

Chapitre III :

3. Métabolites microbiens d'importances économiques

3.1. Les enzymes

-Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique complexe. Elles sont purifiées à partir de diverses matières biologiques premières. Seules les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu une expansion significative, et sont préparées industriellement, car les micro-organismes présentent de nombreux avantages comme source d'enzymes: croissance exponentielle et la disponibilité.

-Pour la production d'une enzyme industrielle, le choix de la souche appropriée est déterminant, surtout dans la majorité des cas ce sont les applications à des fins alimentaires qui ont connu un développement significatif.

Isolement et sélection des souches microbiennes productrices d'enzymes

Les microorganismes qui sont capables de produire des enzymes de dégradation de certains composés sont généralement localisés où ces substances sont abondantes. Par exemple, des microorganismes sécrétant des cellulases sont nombreux dans les sols des forêts. Les méthodes d'isolement sont des méthodes classiques avec des milieux sélectifs. Dans le milieu sélectif idéal, le substrat de l'enzyme est la seule source de l'un des éléments vitaux. Par exemple, L'amidon comme seule source de carbone pour isoler les microorganismes possédant une amylase. Les souches isolées pour être définitivement retenues doivent présenter un certain nombre de caractéristiques :

- Se développer sur un milieu simple.
- Produire le moins possible de métabolites secondaires, comme les antibiotiques.
- Excréter l'enzyme de façon à ce que celle-ci soit facilement séparée et purifiée et ne pas conduire à différents polluants.
- Ne pas être pathogène ou produire des composés toxiques.
- Si la préparation enzymatique va entrer en contact avec les aliments, la souche doit avoir le caractère d'alimentarité, c'est-à-dire faire partie des souches G.R.A.S. (*Generaly Recognizer As Safe*).

La capacité de production de la souche doit être préservée et tout risque de contamination doit être éliminé. Pour cela, il faut éviter un trop grand nombre de cultures successives.

Composition de Milieux pour production d'enzymes d'origine microbienne :

- Les matières premières comptent pour 60 à 80 % du prix de revient dans une production d'enzyme par fermentation. La composition du milieu doit être définie avec soin et beaucoup de travaux de recherche ont pour objet le remplacement de composés chers par d'autres, disponibles en plus grandes quantités, de moindre prix. Ces composés doivent être utilisés le plus complètement possible pour réduire les rejets. La composition du milieu de culture doit tenir compte des étapes de production et d'extraction. Pour la production de pectinase, cellulase, catalase, invertase, B-galactosidase, les milieux employés sont composés de :

- Source de C : Farine de céréales : soja, amidon, pomme de terre, riz, son, mélasses.
- Source de N : farine de poisson, gélatine, farine de soja, de son et de peptone.
- Facteurs de croissance : extrait de levure.

Les enzymes dans différents secteurs industriels

- Dans la nature, les microorganismes utilisent les enzymes pour dissocier les protéines, l'amidon, la pectine, les lipides et d'autres grandes molécules insolubles. Ces dernières sont réduites en monomères, servant de sources de carbone et d'énergie pour eux-mêmes ou pour d'autres organismes présents dans l'environnement.
- Ces enzymes hydrolytiques sont généralement extracellulaires ou localisées sur la surface de bactéries ou de champignons. En tant qu'enzymes extracellulaires, elles peuvent être récupérées très aisément du milieu de culture.
- Les enzymes sont utilisées dans toutes les industries de la fermentation, que ce soit pour les produits agroalimentaires, dans l'industrie pharmaceutique (antibiotiques, acides divers, vitamines), l'industrie biomédicale (réactifs), les industries du nettoyage et de la décontamination (détergents, traitement de l'eau et des surfaces)
- La production de protéases bactériennes est un processus industriel important en volume et en valeur. Plus de 500 tonnes de ces enzymes sont produites chaque année. Elles sont majoritairement utilisées dans la fabrication de détergents et de fromages. Les enzymes utilisées dans les détergents sont des protéases de souches sélectionnées de *Bacillus amyloliquefaciens*. Elles sont ajoutées aux détergents pour augmenter la solubilisation des taches présentes sur le matériel à laver. Un des problèmes majeurs soulevés par l'utilisation de protéases dans les détergents est la réponse allergique aux protéines bactériennes.

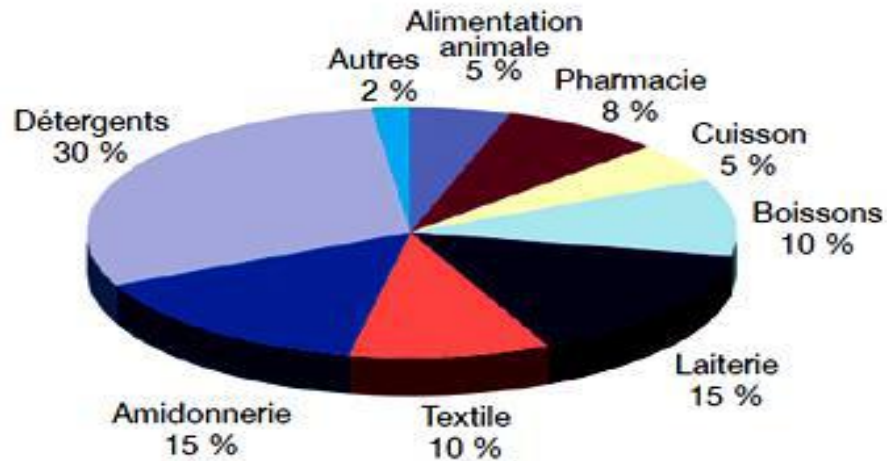


Figure : parts de marché occupées par les enzymes dans différents secteurs.

La production industrielle des enzymes est obtenue à partir des cultures industrielles des bactéries et des champignons par fermentation, une fois la fermentation est achevée, les enzymes sont purifiées, et elles sont alors commercialisées sous des formes variées : liquide, concentrée, poudre. Les enzymes les plus répandues, parmi celles qui sont produites à l'échelle industrielle sont les protéases et les amylases.

Dans l'utilisation industrielle des enzymes, qui sont de nature soluble, il est souvent bénéfique de les immobilisées sur un support insoluble. Les enzymes sont immobilisées de 3 manières principales :

Fixation : l'enzyme est fixée sur un support insoluble (charbon actif, cellulose modifié, verre poreux, etc.) par divers types de liaisons.

Inclusion : c'est l'incorporation physique des enzymes dans des structures semi-perméables : microcapsule, gels, dans ce type d'immobilisation, l'enzyme garde sa forme soluble initiale qui est bien sur la plus avantageuse.

Polymérisation : les molécules enzymatiques sont liées les uns aux autres en réseau, grâce à des agents de liaisons bifonctionnels tel que le glutaraldehyde, les liaisons entre enzymes sont covalentes et donnent des structures insolubles et à haut poids moléculaire.

Quelques exemples d'enzymes d'origine microbiennes :

-Les amylases : sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon. Plusieurs amylases microbiennes hydrolysent l'amidon par différentes voies pour générer des polymères de courte chaîne (dextrine) et du maltose. D'autres enzymes hydrolysent les dextrines et le maltose en glucose. Les α -amylases clivent les liaisons internes α -1,4 glycosidiques et sont produites par des bactéries thermophiles du genre *Bacillus*,

formant des endospores. Des champignons tels que des espèces d'*Aspergillus* produisent également ces enzymes.

-Les glucoamylases clivent le glucose de l'extrémité non réductrice de l'amidon. Ces enzymes sont commercialisées pour la fabrication des sirops de fructose. Le fructose est plus doux que le glucose et est le sucre préférentiel des sirops et des boissons sucrées. *Aspergillus niger* est un producteur de glucoamylase.

-Les protéases

Les protéases hydrolysent les protéines et les peptides, en leurs unités constitutives : les acides aminés. Les protéases alcalines sont utilisées dans l'industrie des blanchis, industrie de la viande, industrie fromagère. Les microorganismes utilisés dans la fabrication industrielle d'enzymes protéolytiques sont des bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Streptococcus* et des champignons des genres *Penicillium* et *Aspergillus*.

-les pénicillines acylases, sont produites par différentes bactéries et champignons, mais la production industrielle s'effectue par des mutants sélectionnés d'*E. coli*. Ces enzymes clivent la pénicilline en acide 6-amino pénicillanique et acide phénylacétique. Ainsi, l'amine libre de l'acide 6-amino pénicillanique peut être chimiquement modifiée pour produire des pénicillines semi-synthétiques variées.

-La Taq polymérase est employé pour les réactions de polymérisation en chaîne cette enzyme est produite par *Thermus aquaticus*, une bactérie thermophile dont la température optimale de croissance est de 70° C, est de ce fait cette enzyme est stable à la chaleur. Elle est largement employée en recherche pour réaliser la PCR, diagnostic et en médecine légale.

Tableau : enzymes microbiennes et leurs applications commerciales.

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

3.2. Ethanol

- La technologie de la fermentation est née avec les premières civilisations, qui ont exploitées les capacités des microorganismes à produire des boissons alcoolisés, du pain et du fromage. Durant la première moitié du vingtième siècle, les productions de vin et de bière, du vinaigre, sont passées des méthodes artisanales anciennes aux techniques scientifiques établies. Ainsi, les processus microbiens à grande échelle pour l'industrie de production des acides citrique et lactique ont été développés. Aussi, l'acétone, le butanol et l'éthanol étaient produits par fermentation.

La production de l'éthanol par les levures fermentaire joue un rôle colossal dans l'économie.

- Tout matériau pouvant être converti en sucre tel que la cellulose ou l'amidon peuvent servir à produire de l'éthanol. L'éthanol commercialisé actuellement est produit à partir de sucre ou d'amidon. Les principales cultures sucrières sont la canne à sucre et la betterave à sucre. Les amylacés les plus courantes sont le maïs, le blé et le manioc.

Pour obtenir du bioéthanol (ETBE= *Ethyl tertio-butyl ether*) on procède à partir de végétaux sucrés tels que la canne à sucre, les betteraves, les céréales ou pommes de terre.

Un traitement permet d'obtenir du sucre, et sous l'action des levures, une fermentation alcoolique donnera outre l'éthanol quelques sous-produits. Ensuite par un processus de synthèse dans lequel intervient de l'isobutène, l'éthanol devient ETBE ou bioéthanol. Le bioéthanol peut être mélangé à de l'essence ou utilisé dans sa forme pure dans des moteur à combustion interne légèrement modifiés. Un litre d'éthanol contient 66 % de l'énergie fournie par un litre d'essence. Il améliore la combustion d'hydrocarbure des véhicules en réduisant ainsi l'émission du monoxyde de carbone.

- 80% de la production mondiale est d'origine biotechnologique. Bon candidat comme biocarburant (ou additif) et surtout comme élément de départ d'une nouvelle chimie (en remplacement des produits pétroliers)

Procèdes de Production du bioéthanol

- Matières premières utilisées

L'éthanol est un alcool éthylique qui peut être produit par synthèse à partir des hydrocarbures et/ou à partir de biomasse. Seulement, la transformation de cette dernière par voie microbienne peut produire ce qu'on appelle le « bioéthanol ». L'éthanol est obtenu après fermentation des plantes riches en sucres à l'aide de microorganismes (levures, bactéries, etc.)

- Matières riches en polysaccharides

Actuellement, il y a une légère prédominance de la production de bioéthanol, à base de matériaux amylacés (53% du total), comme le maïs, le blé et d'autres céréales et grains. Dans ces cas, la technologie de conversion commence généralement par la séparation, le nettoyage et la mouture du grain. Ensuite, l'amidon est converti typiquement en sucres au moyen d'un processus enzymatique à haute température. Les sucres libérés seront alors, fermentés par des levures et le liquide résultant sera distillé pour la séparation du bioéthanol. Il est intéressant, de signaler que les matières premières riches en inuline (polymère de fructose) constituent une source importante de fructose obtenu sous l'action de l'inulinase produite par divers microorganismes.

- Matières riches en sucres simples

La canne et la betterave, sont des végétaux qui englobent énormément de sucre simples. Ils sont obtenus par un processus se basant sur l'extraction au moyen de la mouture ou de la diffusion, et qui pourront être soumis directement à une fermentation. Après la fermentation, le liquide est distillé. Il est à noter que le bioéthanol dit « de première génération » est issu de la fermentation des matières premières qui peuvent être utilisées dans une chaîne alimentaire animale ou humaine. En revanche, l'éthanol issu de la fermentation des matières cellulosiques telles que le bois, les feuilles et les tiges des plantes ou celles issues de déchets est qualifié de la deuxième génération.

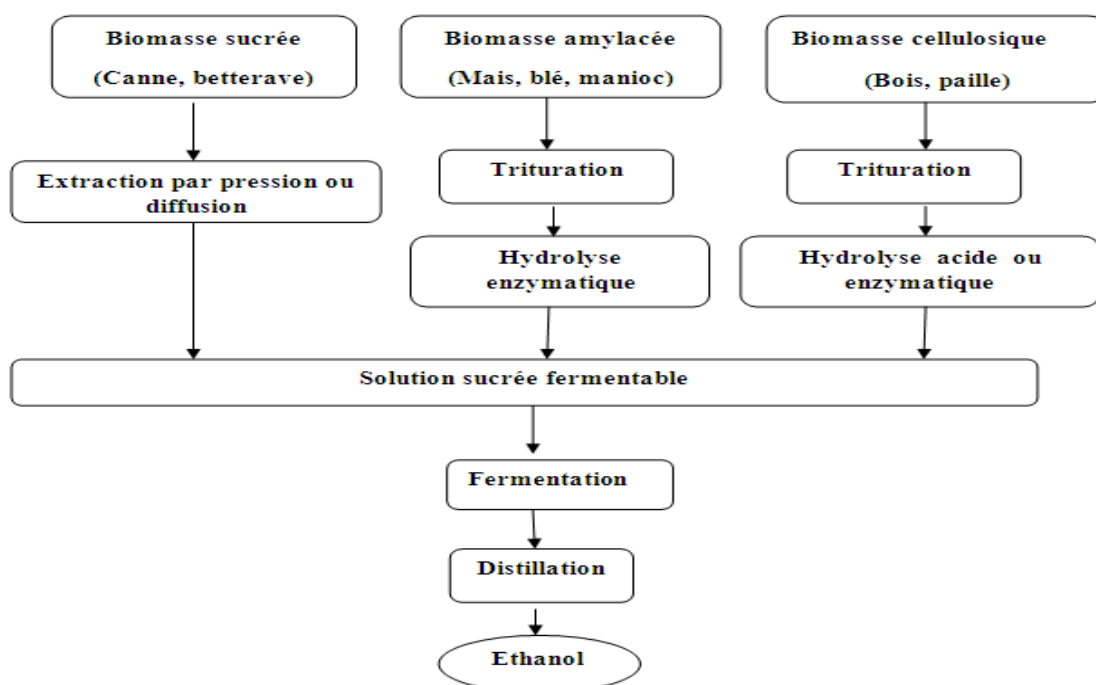


Schéma explicatif de production du bioéthanol à partir de plusieurs sources de sucres.

Les microorganismes utilisés au cours de la production de l'éthanol microbiens

Une grande variété de microorganismes produit de l'éthanol à partir des sucres, mais les levures sont les microorganismes qui possèdent les meilleurs atouts et les meilleurs potentiels pour cette production. Les plus utilisées sont *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces sp* présentant chacune des avantages et des inconvénients, notamment en fonction de la composition du substrat et du procédé employé. Cependant *Saccharomyces cerevisiae* reste la préférée car elle offre une efficacité en terme de production et de croissance à bas pH (jusqu'à 4), un facteur important qui évite les contaminations. En plus, cette levure représente un modèle expérimentale avec de nombreux avantages (la petite taille et le séquençage de son génome, la facilité à sa manipulation génétique, et la disponibilité de la littérature).

3.3. Acide citrique

Les principaux acides organiques issus de l'industrie microbienne sont : l'acide acétique, l'acide glutamique, l'acide lactique, et surtout l'acide citrique. Ils totalisent une production annuelle supérieure au million de tonnes.

L'acide citrique (acide 2-hydroxy-1,2, 3-propanetricarboxylique) est très diffus dans la nature. Il est solide, blanc, incolore, inodore. Il intervient dans le métabolisme de nombreux animaux et plantes .Il a été isolé sous forme cristalline à partir du jus de citron.

- c'est un acide organique important synthétisé par une fermentation microbienne. Plus de 130 000 tonnes sont produites par an dans le monde. L'acide citrique était extrait à l'origine à partir de citron (un citron contient 7 % à 9 % d'acide citrique). En 1923, une fermentation microbienne produisant des taux élevés d'acide citrique a été développée, et le prix a diminué avec l'augmentation de la production. Environ les deux tiers de l'acide citrique produit et commercialisé sont destinés aux aliments et aux boissons, tels que les boissons sucrées, les desserts, les confiseries, les fruits glacés, les compotes, les gelées et les crèmes glacées.

Dans l'industrie pharmaceutique, le citrate de fer constitue une source alimentaire de fer. L'acide citrique est également utilisé comme conservateur du sang stocké, de médicaments et de pommades. Le citrate a également remplacé les polyphosphates dans les détergents, en raison de l'élimination des phosphates qui constituent des polluants environnementaux.

Aujourd'hui, 99% de la consommation mondiale en cet acide est produite biotechnologiquement. L'acide citrique est généralement produit sur substrat mélasse étant donné que la source de carbone de choix pour l'espèce *Aspergillus niger*.

La majorité de l'acide citrique provient de fermentations dans des grands fermenteurs en acier inoxydable, en utilisant des souches du champignon *Aspergillus niger*. Le saccharose est également le substrat pour la production de l'acide citrique en tant que métabolite secondaire au cours de l'idiophase. Durant la trophophase, le mycélium est produit et du CO₂ est libéré. Au cours de l'idiophase, le glucose et le fructose sont métabolisés directement en acide citrique. Peu de CO₂ est produit. Dans les conditions optimales, environ 70 % du sucre est converti en acide citrique. Les taux de fer et d'autres minéraux inhibiteurs constituent des facteurs critiques au cours de la fermentation. Le fermenteur doit ainsi être en inox ou recouvert de verre, et l'utilisation du cuivre est prohibée.

Applications de l'acide citrique

L'acide citrique est utilisé en industrie alimentaire et pharmaceutique. Il trouve d'autres applications dans d'autres secteurs tels que l'industrie de tannage, la teinture, la fabrication d'encre.

Industrie alimentaire

- Il est utilisé comme additif (boisson, confiture, etc...) Dans les boissons, il est utilisé en général comme rafraîchissante ou effervescente et comme agent acidulant..
- Dans la fabrication des bonbons, dans la conservation des fruits, de poisson, des glaces, des friandises en général, les sauces, les jus et sirops de fruit, etc .
- Pendant les récoltes, comme acidifiant du moût.
- Dans les vins blancs, rosés et rouges, pour corriger l'acidité pendant les processus d'élaboration.
- Il peut être utilisé comme agent nettoyant de l'acier inoxydable en raison de son pouvoir séquestrant.
- Dans celle des plastiques sous la forme d'esters;
- Dans la purification des métaux grâce à son pouvoir chélatant

Industrie pharmaceutique

- L'acide citrique favorise indirectement la croissance des os en facilitant l'assimilation du calcium et en régulant la taille des cristaux de calcium dans les os;
- L'acide citrique et ses sels empêchent une coagulation sanguine du sang conservé;

- Il est utilisé comme solution de rinçage lors de traitements du canal radiculaire en médecine dentaire.
- Dans les poudres et comprimés effervescents, l'effet effervescent est obtenu grâce à l'acide citrique et le bicarbonate de sodium.

3.4. Antibiotiques

Environ 10000 antibiotiques différents ont été caractérisés, et environ 160 sont préparés industriellement et commercialisés. Les antibiotiques sont des substances organiques secrétées comme des métabolites secondaires par certains microorganismes ou produits par synthèse chimique. Les microorganismes producteurs d'antibiotiques sont en nombre très restreint. Les principaux groupes utilisés dans la production industrielle d'antibiotiques sont des bactéries filamenteuses du genre *Streptomyces* et des moisissures des genres *Penicillium* et *Cephalosporum*. L'expérience montre cependant que les bactéries présentant un cycle de vie incluant la formation de spores (des endospores ou d'autres types de spores) sont les plus efficaces pour la production d'antibiotiques utiles.

De nombreux antibiotiques sont actuellement disponibles pour la profession médicale, mais la recherche de nouveaux antibiotiques continue, notamment contre les bactéries, les champignons, les virus et les tumeurs. Un des problèmes majeurs dans l'utilisation des antibiotiques et des thérapeutiques chimiques est le développement de résistances chez les agents pathogènes. Des résistances aux antibiotiques apparaissent également par des processus de mutation et de sélection. Ainsi, la recherche d'antibiotiques se poursuit pour combattre les résistances qui se développent vis-à-vis de ceux actuellement utilisés. Il est clair que de nouveaux agents efficaces contre les bactéries, les champignons, les virus ou les tumeurs sont actuellement nécessaires.

Isolement des microorganismes producteurs d'antibiotiques

Le sol est devenu le principal réservoir de microorganismes producteurs d'antibiotiques. La grande majorité de souches productrices d'antibiotiques a été isolée du sol. Cependant, d'autres niches écologiques contiennent des microorganismes potentiellement producteurs de métabolites secondaires : matériaux en décomposition, des sédiments, des ordures, des eaux marines ou douce, des lichens, des mousses et plantes.

L'un des objectifs d'isolement est la recherche de nouvelles souches avec l'espoir qu'elles produisent de nouveaux métabolites secondaires. Les actinomycètes et

surtout les *Streptomyces* sont de meilleurs producteurs d'antibiotiques. Cependant, les *Streptomyces* ont été très exploités. Il faut continuer à isoler des espèces de ce genre mais en essayant de trouver des espèces rares.

La production des antibiotiques par les actinomycètes

Les actinomycètes tiennent une très grande importance dans le domaine de la biotechnologie des antibiotiques, malgré les progrès de synthèses chimiques. En effet, 45% des antibiotiques connus, sont naturellement issus des actinomycètes et plus particulièrement du genre *Streptomyces* qui sont à l'origine de 75% des antibiotiques produits

Exemples de quelques antibiotiques produits par voie microbienne

- **Pénicilline** : est produite par *Penicillium chrysogenum* et contient un cycle β -lactame inhabituel dans les systèmes biologiques. Cet antibiotique est utilisé depuis plus de 50 ans, et le développement de microorganismes résistants devient un réel problème. Des pénicillines semi-synthétiques sont plus efficaces contre les microorganismes résistants au produit naturel, et sont des antibiotiques de choix pour les applications cliniques.

- **Céphalosporines** : cet antibiotique, également de la famille des β -lactames, est produit par le champignon *Cephalosporium acremonium*. Les céphalosporines sont moins toxiques que la pénicilline et leur spectre d'action antimicrobien est plus large. Elles sont aussi résistantes aux pénicillinases produites par les microorganismes résistants à la pénicilline. Les céphalosporines sont produites par fermentation, et certains dérivés semi-synthétiques sont générés par modification chimique.

- **Streptomycine** : de nombreux antibiotiques sont des dérivés de sucres, et la streptomycine est un antibiotique de ce groupe produit par *Streptomyces griseus*. Le milieu de fermentation employé contenant du soja avec du glucose comme source de carbone. La streptomycine est composée de sucres aminés liés à d'autres sucres par une liaison glycosidique. Sa découverte eut une grande importance médicale car ce fut le premier médicament efficace contre le fléau de la tuberculose. La résistance à la streptomycine a posé de sérieux problèmes dans les thérapies contre la tuberculose, et des combinaisons de médicaments sont maintenant administrées pendant un temps donné.

- **Érythromycine**: c'est antibiotiques appartenant à la famille des macrolides, il possède de grands cycles lactone liée à des sucres. Il est produit par *Streptomyces erythreus*.

- **Rifamycine** est un antibiotique de type lactone macrocyclique produit par *Nocardia mediterranei*.

- **Rifampicine** : est un inhibiteur spécifique de l'ARN polymérase bactérienne, ADN dépendante ; elle est utilisée dans le traitement de la tuberculose associé à l'isoniazide et la pyrazinamide.

- **Tétracyclines** : les tétracyclines constituent un groupe d'antibiotiques majeurs efficaces à la fois contre des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Elles sont également efficaces contre *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Leptospira*, *Spirochetes* et *Chlamydia*. Certains dérivés semi-synthétiques ont aussi été développés pour contrecarrer les problèmes d'émergence de résistances bactériennes.

- **Spiramycine** : c'est un antibiotique de la famille des macrolides. Ces derniers sont des molécules lipophiles basiques composés d'un macrocycle lactonique ou aglycone. Le microorganisme producteur *Streptomyces ambofaciens*

3.5. Autres :

Autres produits de fermentation, ainsi que leurs utilisations sont portés dans le Tableau suivant :

Production	Microorganismes	Utilisation
Produits pharmacologiquement actifs		
Ergotamine	<i>Claviceps purpurea</i>	Migraine
Valiomaline	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Diabète
Compactine	<i>Penicillium. citrinum</i>	Cholestérol
Cyclosporine	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Immunosuppresseurs
Prednisonne	<i>Curvularia lunata</i> <i>Corynebacterium simplex</i>	asthme et dans le cas d'autres allergies
Arômes		
Anis-aldéhyde	<i>Trametes suavis</i>	Anis
Géranol	<i>Ceratiocystis variolorum</i>	Rose
Méthyl-phénylacétate	<i>Trametes odorata</i>	Miel
Hormones végétales		
Gibbérelline	<i>Phaeosphaeria sp.</i>	Suppression de la dormance, floraison
Lipides	<i>Aspergillus Fumigatus</i> , <i>Mucor miehi</i> , <i>Penicillium spinulosum</i>	Alimentation
Pigments		
Bêta-carotène	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Rhodotorula gracilis</i>	Colorants