

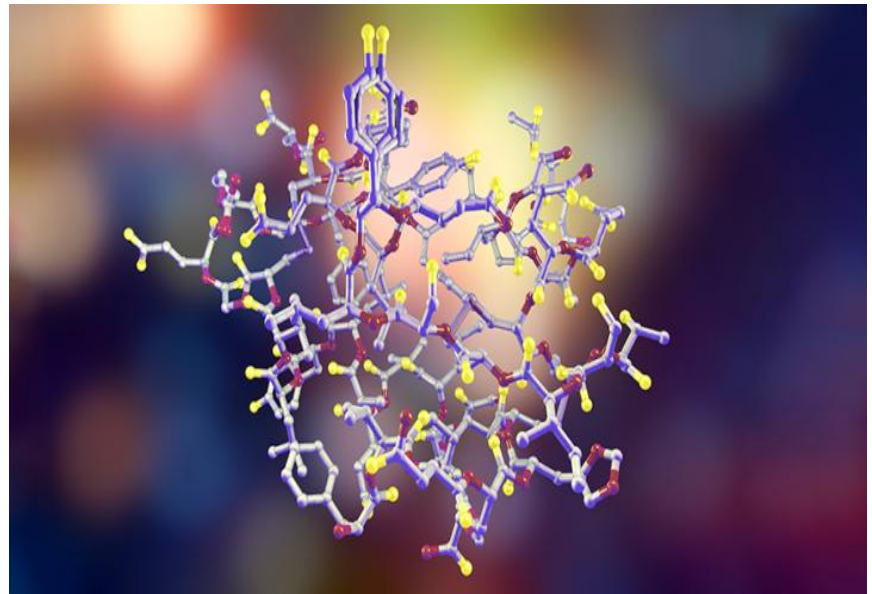
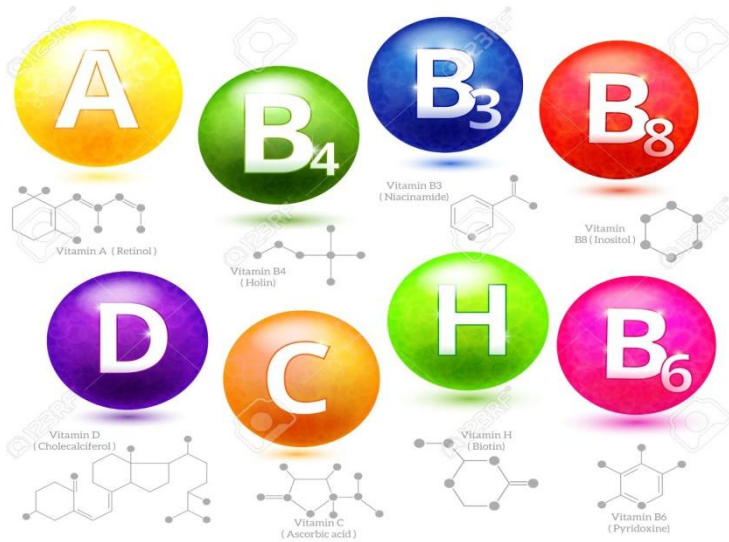
2^{ème} année TC SNV
Semestre 4

Module de

Biotechnologies et applications

Dr HABBECHÉ A

Chapitre 3 : Métabolites microbiens d'importances économiques



INTRODUCTION

Les métabolites synthétisés par les microorganismes sont indispensables physiologiquement pour leur développement, sont des composés chimiques synthétisé l'ors d'une phase de métabolisme. Les biomolécules sont des producteurs de métabolites primaires et secondaires.

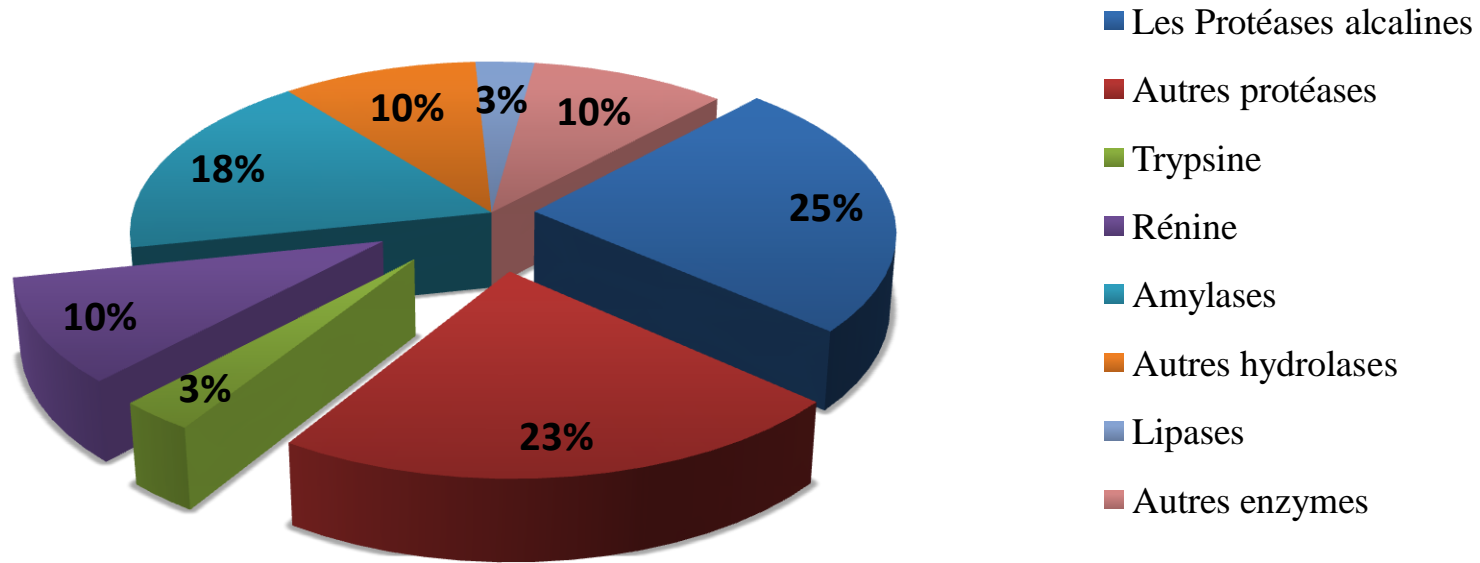
1. Production des enzymes

Les enzymes, sont des catalyseurs biologiques de nature protéique capables de catalyser des réactions chimiques dans les cellules vivantes. Les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu une expansion significative, elles sont de plus en plus rechercher en industrie grâce a leurs propriétés physicochimiques extrêmes. Les microorganismes présentent de nombreux avantages entant que producteur d'enzymes: (croissance exponentielle, la disponibilité, condition de culture ... etc).

Dans les secteurs industriels les microorganismes sont sélectionnés selon les principaux critères suivants:

- Une bonne source de production d'enzymes.
- Un minimum de temps de culture et de production
- l'extraction des enzymes est plus facile est moins couteuse
- La souche doit pouvoir se développer sur des milieux contenant des substrats moins couteux (valorisation des déchets)

Répartition du marché mondial des enzymes



1.1. Induction de production d'enzyme

Les inducteurs doivent être présents dans les milieux de production (exemple: l'amidon pour les amylases, protéine pour les protéases, le xylane pour les xylanases). Certaines molécules agissent comme inducteurs à faible concentration et comme répresseur à fortes doses (exemple: cellobiose pour les cellulases).

Un effet inducteur est très souvent démontré par des analogues de substrats (exemple: isopropyl-béta-D- thiogalactoside qui est l'analogue du lactose pour la β -galactosidase).

1.2. Microorganismes producteurs des enzymes

Chaque microorganisme produit généralement, un grand nombre d'enzymes impliquées dans des mécanismes cellulaires. Toutefois, quelques enzymes sont produites en beaucoup plus grande quantité par certains microorganismes (par exemple: pour dégrader des différentes molécules complexes comme la cellulose, l'amidon ou les protéines).

L'enzyme produite peut être excrétée dans le milieu de culture (enzymes extracellulaires) ou peut être présente dans les cellules (enzymes intracellulaires).

Selon l'exigence, l'enzyme commerciale peut être brute ou très purifiée, elle peut être sous forme solide ou liquide.

Les étapes impliquées dans le traitement utilisées (récupération et purification) dépendent de la nature de l'enzyme et du degré de pureté souhaité.

Tableau 1. Microorganismes producteurs des enzymes

Source	Enzyme	Microorganisme
Champignons	Amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Glucosidases	<i>Aspergillus flavus</i>
	Proteases	<i>Aspergillus niger</i>
	Pectinases	<i>Aspergillus niger</i>
	Catalase	<i>Aspergillus niger</i>
Bacteries	Amylases	<i>Bacillus subtilis</i>
	Proteases	
	Penicillinase	
Leuvures	Invertase	<i>Saccharomyces</i>
	Lactase	<i>cervisiae</i>
		<i>Saccharomyces fragilis</i>

1.3. Extraction

L'extraction est la séparation de l'enzyme recherché du milieu de culture utilisé pour la production. Cette méthode consiste à libérer l'enzyme de la cellule par éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire par des procédés physique ou chimique.

En général, l'extraction d'une enzyme extracellulaire présente dans le milieu est relativement plus simple par rapport à une enzyme intracellulaire.

1.4. La purification

La purification est un ensemble de techniques visant à éliminer toutes les impuretés d'un extrait brut contenant l'enzyme d'intérêt.

Les étapes de la purification d'enzymes

Les étapes de récupération et de purification sont les mêmes pour les enzymes intracellulaires et extracellulaires, une fois que les cellules sont éclatées et que les enzymes intracellulaires sont libérées. La plus importante est de minimiser la perte de l'activité enzymatique souhaitée.

- **Élimination des débris cellulaires:** la filtration ou la centrifugation peuvent être utilisées pour éliminer les débris cellulaires.
- **Précipitation enzymatique:** les enzymes peuvent être précipitées en utilisant des sels (sulfate d'ammonium) ou solvants organiques (isopropanol, éthanol et acétone).
- **Séparation par chromatographie:** Il existe plusieurs techniques chromatographiques pour la séparation et la purification des enzymes (l'échange d'ions, l'exclusion diffusion, l'affinité). Parmi ceux-ci, la chromatographie d'échange d'ions est la plus couramment utilisée pour la purification enzymatique.
- **Control de pureté :** par des techniques électrophorétiques
- **Caractérisation des propriétés physicochimiques**

1.5. Conservation

La forme concentrée de l'enzyme peut être obtenue par séchage. Cela peut se faire par un évaporateur ou un lyophilisateur. L'enzyme séchée peut être emballée et commercialisée.

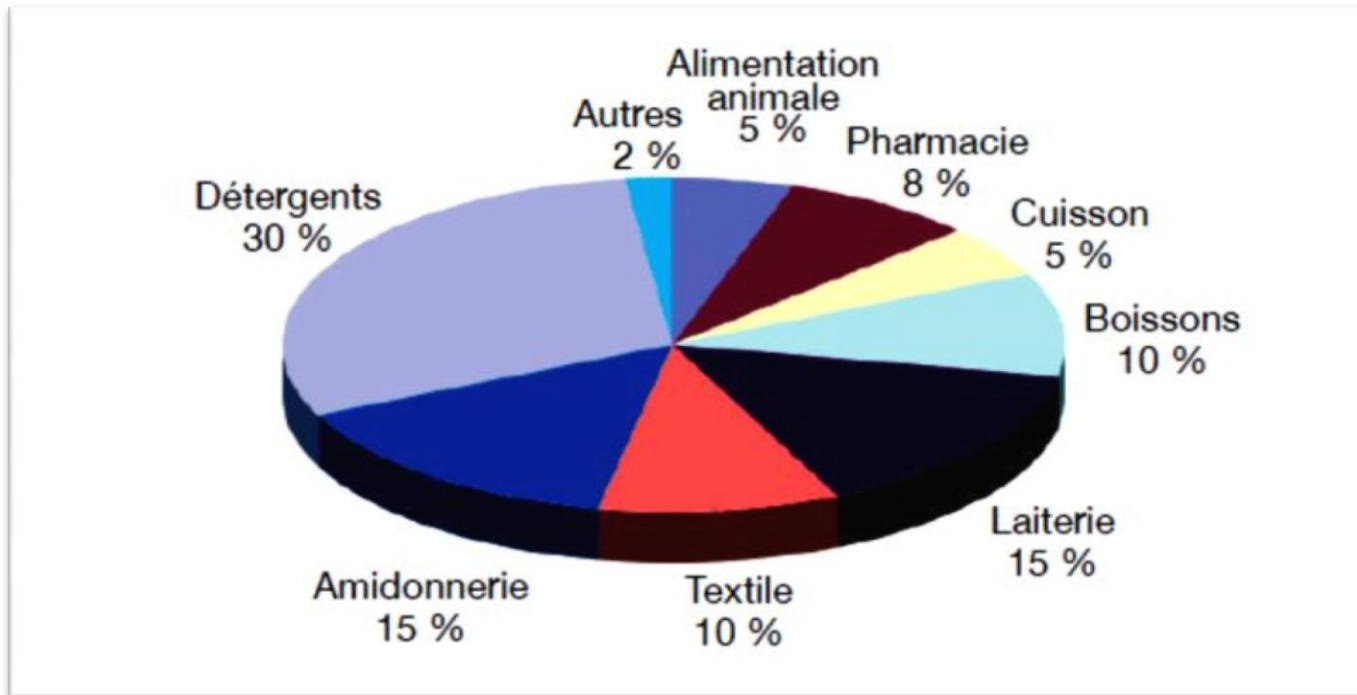
Pour certaines enzymes, la stabilité peut être obtenue en les gardant dans des suspensions de sulfate d'ammonium.

Toutes les enzymes utilisées dans les aliments ou les traitements médicaux doivent être de pureté élevée.

1.6. Domaine d'utilisation d'enzymes

Le tableau 2 montre quelques domaines d'utilisation d'enzymes microbiennes.

Enzymes	Microorganismes	Utilisation
Lipases	<i>Micrococcus</i>	Production de fromage
B-glucanase	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>A. niger</i>	Brasserie
B-galactosidase	<i>A. niger</i> , <i>Candida pseudotropicalis</i>	Suppression lactose du lait
Cellulase	<i>A. niger</i> , <i>Trichoderma reesii</i>	Hydrolyse cellulose
Invertase	<i>Sc. cerevisiae</i>	Hydrolyse saccharose
Pectinase	<i>A. niger</i> , <i>Trichoderma reesii</i>	Clarification jus de fruit.
Rénine	<i>Alcaligenes</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i>	Fabrication du fromage
Catalase	<i>A. niger</i> , <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Stérilisation lait, beurre



Répartition du marché des enzymes dans le domaine industrielle

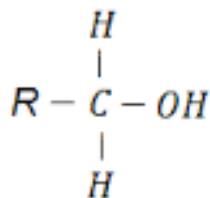
2. Production des alcools

Un alcool est un composé organique dont l'un des carbones est lié à un groupe hydroxyle (OH).

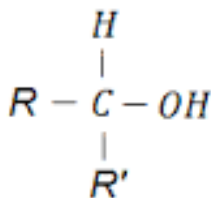
2.1. Classification

Selon la nature du radical lié le carbone portant le groupement OH, on distingue:

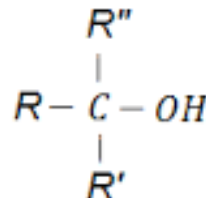
- Les alcools primaires, dont le carbone comportant le groupement hydroxyle est lié à deux atomes d'hydrogène et un radical organique R.
- Les alcools secondaires, dont le carbone comportant le groupement hydroxyle est lié à un atome d'hydrogène et deux radicaux organiques R et R'.
- Les alcools tertiaires, dont le carbone comportant le groupement hydroxyle est lié à trois radicaux organiques R, R' et R''.
- Les phénols, sont considérés comme des alcools particuliers dont le groupement hydroxyle est lié à un carbone d'un cycle benzénique.



Alcool primaire



Alcool secondaire



Alcool tertiaire

2.2. Domaines d'utilisation des alcools

Les alcools sont utilisés dans l'industrie chimique comme :

Solvant: l'éthanol, peu toxique, est utilisé dans les parfums et médicaments.

Réactifs: les esters peuvent être synthétisés à partir des alcools.

Antigels: la basse température de solidification de certains alcools comme le méthanol et l'éthylène glycol en font de bons antigels.

2.3. Les voies métaboliques de la synthèse des alcools

La fermentation alcoolique est un processus biochimique par lequel des sucres (glucides, principalement le glucose) sont transformés en alcool (éthanol) et CO_2 , en absence d'oxygène.

Alors que, chez les eucaryotes, la totalité du glucose est métabolisé par la voie de glycolyse, les micro-organismes possèdent une variété d'autres voies qui fonctionnent souvent en parallèle.

2.4. Microorganismes producteurs des alcools

Fermentation par les levures

Saccharomyces cerevisiae, une souche utilisée industriellement pour la fermentation alcoolique, elle utilise le glucose comme une source de carbone, d'autres espèces de levures peuvent convertir le xylose en éthanol (*Pichiastipitis*, *Candida*..).

Fermentation par les bactéries

Le xylose est converti en éthanol par plusieurs espèces de bactéries thermophiles comme:

Thermoanaerobacterethanolicus, *Clostridiumthermohydrosulfuricum* ou par des souches modifiées génétiquement de *Bacillus stearothermophilus*. Des bactéries mésophiles comme *Escherichia coli* et *Klebsiellaoxytoca* ou *K.planticola* sont également capables de fermenter les pentoses.

3. Production des acides organiques

Un acide organique est un composé capable de libérer un cation (ion chargé positivement) H en milieu aqueux. Les acides organiques les plus courants sont les acides carboxyliques: acide lactique, acide acétique, Acides propionique, acide butyrique, acide citrique...etc.

3.1. Domaine d'utilisation des acides organiques

Les acides organiques sont des additifs très utilisés dans l'industrie alimentaire.

Ils peuvent servir d'agents de conservation, d'acidifiants, d'antioxydants et d'émulsifiants (des grandes quantités d'acides organiques peuvent être produites au cours du métabolisme normal de certains microorganismes).

3.2. Micro-organismes producteurs des acides organiques

Les espèces microbiennes impliquées dans la production des acides organiques se différencient selon le type de l'acide d'intérêt industriel recherché.

Tableau 3. Les acides organiques produits par les micro-organismes et leurs utilisations en industrie alimentaire

Additifs alimentaires	Microorganismes producteurs	Exemples d'utilisations
Acide acétique	<i>Acetobacter aceti</i>	Agent de conservation dans les mayonnaises, produit pharmaceutiques.
Acide gluconique	<i>Aspergillus niger</i>	Acidulant pour viandes, renforce le gout dans la margarine, etc.
Acide fumarique	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
	<i>Rhizopus</i>	Acidulant dans les jus de fruits, desserts à la gélatine, biscuits secs, lait en poudre.
	<i>Mucor</i>	
Acide malique	<i>Penicillium brevicompatum</i>	Acidulant dans les confiseries, jus de fruits, crème glacée, etc.
	<i>Leuconostoc</i>	
	<i>Aspergillus oryzae</i>	
Acide tartrique	<i>Penicillium notatum</i>	Acidulant pour boissons, gelées, etc.
Acide propionique	<i>Propionibacterium sp.</i>	Agent de conservation de nombreux aliments, dont les pâtisseries, etc.

3.3. Voies métaboliques de production des acides organiques

La production des acides organiques se commence par la dégradation du glucose (glycolyse) et la formation du pyruvate, puis la transformation du pyruvate en acide organique (fermentation).

4. Synthèse des vitamines (B12, B2, A)

Les vitamines sont des substances organiques nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Le corps humain ne peut généralement pas les produire seul, et leur apport alimentaire est indispensable. Il s'agit d'un groupe de molécules chimiquement très hétérogènes. Ce sont des substances de faible poids moléculaire.

4.1. Classification des vitamines

On distingue 13 vitamines différentes, que l'on classe en deux groupes selon leur solubilité : les vitamines liposolubles et vitamines hydrosolubles.

4.1.1. Les vitamines hydrosolubles

Ce sont la vitamine C et les vitamines du groupe B (B1, B2, B3 ou PP, B5, B6, B8, B9 et B12). Elles sont solubles dans l'eau, et par conséquent se dispersent dans les liquides de l'organisme, sans être stockées : ce facteur les rend très peu toxiques, puisque même en cas de surconsommation, elles sont évacuées dans les urines. Cela fait aussi que si l'alimentation n'apporte pas régulièrement plus de 50% des apports recommandés, de petites carences peuvent se développer en l'espace d'un mois. Leur effet maximal dans l'organisme survient 8 à 14h après ingestion. De manière générale, les vitamines hydrosolubles sont apportées en majorité par les fruits et légumes.

4.1.2. Les vitamines liposolubles

Ce sont les vitamines A, D, E et K. elles sont dissoutes et stockées dans les tissus adipeux, ce qui peut les rendre toxiques à haute dose. Cette propriété fait également que l'on peut les apporter de manière moins régulière que les vitamines hydrosolubles. De manière générale, les vitamines liposolubles sont apportées par les lipides alimentaires (huiles, poissons gras, jaunes d'œufs, abats, foie, etc.), à l'exception de la vitamine D dont la seule source vraiment intéressante reste le soleil.

4.2. Biosynthèse des vitamines par les micro-organismes

Les microorganismes phototrophes sont capables de synthétiser tous les facteurs de croissance, et en particulier toutes les vitamines dont ils ont besoin (certains sont libère dans le milieu avec des quantités intéressantes). Il est possible, de préparer par des microorganismes la plupart des vitamines ou provitamines (panthoténate, pyridoxine, biotine, thiamine, acide folique, précurseurs des vitamines A, C, D, vitamine K...). Certaines de ces productions ont un grand intérêt industriel, comme la vitamine B2 ou riboflavine et la vitamine B12 ou cyanocobalamine dont la seule source est microbienne. En outre, le β -carotène, précurseur de la vitamine A, est souvent préparé par voie microbiologique.

4.3. Micro-organismes producteurs des vitamines

Le tableau 4 montre quelques micro-organismes producteurs des vitamines.

Tableau 4. Quelques micro-organismes producteurs des vitamines.

Vitamine	Microorganismes producteurs
A	Champignon : <i>Blakeslea trispora</i> Levure: <i>Rhodotorula gracilis</i> Algue : <i>Dunaliella sp</i>
B2	Bacterie : <i>Clostridium acetobutylium</i> Champignon : <i>Ashbya gossypi</i> , <i>Eremothecium ashbyii</i> Levure: <i>Pichia miso</i>
B12	Bacteries: <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Streptomyces olivaceus</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>denitrificans</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i>

5. Production des antibiotiques

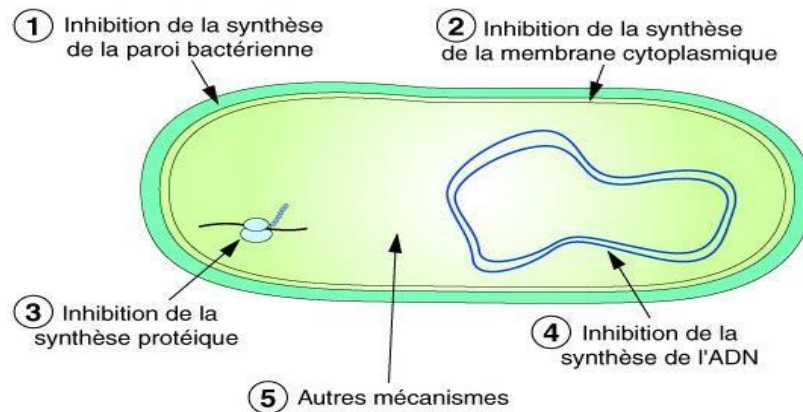
Un antibiotique est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit (bactéricide) ou bloque la croissance des bactéries (bactériostatique). Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée. Un grand nombre d'antibiotiques sont des molécules naturelles, fabriquées par des champignons ou bactéries. Cette production pour éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles dans leur environnement.

5.1. Mécanismes d'action des antibiotiques

Les mécanismes d'action des antibiotiques sont très variables. Ils sont plus ou moins spécifiques de certaines familles bactériennes. Les antibiotiques naturels utilisés en thérapeutique sont produits par des bactéries ou des mycètes. Les antibiotiques synthétiques sont habituellement des analogues ou des dérivés d'antibiotiques naturels.

Parmi des centaines d'antibiotiques connus, la plupart sont toxiques pour les cellules eucaryotes. Les mécanismes d'actions des antibiotiques sont les suivant:

1. Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire.
2. inhibition de la synthèse de la membrane cellulaire.
3. Inhibition de la structure et de la fonction des acides nucléiques.
4. Inhibition de la synthèse des protéines.
5. Blocage des voies métaboliques clés.



Mécanismes d'action des antibiotiques sur les bactéries

5.2. Les microorganismes producteurs des antibiotiques

La plupart des métabolites secondaires sont en fait biosynthétisés par des microorganismes filamenteux comme les actinomycètes (environ 75%) et les moisissures (comme le genre *penicilium*) (17%). Environ 20 types de métabolites secondaires peuvent être produits par les espèces *Streptomyces* seules. Les streptomycètes sont des producteurs puissants de métabolites secondaires, car environ 45 à 55% des 10 000 antibiotiques archivés sont fabriqués par ce genre. Plusieurs antibiotiques ont également été isolés de différentes souches de *Bacillus* (*B. moenomycines*, *B. difficidins*, *B. bacilllines* et *B. bacilles*). *Mycobacterium* est un autre genre de bactéries avec une production 'intéressante d'antibiotiques (environ 80% des *Mycobacterium* isolés produisaient des composés antibiotiques et antifongiques).

5.3. Production industrielles des antibiotiques

Le milieu de production doit d'abord permettre d'assurer une importante croissance pour conduire à une concentration élevée en cellule au moment de la production. Il doit assurer ensuite la maintenance de la vitalité des cellules et la production optimisée de l'antibiotique. Il doit de ce fait fournir des sources d'énergie et assurer les conditions physico-chimiques désirées (pH, T°, oxygénation).

6. Production des hormones

Les hormones sont des molécules organiques pouvant influencer la physiologie et le développement des plantes et des animaux, et ce, même en faible concentration.

Des hormones naturellement présentes telles que la progestérone, la testostérone, l'œstrone et celles du cortex peuvent actuellement être synthétisées par des microorganismes et à faible coût.

• **L'hormone de croissance humaine** : ou HGH (*Human Growth Hormone*) utilisée pour traiter les déficiences hypophysaires entraînant le nanisme (hypopituitarisme), était précédemment obtenu en prélevant les glandes pituitaires d'humains décédés. Obtenir suffisamment d'hormone était à la fois difficile et coûteux, l'utilisation de cette hormone était très limitée. L'hormone de croissance extraite des animaux n'est pas efficace sur l'homme. Le gène pour la synthèse de l'hormone de croissance a été introduit chez *E. coli*, et cette bactérie génétiquement modifiée, constitue à présent, la source commerciale de l'hormone.

• **L'insuline humaine** : Avant de produire l'insuline par des microorganismes, on utilisait celle, extraite des porcs ou des bœufs. Du point de vue structural, ce n'est pas précisément la même que l'insuline humaine, et elle n'est de ce fait pas aussi efficace. Avec le développement du génie génétique, depuis 1984, la production à grande échelle de l'insuline est réalisée commercialement avec la bactérie *E. coli* génétiquement modifiée. En 1987, l'insuline est produite avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

7. Production des vaccins

Les antigènes génétiquement modifiés sont maintenant une réalité grâce aux avancées des biotechnologies. Ces antigènes présentent plusieurs avantages par rapport aux antigènes extraits de bactéries pathogènes ou de virus, et sont généralement plus efficaces que les préparations bactériennes ou virales atténuées. Les antigènes générés par des bactéries sont moins coûteux, plus facilement purifiés et exempts de contaminants par d'autres protéines.