shaking bioreactors. Biochem. Eng. J. 7(2):107-112.
- Muramatsu Y, Arai M, Sakaida Y, Takamatsu Y, Miyakoshi S, Inukai M. 2006. Studies on novel bacterial translocase I inhibitors, A-500359s: V. Enhanced production of capuramycin and A-500359 A in *Streptomyces griseus* SANK 60196. J. Antibiot. 59(9):601-606.
- Narayana KJP, Vijayalakshmi M. 2008. Optimization of antimicrobial metabolites production by *Streptomyces albidoflavus*. Res. J. Pharmacol. 2(1):4-7.
- Nielsen J, Johansen CL, Jacobsen M, Krabben P, Villadsen J. 1995. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. Biotechnol. Prog. 11(1):93-98.
- Nielsen J. 1996. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. Trends Biotechnol. 14(11):438-443.
- Nienow AW. 1990. Agitators for mycelial fermentations. Trends Biotechnol. 8(8):224-233.
- Nienow AW. 1996. Gas-liquid mixing studies : A comparison of rushton turbines with some modern impellers. Chem. Eng. Res. Des. 74(4):417-423.
- Novak J, Kopecka J, Vanak Z. 1997. Nitrogen source regulates expression of alanine dehydrogenase isoenzymes in *Streptomyces avermitilis* in a chemically defined medium. Can. J. Microbiol. 43(2):189-193.

- Nzihou A, Bournonville B, Marchal P, Choplin L. 2004. Rheology and heat transfer during mineral residue phosphatation in a rheo-reactor. *Chem. Eng. Res. Des.* 82(5):637-641.
- O'Cleirigh C, Casey JT, Walsh PK, O'Shea DG. 2005. Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*: Regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(3):305-310.
- Ohta N, Yong Soo P, Yahiro K, Okabe M. 1995. Comparison of neomycin production from *Streptomyces fradiae* cultivation using soybean oil as the sole carbon source in an air-lift bioreactor and a stirred-tank reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 79(5):443-448.
- Okabe M, Kuwajima T, Satoh M, Kimura K, Okamura K, Okamoto R. 1992. Preferential and high-yield production of a cephamycin C by dissolved oxygen controlled fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 73(4):292-296.
- Okba AK, Ogata T, Matsubara H, Matsuo S, Doi K, Ogata S. 1998. Effects of bacitracin and excess Mg^{2+} on submerged mycelial growth of *Streptomyces azureus*. *J. Ferment. Bioeng.* 86(1):28-33.
- Omura S, Tanaka Y, Kitao C. 1980. Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18(5):691-695.
- Omura S, Tanaka Y, Mamada H, Masuma R. 1984. Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids on the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot.* 37(5):494-502.
- Ortiz SCA, Hokka CO, Badino AC. 2007. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme Microb. Technol.* 40(5):1071-1077.
- Oskay M, Tamer AU, Karaboz I. 2010. Isolation and screening for antimicrobial activities of culturable mesophilic *Streptomyces* strains from north cyprus soils. *Fresenius Environ. Bull.* 19(2):154-163.
- Oskay M. 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *Afr. J. Biotechnol.* 8(13):3007-3017.
- Ozergin-Ulgen K, Mavituna F. 1998. Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) culture in a batch bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73(3):243-250.
- Pamboukian CRD, Facciotti MCR. 2005. Rheological and morphological characterization of *Streptomyces olindensis* growing in batch and fed-batch fermentations. *Braz. J. Chem. Eng.* 22(1):31-40.
- Pandey A, Shukla A, Majumdar SK. 2005. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an anti bacterial antibiotic. *Afr. J. Biotechnol.* 4(9):909-910.
- Pandolfi D, Pons MN, Motta MD. 2007. Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis. *Biotechnol. Lett.* 29(8):1263-1269.
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22(3):189-259.
- Paquet V, Goma G, Soucaille P. 1992. Induction of pristinamycins production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Biotechnol. Lett.* 14(11):1065-1070.

- Paquet V. 1990. Mise en évidence de facteurs d'induction de la production de pristinamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis*. PhD Thesis. INSA. Toulouse, France.
- Parche S, Nothaft H, Kamionka A, Titgemeyer F. 2000. Sugar uptake and utilisation in *Streptomyces coelicolor*: A PTS view to the genome. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78(3-4):243-251.
- Park JP, Kim YM, Kim SW, Hwang HJ, Cho YJ, Lee YS, Song CH, Yun JW. 2002. Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microbiol.* 34(6):433-438.
- Park YS, Momose I, Tsunoda K, Okabe M. 1994. Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40(6):773-779.
- Park, Y, Tamura, S, Koike, Y, Toriyama, M, Okabe, M. 1997. Mycelial pellet intrastucture visualization and viability prediction in a culture of *Streptomyces fradiae* using confocal scanning laser microscopy. *J. Ferment. Bioeng.* 84(5):483-486.
- Pass L, Racznska-Bojanowska K. 1968. On the inhibition mechanisms of viomycin synthesis by inorganic phosphate. *Acta Biochim. Pol.* 15(4):355-367.
- Paul A, Banerjee A. 1983. Determination of optimum conditions for antibiotic production by *Streptomyces galbus*. *Folia Microbiol.* 28(5):397-405.
- Paul GC, Priede MA, Thomas CR. 1999. Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. *Biochem. Eng. J.* 3(2):121-129.
- Paul GC, Thomas CR. 1998. Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 60:1-59.
- Peacock L, Ward J, Ratledge C, Dickinson FM, Ison A. 2002. How *Streptomyces lividans* uses oils and sugars as mixed substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 32(1):157-166.
- Pearson AP, Glennon B, Kieran PM. 2003. Comparison of morphological characteristics of *Streptomyces natalensis* by image analysis and focused beam reflectance measurement. *Biotechnol. Prog.* 19(4):1342-1347.
- Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E. 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb. Technol.* 27(6):390-398.
- Perlman D, Wagman GH. 1952. Studies on the utilization of lipids by *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 63(2):253-262.
- Peter CP, Suzuki Y, Büchs J. 2006. Hydromechanical stress in shake flasks: Correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnol. Bioeng.* 93(6):1164-1176.
- Peter CP, Suzuki Y, Büchs J. 2006. Hydromechanical stress in shake flasks: Correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnol. Bioeng.* 93(6):1164-1176.
- Pinto LS, Vieira LM, Pons MN, Fonseca MMR, Menezes JC. 2004. Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. *Bioprocess Biosys. Eng.* 26(3):177-184.
- Pope SB. 2000. *Turbulent Flows*: Cambridge University Press, Cambridge, p. 187.

Références

- Preud'homme J, Belloc A, Charpentie Y, Tarridec P. 1965. Chimie microbienne et pharmacodynamie. Un antibiotique formé de deux groupes de composants à synergie d'action: la pristinamycine. C. R. Acad. Sc. Paris. 260:1309-1312.
- Preud'homme J, Tarridec P, Belloc A. 1968. Isolation, characterization and identification of the components of pristinamycin: Pristinamycine isolement, caractérisation et identification des constituants. Bull. Soc. Chim. Fr. 2:585-591.
- Qadri SMH, Ueno Y, Mostafa FMA, Halim M. 1997. In vitro activity of quinupristin/dalfopristin, RP59500, against gram-positive clinical isolates. Chemotherapy 43(2):94-99.
- Raytapadar S, Paul AK. 2001. Production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces aburaviensis* 1DA-28. Microbiol. Res. 155(4):315-323.
- Raza W, Yang X, Wu H, Huang Q, Xu Y, Shen Q. 2010. Evaluation of metal ions (Zn^{2+} , Fe^{3+} and Mg^{2+}) effect on the production of fusaricidin type antifungal compounds by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. Bioresour. Technol. 101(23):9264-9271.
- Reichl U, King R, Gilles ED. 1992a. Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. Biotechnol. Bioeng. 39(2):164-170.
- Reichl U, King R, Gilles ED. 1992b. Effect of temperature and medium composition on mycelial growth of *Streptomyces tendae* in submerged culture. J. Basic Microbiol. 32(3):193-200.
- Reitzer LJ. 1996. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, L-alanine and D-alanine. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology: Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology. 391-407 p.
- Rhone-Poulenc SA. (1961). Procédé de préparation d'un antibiotique par une nouvelle souche de *Streptomyces*. Brevet Française n° 1-301-857.
- Rikmanis M, Berzins A, Viesturs U. 2007. Excess turbulence as a cause of turbohypobiosis in cultivation of microorganisms. Cent. Eur. J. Biol. 2(4):481-501.
- Riley GL, Tucker KG, Paul GC, Thomas CR. 2000. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. Biotechnol. Bioeng. 68(2):160-172.
- Rocha-Valadez JA, Albiter V, Caro MA, Serrano-Carreón L, Galindo E. 2007. A fermentation system designed to independently evaluate mixing and/or oxygen tension effects in microbial processes: Development, application and performance. Bioprocess Biosys. Eng. 30(2):115-122.
- Rokem JS, Lantz AE, Nielsen J. 2007. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. Nat. Prod. Rep. 24(6):1262-1287.
- Rollins MJ, Jensen SE, Westlake DWS. 1988. Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. J. Ind. Microbiol. 3(6):357-364.
- Rollins MJ, Jensen SE, Westlake DWS. 1991. Effect of dissolved oxygen level on ACV synthetase synthesis and activity during growth of *Streptomyces clavuligerus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35(1):83-88.

- Rondags E, Halliday E, Marc I. 1998. Diacetyl production mechanism by a strain of *Lactococcus lactis* sp. *lactis* by diacetylactis: Study of α -acetolactic acid extracellular accumulation under anaerobiosis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 69(2):113-125.
- Rosa JC, Neto AB, Hokka CO, Badino AC. 2005. Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioprocess Biosystems Eng.* 27(2):99-104.
- Roszkowski J, Rafalski A, Raczyni ska-Bojanowska K. 1969. Alanine and alanine dehydrogenase in *Streptomyces erythreus*. *Acta microbiologica Polonica. Series B: Microbiologia applicata* 1(2):59-68.
- Roubos JA, Krabben P, Luiten RGM, Verbruggen HB, Heijnen JJ. 2001. A quantitative approach to characterizing cell lysis caused by mechanical agitation of *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Prog.* 17(2):336-347.
- Ruiz B, Chavez A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanchez M, Rocha D, Sanchez B, Rodriguez-Sanoja R, Sanchez S and others. 2010. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol.* 36(2):146-167.
- Saffroy S. 2006. Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. PhD Thesis. Nancy-University. Nancy, France.
- Sakha M, Ameri M, Rohbakhsh A. 2006. Changes in blood β -hydroxybutyrate and glucose concentrations during dry and lactation periods in Iranian Holstein cows. *Comp. Clinic. Pathol.* 15(4):221-226.
- Samra Z, Ofer O, Shmueli H. 2005. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to vancomycin, teicoplanin, linezolid, pristinamycin and other antibiotics. *Isr. Med. Assoc. J.* 7(3):148-150.
- Sanchez L, Brana AF. 1996. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* 142(5):1209-1220.
- Sanchez S, Chavez A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanchez M, Rocha D, Sanchez B, Valos M, Guzman-Trampe S and others. 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot.* 63(8):442-459.
- Sanchez S, Demain AL. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme Microb. Technol.* 31(7):895-906.
- Sanchez S, Olson B. 2005. Ecology and industrial microbiology: Microbial diversity -- the bright and promising future of microbial manufacturing. *Curr. Opin. Microbiol.* 8(3):229-233.
- Sankaran L, Pogell BM. 1975. Biosynthesis of puromycin in *Streptomyces alboniger*: Regulation and properties of O demethylpuromycin O methyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8(6):721-732.
- Santamarta I, Perez-Redondo R, Lorenzana LM, Martin JF, Liras P. 2005. Different proteins bind to the butyrolactone receptor protein ARE sequence located upstream of the regulatory *ccaR* gene of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol. Microbiol.* 56(3):824-835.
- Santamarta I, Rodriguez-Garcia A, Perez-Redondo R, F. MJ, Liras P. 2002. CcaR is an autoregulatory protein that binds to the *ccaR* and *cefD-cmcI* promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Bacteriol.* 184(11):3106-3113.

Références

- Sargantanis IG, Karim MN. 1996. Effect of oxygen limitation on B-lactamase production. *Biotechnol. Prog.* 12(6):786-792.
- Sarra M, Casas C, Poch M, Godia F. 1999. A simple structured model for continuous production of a hybrid antibiotic by *Streptomyces lividans* pellets in a fluidized-bed bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 80(1):39-50.
- Schimana J, Walker M, Zeeck A, Fiedler HP. 2001. Simocyclinones: diversity of metabolites is dependent on fermentation conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27(3):144-148.
- Schreier HJ. 1993. Biosynthesis of glutamine and glutamate and the assimilation of ammonia. *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick: Washington, DC: American Society for Microbiology. p 281-298.
- Seletzky JM, Noak U, Fricke F, Welk E, Eberhard W, Knocke C, Büchs J. 2007. Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnol. Bioeng.* 98(4):800-811.
- Sevcikova B, Kormanec J. 2004. Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. *Arch. Microbiol.* 181(5):384-389.
- Shapiro S, Vining LC. 1983. Nitrogen metabolism and chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*. *Can. J. Microbiol.* 29(12):1706-1714.
- Shapiro S, Vining LC. 1984. Suppression of nitrate utilization by ammonium and its relationship to chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*. *Can. J. Microbiol.* 30(6):798-804.
- Shapiro S, Vining LC. 1985. Effect of ammonium on chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae* in batch and continuous cultures. *Can. J. Microbiol.* 31(2):119-123.
- Shaw RK, Henderson RD, Seagers WJ. 1960. Effect of cations on mannosidostreptomycinase and streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol.* 8:12-15.
- Shen YQ, Heim J, Solomon NA. 1984. Repression of β -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.* 37(5):503-511.
- Shioya S, Morikawa M, Kajihara Y, Shimizu H. 1999. Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(2):164-169.
- Singh LS, Mazumder S, Bora TC. 2009. Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *J. Med. Mycol.* 19(4):225-233.
- Smith JJ, Lilly MD, Fox RI. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 35(10):1011-1023.
- Soussy CJ, Acar JF, Cluzel R, Courvalin P, Duval J, Fleurette J, Megraud F, Meyran M, Thabaut A. 1992. A collaborative study of the in-vitro sensitivity to RP 59500 of bacteria isolated in seven hospitals in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 30(SUPPL. A):53-58.

Références

- Suetsuna K, Osajima Y. 1990. Cultural conditions for production of griseorhodin by a culture of *S. californicus* JCM 6910. Suisan Diagakkakenkyn Hokoku 38:17-22.
- Sujatha P, Bapi Raju KVVS, Ramana T. 2005. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Res. 160(2):119-126.
- Sumino Y, Akiyama S, Fukuda H. 1972. Performance of the shaking flask. I. Power consumption. J. Ferment. Technol. 50(3):203-208.
- Takahashi J, Yamada K, Aasai T. 1958. Studies on the effect of some physical conditions on the submerged mold culture. Part I. The process of pellet formation of *Asp. niger* under the shaking culture, and the effect of the inoculum size on the shape of pellet. J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 32:501-506.
- Takahashi J, Yamada K. 1959. Studies on the effect of some physical conditions on the submerged mold culture. Part II. On the two types of pellet formation in the shaking culture. J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 33:707-709.
- Tamura S, Park Y, Toriyama M, Okabe M. 1997. Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. J. Ferment. Bioeng. 83(6):523-528.
- Tan R-K, Eberhard W, Büchs J. 2011. Measurement and characterization of mixing time in shake flasks, Chem. Eng. Sci. 66(3):440-447.
- Tanaka Y, Taki A, Masuma R, Omura S. 1985. Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. J. Antibiot. 39(6):813-821.
- Tang L, Zhang YX, Hutchinson CR. 1994. Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: Valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. J. Bacteriol. 176(19):6107-6119.
- Tata M, Menawat AS. 1994. Cyclic AMP regulation of tylosin biosynthesis and secondary metabolism in *Streptomyces fradiae*. Biotechnol. Bioeng. 44(3):283-290.
- Teodoro J, Baptista-Neto A, Cruz-Hernández I, Hokka C, Badino A. 2006. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72(3):450-455.
- Tereshin IM. 1976. Polyene Antibiotics. Present and Future. Tokyo: University of Tokyo press.p 1-169.
- Thakur D, Bora TC, Bordoloi GN, Mazumdar S. 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. J. Mycol. Med. 19(3):161-167.
- Theobald U, Schimana J, Fiedler HP. 2000. Microbial growth and production kinetics of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 78(3-4):307-313.
- Thibaut D, Ratet N, Bisch D, Faucher D, Debussche L, Blanche F. 1995. Purification of the two-enzyme system catalyzing the oxidation of the D- proline residue of pristinamycin II (B) during the last step of pristinamycin II (A) biosynthesis. J. Bacteriol. 177(18):5199-5205.
- Thomas DG. 1964. Turbulent disruption of flocs in small particle size suspensions. AICHE J. 10(4):517-523.

Références

- Toma MK, Ruklisha MP, Vanags JJ, Zeltina MO, Leite MP, Galinina NI, Viesturs UE, Tengerdy RP. 1991. Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. *Biotechnol. Bioeng.* 38(5):552-556.
- Torbochkina LI, Dormidoshina TA, Navolneva IN. 1965. The path of pyruvic acid synthesis in *Act. erythreus* and *Act. antibioticus* strains producing macrolid antibiotics. *antibiotiki.* 30(2):388-394.
- Tough AJ, Prosser JI. 1996. Experimental verification of a mathematical model for pelleted growth of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in submerged batch culture. *Microbiology* 142(3):639-648.
- Untrau S, Lebrihi A, Lefebvre G, Germain P. 1994. Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.* 28(2):111-118.
- Valentine BP, Bailey CR, Doherty A, Morris J, Elson SW, Baggaley KH, Nicholson NH. 1993. Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (15):1210-1211.
- Van Suijdam JC, Kossen NWF, Joha AC. 1978. Model for oxygen transfer in a shake flask. *Biotechnol. Bioeng.* 20(11):1695-1709.
- Van Suijdam JC, Metz B. 1981. Fungal pellet breakup as a function of shear in a fermenter. *J. Ferment. Technol.* 59:329-333.
- Vannuffel P, Cocito C. 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs* 51(SUPPL. 1):20-30.
- Vasavada SH, Thumar JT, Singh SP. 2006. Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Curr. Sci.* 91(10):1393-1397.
- Vecht-Lifshitz SE, Magdassi S, Braun S. 1989. Effects of surface active agents on pellet formation in submerged fermentations of *Streptomyces tendae*. *J. Dispersion Sci. Technol.* 10(3):265-275.
- Vecht-Lifshitz SE, Magdassi S, Braun S. 1990. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Bioeng.* 35(9):890-896.
- Vecht-Lifshitz SE, Sasson Y, Braun S. 1991. Nikkomycin production in pellets of *Streptomyces tendae*. *J. Appl. Bacteriol.* 72(3):195-200.
- Veglio F, Beolchini F, Ubaldini S. 1998. Empirical models for oxygen mass transfer: A comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganiferous ore bioleaching. *Process Biochem.* 33(4):367-376.
- Veljkovic V, Nikolic S, Lazic M, Engeler C. 1995. Oxygen transfer in flasks shaken on orbital shakers. *Hem. Ind.* 49 (6) 265–272.
- Viana D, Carneiro-Cunha M, Araújo J, Barros-Neto B, Lima-Filho J, Converti A, Pessoa-Júnior A, Porto A. 2010. Screening of Variables Influencing the Clavulanic Acid Production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 Strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160(6):1797-1807.
- Vilches C, Mendez C, Hardisson C, Salas JA. 1990. Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: Influence of nutritional conditions and development of resistance. *J. Gen. Microbiol.* 136(8):1447-1454.

Références

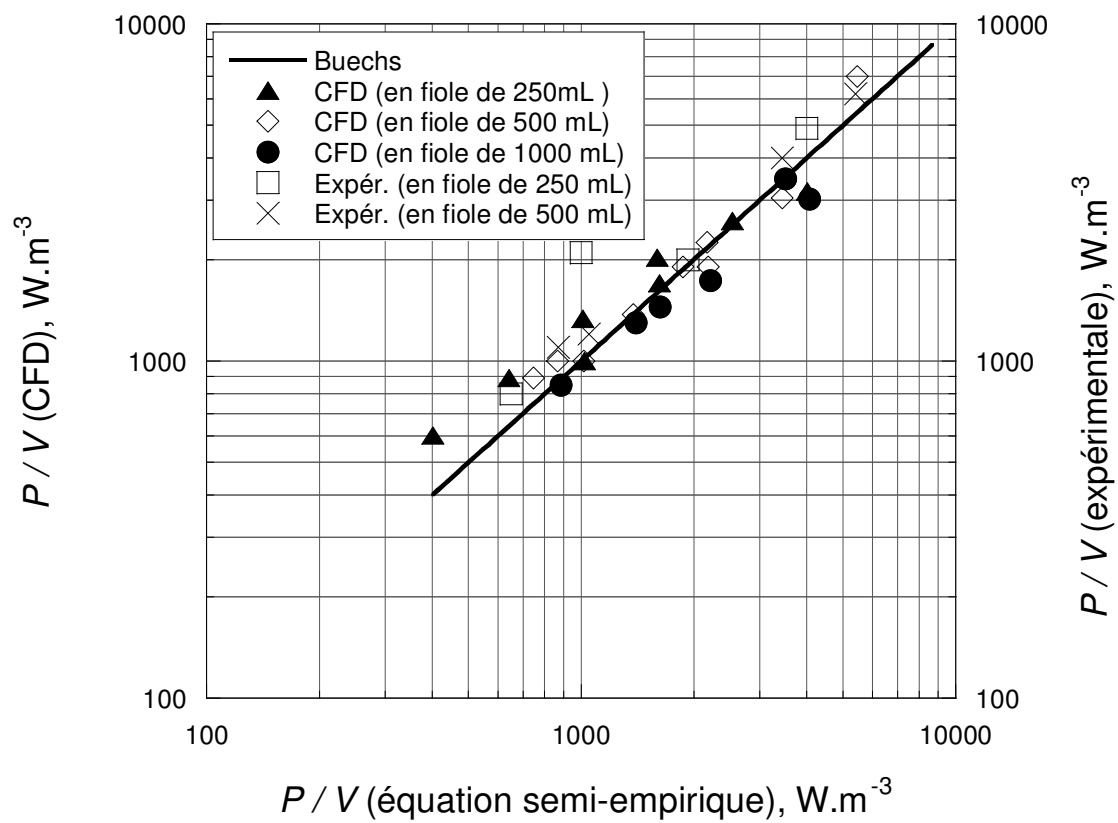
- Visser-Luirink G, De Laat WTA, Klop JM. 2006. Fermentation of clavulanic acid at a Controlled level of ammonia. USP 6,991,925.
- Voelker F, Altaba S. 2001. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. Microbiology 147(9):2447-2459.
- Vu-Trong K, Bhuwathanapun S, Gray PP. 1981. Metabolic regulation in tylosin-producing *Streptomyces fradiae*: phosphate control of tylosin biosynthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 19(2):209-212.
- Walker MS, Walker JB. 1971. Streptomycin biosynthesis. Separation and substrate specificities of phosphatases acting on guanidinodeoxy-scylo-inositol phosphate and streptomycin-(streptidino)phosphate. J. Biol. Chem. 246(22):7034-7040.
- Wallace KK, Payne GF, Speedie MK. 1990. Ammonium effects on streptonigrin biosynthesis by *Streptomyces flocculus*. J. Ind. Microbiol. 6(1):43-48.
- Webb C, Kamat SP. 1993. Improving fermentation consistency through better inoculum preparation. World J. Microbiol. Biotechnol. 9(3):308-312.
- Weinberg D. 1978. Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. Folia Microbiol. 23(6):496-504.
- Weinberg ED. 1990. Roles of trace metals in transcriptional control of microbial secondary metabolism. BioMetals 2(4):191-196.
- Weinberg ED. Biosynthesis of Secondary Metabolites: Roles of Trace Metals. In A. H. Rose and J. F. Wilkinson (ed), Advances in microbial physiology, vol.4. Academic Press Inc., New York. p 1-44.
- Whitaker A. 1992. Actinomycetes in submerged culture. Appl. Biochem. Biotechnol. 32(1-3):23-35.
- Xiong L, Li J, Kong F. 2004. *Streptomyces* sp. 173, an insecticidal micro-organism from marine. Lett. Appl. Microbiol. 38(1):32-37.
- Yan QH, Chen B, Zhang SL, Liu ZZ, Gao YS, Tu GQ. 2002. A diverse temperature control in meilingmycin fermentation. Chin. J. Antibiot. 27(1):18-20+54.
- Yang YK, Morikawa M, Shimizu H, Shioya S, Suga KI, Nihira T, Yamada Y. 1996. Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*. J. Ferment. Bioeng. 81(1):7-12.
- Yegneswaran PK, Gray MR, Thompson BG. 1991. Experimental stimulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: Effect on *Streptomyces clavuligerus*. Biotechnol. Bioeng. 38(10):1203-1209.
- Yegneswaran PK, Gray MR, Westlake DWS. 1988. Effects of reduced oxygen on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. Biotechnol. Lett. 10(7):479-484.
- Yegneswaran PK, Gray MR. 1991. Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentations. Biotechnol. Prog. 7(3):246-250.
- Yin P, Wang YH, Zhang SL, Chu J, Zhuang YP, Chen N, Li XF, Wu YB. 2008. Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. J. Chin. Inst. Chem. Eng. 39(6):609-615.

Références

- Yocheva L, Staneva L, Antonova-Nikolova S. 2003. Effect of the exogenous added amino acids on the component composition of the actinomycin complex 695. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 17(2 Supp.): 136-143.
- Young MD, Kempe LL, Bader FG. 1985. Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media. *Biotechnol. Bioeng.* 27(3):327-333.
- Yu J, Liu Q, Liu Q, Liu X, Sun Q, Yan J, Qi X, Fan S. 2008. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresour. Technol.* 99(6):2087-2091.
- Zhang H, Williams-Dalson W, Keshavarz-Moore E, Shamlou PA. 2005. Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 41(1):1-8.
- Zhang J, Demain AL. 1991. Regulation of ACV synthetase in penicillin- and cephalosporin-producing microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 9(4):623-641.
- Zhang J, Wolfe S, Demain AL. 1989. Carbon source regulation of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium* C-10. *Curr. Microbiol.* 18(6):361-367.
- Zhang X, Bürki C-A, Stettler M, De Sanctis D, Perrone M, Discacciati M, Parolini N, DeJesus M, Hacker DL, Quarteroni A and others. 2009. Efficient oxygen transfer by surface aeration in shaken cylindrical containers for mammalian cell cultivation at volumetric scales up to 1000 L. *Biochem. Eng. J.* 45(1):41-47.
- Zhinan X, Peilin C. 1999. Enhanced production of avermectin B1a by medium optimization and glucose feeding with *Streptomyces avermilitis*. *Bioprocess Eng.* 20(1):67-71.
- Zhu CH, Lu FP, He YN, Han ZL, Du LX. 2007. Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: Effects of glucose, ammonium ion, and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73(5):1031-1038.
- Zygmunt WA. 1964. Influence of inorganic phosphorus on oxytetracycline formation by *Streptomyces rimosus*. *Appl. Microbiol.* 12(3) : 195-196.

ANNEXES

Annexe 1. Comparaison des valeurs de P/V calculées par CFD, par équation semi empirique (Buechs et al., 2000) et mesurées expérimentalement.



AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Caroline GENTRIC, Professeur, Université de Nantes, Saint-Nazaire

Monsieur Rémy CACHON, Professeur, Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques, Dijon

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur MEHMOOD Nasir

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Effet de l'hydrodynamique et du transfert d'oxygène sur la physiologie de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de cultures en flacons agités. "

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

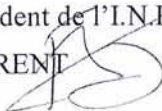
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 14 mars 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



Titre : Effets de l'hydrodynamique et du transfert d'oxygène sur la physiologie de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de cultures en flacons agités

Résumé :

Dans le cadre de ce travail de thèse, la physiologie apparente de *Streptomyces pristinaespiralis* et plus spécifiquement la production de pristinamycines (déclenchement et concentration) a été reliée à son environnement hydrodynamique. Des cultures de *S. pristinaespiralis* ont été réalisées sous diverses conditions d'agitation et d'aération, en fioles lisses d'Erlenmeyer. Ces conditions engendrent des dissipations volumiques comprises entre 0,55 et 14 kW.m⁻³ et des k_{La} compris entre 30 et 490 h⁻¹. Partant du constat de la complexité combinée de l'hydrodynamique rencontrée dans les bioréacteurs et de la réponse cellulaire, nous avons développé une approche pluridisciplinaire et multiéchelle à l'interface entre génie des procédés et physiologie quantitative. La réponse physiologique apparente a été quantifiée en termes de croissance, consommation des substrats, morphologie et production. L'hydrodynamique des fioles agitées a été notamment décrite par utilisation de la simulation numérique des écoulements. Par l'utilisation originale d'un modèle de rupture, les diamètres des pelotes ont été corrélés à l'échelle de dissipation de Kolmogorov. De plus, il a été montré que la dissipation défavorisait la croissance des pelotes. Ainsi, par le découplage de l'agitation et de l'aération, il a été montré que la taille des pelotes, contrôlée par la turbulence, impactait directement la consommation d'oxygène et la quantité de pristinamycines produites. Par ailleurs, le déclenchement de la production, résultante d'une limitation en substrats azotés et d'un apport en oxygène suffisant, est déterminé conjointement par la quantité du transfert d'oxygène et par la dissipation volumique.

Mot-clés: *Streptomyces pristinaespiralis*, pristinamycines, hydrodynamique, puissance dissipée volumique, transfert d'oxygène, physiologie microbienne

Title: Effect of hydrodynamic and transfer of oxygen on the physiology of *Streptomyces pristinaespiralis* in shake flasks.

Abstract :

During this study, the physiology of *Streptomyces pristinaespiralis* and more specifically the production of pristinamycins (induction and concentration) were related to its hydrodynamic environment. Cultures of *S. pristinaespiralis* were performed under various conditions of agitation and aeration in non baffled Erlenmeyer flasks. According to the operating conditions, the volume power dissipation was from 0.55 to 14 kW.m⁻³ while k_{La} was from 30 to 490 h⁻¹. Based on the observation of the complexity of both hydrodynamics encountered in bioreactors and of the cellular response, a multiscale and multidisciplinary approach between process engineering and quantitative physiology was developed. The apparent physiological response was quantified in terms of growth, substrates consumption, morphology and production. The hydrodynamics of the shake flasks was described using Computational Fluid Dynamics. Using an original break up model, the pellet diameters were correlated to the Kolmogorov dissipation scale. Moreover, it was shown that pellet growth was slowed down by the dissipation scale increase. Then, by decoupling the agitation and the aeration, it was shown that the pellets size, controlled by turbulence, impacted directly the consumption of oxygen and the concentration of pristinamycins. Furthermore, onset of pristinamycin production resulted in a limitation in nitrogen substrates as well as a sufficient oxygen supply which are determined by the oxygen transfer and the volume power dissipation.

Keywords: *Streptomyces pristinaespiralis*, pristinamycines, hydrodynamics, volume power dissipation, oxygen transfer, microbial physiology