

## Chapitre 2 : Les Microorganismes Industriels (Isolement, Sélection et Amélioration des Souches)

### 1. Introduction

Les micro-organismes sont largement utilisés en industrie pour réaliser des fins utiles à l'homme. Ils se sont avérés particulièrement utiles en raison de la facilité de leur culture, de la rapidité de leur croissance, de leur pouvoir à utiliser des substrats bon marché (qui dans de nombreux cas sont des déchets de l'industrie agro-alimentaire), et de leur capacité à subir facilement des manipulations génétiques. Les microorganismes utilisés en industrie sont généralement :

Les champignons (Levures et moisissures) et certains procaryotes et le groupe des actinobactéries en particulier le genre *Streptomyces* ainsi que les archaebactéries.

### 2. Exemples des microorganismes utiles dans l'industrie

#### 2.1. Les Archaea :

##### 2.1.1. Description :

- ✓ Sont des microorganismes unicellulaires procaryotes (êtres vivants constitués d'une cellule unique qui ne comprend ni noyau ni organites). D'apparence souvent semblable aux bactéries, les archées ont longtemps été considérées comme des bactéries extrémophiles (thermophile extrême) particulières.
- ✓ Elles sont présentes notamment dans les sources hydrothermales océaniques, les sources chaudes volcaniques ou encore les lacs salés, sol, l'eau de mer, des marécages, la flore intestinale.
- ✓ Les archées interviennent par ailleurs de façon non négligeable dans le cycle du carbone et le cycle de l'azote.

Les Archaea se composent de trois groupes phénotypiques principaux:

- **Les Archaea productrices de méthane (Methanoarchaea):** sont anaérobies strictes, vivent dans les environnements les plus anaérobies sur la Terre, incluant les sols inondés, les rizières, les sédiments lacustres, les sédiments marins et le tube digestif des animaux. Elles sont psychrophiles, mésophiles et thermophiles. Elles interviennent dans le cycle de carbone.
- **Les Archaea halophiles extrêmes (Haloarchaea):** ne se développent qu'à des concentrations de NaCl supérieures à 1,8 M. elles sont aérobies facultatives ou

obligatoires. La plupart utilisent les acides aminés, les hydrates de carbones ou les acides organiques comme source d'énergie.

- **Les Archaea thermophiles extrêmes** : croissent à des températures supérieures à 80°C, elles sont donc restreintes aux environnements dans lesquels l'énergie géothermique est disponible comme les sources chaudes, les solfatares, les sédiments marins chauffés par géothermie.

### 2.1.2. Applications industrielles :

Les Archaea qui présentent un intérêt industriel sont essentiellement les thermophiles extrêmes.

-Les enzymes des Archaea thermophiles extrêmes peuvent avoir des applications commerciales importantes à cause de leur température optimale élevée et leur thermostabilité:

-L'activité à haute température est une caractéristique capitale parce que plusieurs procédés industriels se déroulent à des températures entre 50 et 100°C.

-Les enzymes qui ont une température optimale élevée sont moins coûteuses que les autres (elles donnent la même activité avec un nombre moins d'enzymes).

-La résistance à la chaleur est corrélée à une résistance plus élevée aux températures moyennes et aux produits chimiques dénaturants.

### 2.2. Les Bactéries :

- Les bactéries sont des organismes procaryotes unicellulaires (une cellule équivaut à un individu).
- Les cellules bactériennes présentent différentes formes (les coques, les bacilles, les coccobacilles, les vibrions, les spirales...), elles présentent ainsi différents modes de regroupement ( en amas, en chapelet, en grappe...).
- L'appareil nucléaire des bactéries est constitué d'un chromosome unique (circulaire, refermé sur lui-même, ne contient pas des régions répétitives de grande taille) situé dans le cytoplasme.
- Il peut y avoir du matériel génétique extra-chromosomique: plasmide (ADN bicaténaire circulaire, transmissible).
- Selon la source de carbone et d'énergie nous avons les bactéries: photoautotrophes, les photohétérotrophes, les chimioautotrophes, les chimiohétérotrophes .

### 2.2.1. Exemples des Bactéries d'intérêt industriel :

#### a- Les bactéries de vinaigre: *Acetobacter* et *Gluconobacter*

Le vinaigre est utilisé comme conservateur et pour l'assaisonnement.

Les deux genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* sont les principaux microorganismes responsables de la production de vinaigre.

Ces deux genres sont des hôtes naturels des fleurs, fruits, miel, cidre et autres. *Acetobacter* et *Gluconobacter* sont des Gram-négatifs capables d'oxyder l'éthanol en acide acétique.

Sont des agents néfastes en vinification industrielle. De plus, ils causent la viscosité, la turbidité et les goûts désagréables dans les boissons y compris les boissons non alcoolisées (sodas, jus de fruits).

Le genre *Acetobacter* est utilisé aussi industriellement pour la production des acides cétoniques comme l'acide ascorbique (vitamine C).

#### b- Bactéries de production des acides aminés, sucres et dérivés

- *Escherichia coli*: est une bactérie à Gram-négative appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, sous-classe  $\gamma$ -*Proteobacteria*.

- *E. coli* (enzymes) est utilisées pour la production de plusieurs acides aminés, notamment le L-tryptophane (tryptophanase) et le L-thréonine.

- *E. coli* est utilisée aussi pour la production de certains sucres comme la bioconversion du L-rhamnose en L-rhamnulose.

- L'enzyme glucose isomérase d'*E. intermedia* et *E. freundii* est utilisée dans la production de fructose (conversion du glucose en fructose).

#### c- Bactéries lactiques

- Elles produisent l'acide lactique qui permet d'acidifier le substrat et par conséquence d'inhiber la prolifération de germes pathogènes ou d'agents indésirables provoquant des modifications organoleptiques.

- Les bactéries lactiques sont utilisées dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les légumes fermentés (olives, cornichons, choucroute), les boissons alcooliques fermentées (vin, bière, cidre), la charcuterie (jambon, saucissons) et le pain au levain.

- Les bactéries lactiques sont présentes dans de nombreux milieux naturels, allant du sol, des plantes en décomposition, aux animaux. Le tractus gastrointestinal des mammifères

est colonisé par des bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*.

- Les bactéries lactiques sont aéroanaérobies ou microaérophiles, exigeantes d'un point de vue nutritionnel car elles sont incapables de synthétiser un certain nombre d'acides aminés.

#### **Rôle des bactéries lactiques dans l'industrie**

- **Fermentation des glucides :** Les bactéries lactiques étant incapables d'obtenir leur énergie par la respiration, elles recourent à la fermentation des glucides en acide lactique.
- **Métabolisme du citrate:** Dans l'industrie laitière, l'acide citrique présent dans le lait est considéré comme le principal précurseur de la formation des composés aromatiques appréciés comme l'acétate.
- **La production de bactériocines:** Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram-positives.

## 2. 3. Les champignons

### 2.3.1. Les moisissures :

- Ce sont en général des organismes pluricellulaires, la plupart des moisissures sont hétérotrophes, certaines espèces possèdent un métabolisme mixte.
- Les moisissures sont à l'origine de la découverte de la pénicilline, le premier antibiotique réellement efficace. Il est produit naturellement par les moisissures du genre *Penicillium*.

#### a- *Aspergillus niger*

C'est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales, il apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes.

*Aspergillus niger* est une espèce importante sur le plan économique car elle est utilisée en fermentation industrielle pour produire de:

- **L'acide citrique:** utilise dans l'industrie agroalimentaire comme acidifiant et antioxydant pour renforcer les saveurs et conserver les jus de fruits.
- **L'acide gluconique:** est un constituant naturel des jus de fruit qui est largement utilisé dans les médicaments, la nourriture, les détergents, le textile, le cuir etc.

- **Les enzymes:** comme la glucose oxydase, la catalase et les hydrolases (cellulase, xylanase, pectinase) qui sont les principales enzymes utilisées dans la production des bières et des boissons sucrées.

#### b- *Penicillium* :

Les *Penicillium* sont des champignons filamenteux.

Ce sont des champignons très communs dans l'environnement pouvant être responsables de nombreuses dégradations.

Diverses espèces sont cultivées au niveau industriel pour la fabrication de:

Le fromages (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium camembertii*).

La production de métabolites : Les antibiotiques de type pénicillines (*Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*) ; L'acide gluconique (par *Penicillium purpurogenum*).

### 2.3.2. Les levures :

La levure est un champignon unicellulaire capable de provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales.

Pour la plupart, elles appartiennent à la division *Ascomycota*, de la règne *Fungi*.

Les levures sont utilisées pour la fabrication du vin, de la bière, des alcools industriels, des pâtes levées et d'antibiotiques. Exemple: La levure de boulanger est une levure obtenue à partir de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* seules ou en mélange, utilisée pour obtenir une fermentation du pain lors du processus de panification.

### 2.4. Les Algues :

- Les algues sont des organismes capables de pratiquer la photosynthèse et vivant majoritairement dans un milieu aquatique, ce sont donc des végétaux (dépourvues de tige, de racine, de feuille ou de fleur).

-Les algues peuvent être unicellulaires et de tailles microscopiques, elles constituent le phytoplancton, d'autres espèces sont multicellulaires peuvent atteindre des tailles impressionnantes .

- De nombreuses espèces sont comestibles pour l'Homme ou les animaux.

- Elles servent également d'engrais.

- Plusieurs projets essaient d'exploiter les algues pour la production de biocarburant.

- Les algues sont exploitées pour fournir de la soude (carbonate de sodium) et l'iode.
- Les algues sont aussi exploités, pour la production de gélifiants nécessaires à l'industrie alimentaire et chimique.
- Les alginates (type de gélifiant) produits par les algues (*Ascophyllum nodosum*) contribuent à la fabrication de nombreux produits dans des domaines aussi variés que la chimie, l'alimentation, les cosmétiques, l'environnement et la santé.

### 2.5. Les virus :

- Un virus est un agent infectieux nécessitant un hôte (parasite obligatoire).
- Les virus sont classifiés selon la nature de l'acide nucléique de leur génome (ADN ou ARN), la structure de l'acide nucléique (monocaténaire ou bicaténaire), la forme de l'acide nucléique (linéaire, circulaire, segmenté ou non).
- Ce sont des outils utilisés par exemple pour faire acquérir à une cellule la capacité de produire une protéine d'intérêt ou pour étudier l'effet de l'introduction du nouveau gène dans le génome. Exemple: Les baculovirus sont des virus d'insectes très étudiés, ils constituent des moyens pour limiter ou remplacer les insecticides chimiques.

## 3. La stratégie suivie pour la recherche de nouvelles souches industrielle.

### 3.1 Isolement des souches.

Cette étape est aléatoire, puisqu'il s'agit de prélever des microorganismes, en rapport avec l'organisme recherché, sur un aliment, le sol...etc. Le prélèvement est ensuite ensemencé sur un milieu approprié afin d'isoler le germe recherché. L'étape suivante consiste à isoler et purifier les différents clones obtenus. La purification est réalisée par strie d'épuisement. Cette technique permet l'isolement de colonies, et l'obtention des cultures pures.

### 3.2 Sélection des microorganismes industriels.

Après l'isolement, les microorganismes obtenus subissent ensuite une sélection selon leur aptitude biologique et technologique.

Rendement élevé : pouvoir de produire la molécule d'intérêt ou la biomasse dans une courte période.

- Des critères biologiques spécifiques aux microorganismes et leur application. Par exemple, les ferments lactiques sont sélectionnés selon leur pouvoir acidifiant et aromatisant ainsi qu'à la production des bactériocines.

- Non pathogènes et ne produisent pas de métabolites indésirables comme les toxines.

- Facile à manipuler génétiquement.
- Croître sur des substrats bon marché (les déchets d'industrie agroalimentaire).
- Ne possèdent pas d'exigence spécifique vis-à-vis des facteurs de croissances.
- Stable génétiquement, surtout après leur conservation par congélation ou lyophilisation.
- Pourvoir de résister aux différents procédés technologiques.
- La résistance aux bactériophages : ce critère met en jeu des enzymes de restriction, et qui est lié au nombre et la forme des protéines de surface qui sont autant de points d'attaches aux bactériophages.

### 3.3. Identification moléculaire des souches sélectionnées.

Lorsqu'une souche est retenue et répond aux critères de sélection, elle fait l'objet d'une identification moléculaire sur la base de séquençage d'ADNr 16s .

## 4. Amélioration des souches sélectionnées.

### 4.1. Objectifs

Augmenter la capacité de production (du produit) des microorganismes.

- Amélioration de la spécificité de substrat et de la vitesse de production.
- Amélioration des nouvelles voies de production.

Amélioration de la résistance aux conditions défavorables (température, pH, toxine, bactériophage).

### 4.2. Amélioration génétique des souches : il existe deux méthodes

#### a- Manipulation du matériel génétique n'impliquant pas de l'ADN étranger ( Mutation conventionnelle (mutagènes) :

##### ➤ Agents physiques:

- Radiations ionisantes: rayons X, rayons gamma, particules alpha, neutrons accélérés.
- Rayon UV (200 et 300 nm): Formation de liaison covalente entre pyrimidines (C et T).

##### ➤ Agents chimiques: trois types:

- **Agents actifs sur l'ADN en phase de non réplication:** Acide nitrique (nitrate de sodium).
- **Analogues de l'ADN:** des composés qui sont structurellement similaires à l'ADN, ils permettent des modifications de la structure de la chaîne, en remplaçant le squelette phosphate.
- **Agents causants le changement du cadre de lecture:** des molécules peuvent s'intercaler dans l'ADN, dans l'espace compris entre deux paires de bases, on peut citer l'éthidium et la proflavine.

**b- Manipulation du matériel génétique impliquant de l'ADN étranger :** Les méthodes utilisées sont:

- **La transduction** : est le transfert d'information génétique à partir d'un donneur vers un receveur via un bactériophage. Très pratique pour les bactéries mais peu pour les mycètes.
- **La conjugaison** : consiste en une transmission de plasmides de conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse et son intégration dans le génome de celle-ci.
- **La transformation** : est le transfert de gènes résultant de l'absorption d'ADN nu par une cellule receveuse à partir d'une cellule donneuse (exposition à une solution d'ADN). La méthode à un bon potentiel industriel.
- **La recombinaison** : c'est le réarrangement ordonné de l'ADN, il implique une cassure et une ligature des brins d'ADN pendant le processus du réarrangement.
- **Fusion des protoplastes**: permet de fusionner deux espèces différentes pour former un nouvel hybride héritant des propriétés génétiques des deux espèces d'origine.
- **Mutation dirigée sur un site**: est l'induction d'une ou plusieurs mutations dans un génome, de façon précise et volontaire. - Cette méthode nécessite un groupe d'enzymes spécialisées qui reconnaissent les sites cibles.
- **Ingénierie métabolique**: création ou modification de voies métaboliques par manipulation des gènes de la voie, dans le but d'améliorer la production d'un métabolite, d'éliminer ou de réduire un métabolite indésirable, ou de changer la production vers un nouveau métabolite.
- **Ingénierie génétique (technologie de l'ADN recombinant, clonage moléculaire, clonage de gènes)**
  - Excision d'une portion spécifique de l'ADN du donneur.
  - Insertion de cette portion dans un ADN répliatif (vecteur, exp: plasmide).
  - Transfert de l'ADN recombinant dans la cellule hôte.
  - Isolement des cellules hôtes qui ont efficacement reçues l'ADN recombinant.

## 5. Conservation des souches

**5.1. Les cultures de collection**: chaque bioindustrie possède une collection des microorganismes en conservation. Les types des collections :

• **Collection de différents microorganismes: American Type Culture Collection (ATCC)**: centre de ressources biologiques, dont la mission se concentre sur l'acquisition, la



production, la conservation, le développement et la distribution des micro-organismes et d'autres matériaux pour la recherche dans les sciences de la vie.

**•Collection spécifique:**

- Les pathogènes : National Collection of Type Cultures (NCTC) en London
- Souches industrielles: National Collection of Industrial Bacteria (NCIB) en Scotland
- Type particulier (les mycètes): Center of Braun Sveitzer (CBS) en Holland

**5.2. Méthodes de Conservation :** le choix est en fonction de microorganisme et le but recherché :

**Principe:** diminuer la vitesse du métabolisme de l'organisme.

Les méthodes de préservation (conservation) impliquent un ou plusieurs des techniques suivantes:

- a- Réduction de la température de croissance.
- b- Dessiccation ou déshydratation du milieu de culture.
- c- Limitation des nutriments disponibles au microorganisme.

**a) Méthodes basées sur la réduction de la température de croissance**

**1.Préservation sur l'agar avec réfrigération ordinaire (4-10°C):**

- Les microorganismes aérobies: gélose inclinée.
- Les microorganismes anaérobique: gélose profonde + paraffine ou de huile.
- Stockage de 3 a 12 mois

**Les avantages :** méthode peu couteuse car ne nécessitent pas d'équipement spéciaux

**Les inconvénients :**

- La température de réfrigération ne limite pas complètement la croissance des microorganismes et donc nécessité un repiquage répétitif de la souche.
- Risque de contamination et de mutation consécutif au repiquage répétitif.
- Occuper un volume important.

**2. Préservation dans des congélateurs (de -20°C jusqu'à -80°C):**

- Des morceaux de culture solide + un cryoprotecteur (glycérol, raffinose, lactose, ou tréhalose).
- Des billes en verre dans un bouillon de culture + cryoprotecteur.

**Avantages**

- La méthode est simple et nécessite peu d'équipement.
- Stockage jusqu'à 3 ans.
- Utilisable pour différents types d'organisme.

- Les tubes requièrent peu d'espace.
- Les billes se dégèlent rapidement, donc économie de temps.
- Utilisation de différentes couleurs de billes, donc facilité la reconnaissance des microorganismes.
- La méthode est adaptée pour les aérobies et les anaérobies

### 3. Préservation dans la phase liquide ou vapeur de l'azote (-156-196°C):

**Méthode:** bouillon de culture + 10 à 20% glycérol ou 5-10% diméthylsulfooxyde (DMSO)

- Elle est souhaitable pour les microorganismes qui ne supportent pas la lyophilisation.
- Méthode de choix pour la préservation des organismes précieux.

#### Inconvénients

- Remplacement régulier de l'azote liquide (il s'évapore).
- Risque d'explosion de la paille durant le dégèlement.
- L'équipement est très cher.
- Mauvaise méthode pour le transport.

#### b) Méthodes basées sur la déshydratation

Principe : élimination de l'eau nécessaire au métabolisme.

**1. Séchage sur un gel de silice stérile:** Un tube à vis est demi rempli de gèle de silice et stérilisé au four. Après refroidissement, la suspension du microorganisme est versé dans le tube qui sera séché à 25°C, puis stocké dans un container contenant un dessicatif.

**2. Séchage sur un papier filtre stérile :** pour les spores.

**3. Séchage dans un sol stérile :** surtout pour les microorganismes sporulants.

**4.Lyophilisation (congélation-séchage, cryodessiccation):** consiste à ôter l'eau libre de l'échantillon à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre (lyophilisateur).

#### Avantages :

- Utilisable pour la conservation de quantités importantes des microorganismes dans l'industrie.
- Un équipement relativement peu couteux.
- Les ampoules occupe peu d'espace.
- La longévité des organismes (jusqu'à 10 ans).

#### c) Méthodes basées sur la réduction des nutriments

Méthodes: Préservation dans de l'eau distillée stérile (avec ou sans réfrigération).

- Peu d'organismes sont préservées par cette méthode