

Production de violacéine par *Chromobacterium violaceum* (CIP 103350 ou CV017)

Etude en fermenteur de laboratoire sous un volume de 1,5 L

Travail en ateliers de 3 étudiants. Les compte-rendu sont évidemment individuels.

1. Préalable

Toute la documentation des travaux pratiques intitulés « Production de violacéine par *Chromobacterium violaceum*, tests préliminaires sur cultures agitées de 30 mL » (= fichier tp-violaceine-testspreliminaires.odt) ainsi que les résultats obtenus (= compte-rendu de TP lié) seront utilisés.

2. Travail à réaliser

On dispose d'une préculture de *Ch. Vvol. CIP 103350 ou CV017* en milieu M (3 fois 33 mL en Erlen de 250 mL, agitation orbitale, 25°C, 24 heures).

On dispose d'un bioréacteur de laboratoire contenant 1,5 L de milieu M (plus antimousses) et prêt à utilisation (capteur pH, capteur dioxygène en places ...).

- Température réglée à 27°C.
- pH suivi simple ou suivi plus régulation. Si régulation : pH 6,7.
- Dioxygène dissous : régulation à 15% (28°C). Cascade proposée : 1) rotation turbine min. 100 rpm / max. 450 rpm ; 2) débit gaz d'aération min. 2vvm / max 3 vvm.
- Mettre le bioréacteur en conditions « prêt à l'inoculation ».
- Inoculer sous un volume de 5%.
- Suivre la culture : [biomasse], [glucose], [violacéine], pH, dioxygène, température. A rapporter dans le compte-rendu.
- Arrêter la bioréaction au moment désiré.
- Commenter les différentes phases de la culture. Calculer la vitesse spécifique maximale de croissance, le temps de génération et le taux de croissance horaire (en phase exponentielle).
- Déterminer le rendement global de conversion des constituants globaux du milieu en violacéine (en g de violacéine par g de mélange sec de constituants du milieu) ainsi que le rendement de conversion du seul tryptophane du milieu en violacéine au cours du procédé.
- Déterminer la productivité volumique horaire en violacéine dans les conditions mises en oeuvre (pour la seule phase depuis l'inoculation jusqu'à l'arrêt de la fermentation).
- Proposer une méthode de traitement de la culture, dans le cadre de tests pilotes, pour la récupération de la violacéine.

■ Données importantes :

- dans le milieu éthanolique après extraction, le coef. d'absorbance spécifique de la violacéine = $\epsilon = 1.7 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 577 nm) ;
- milieu M : KNO₃ 1,18 g/L ; sulfate de fer et d'ammonium 0,08 g/L ; K₂HPO₄ 0,25 g/L ; MgSO₄ 0,75 g/L ; extrait de viande de bœuf 1,53 g/L ; tryptophane 0,74 g/L ; glucose 13 g/L ; pH 6,7.

Bibliographie :

- Chernin, Winson, Thompson, Haran, Bycroft, Chet, Williams, Stewart, J. of Bacteriology, sept. 1998, 4435-4441.
- Regina Vasconcellos Antônio and Tânia B. Creczynski-Pasa ; Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*, Genet. Mol. Res. 3 (1): 85-91 (2004).
- Renée S. Blosser, Kendall M. Gray ; Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers ; J. of Biological Methods (40) 2000 47-55.
- HAISHENG WANG ; PEIXIA JIANG ; YUAN LU ; ZHIYONG RUAN ; RUIBO JIANG ; XING Xin-Hui ; KAI LOU ; DONG WEI ; Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2 ; Biochemical engineering journal ; 2009, vol. 44, no2-3, pp. 119-124
- Armando S. Mendes, João E. de Carvalho, Marta C.T. Duarte, Nelson Durán and Roy E. Bruns ; Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production ; Biotechnology letter volume 23, décembre 2001, 1963-1969