

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Centre universitaire de Relizane Ahmed Zabana

Institut des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département de biologie

Cours de génie microbiologique

Préparé par : Dr. N. LAREF

Destiné pour les étudiants de master 2 en microbiologie et contrôle de qualité

Année 2018/2019

Sommaire

Introduction	1
1- La fermentation.....	2
2- La biologie moléculaire et le génie microbiologie	4
3- La technologie alimentaire	6
4- Les cellules microbiennes et la production de P.O.U	7
5- La production des acides organiques.....	8
6- La production des acides aminés	13
7- La production des vitamines.....	14
8- La production des lipides.....	14
9- L'ensilage	15
10- La production des biopolymères.....	15
11- La production des molécules thérapeutiques.....	16
12- Les plantes génétiquement modifiées.....	23
13- La nanobiotechnologie	24
14- Les organismes vivants artificiels.....	24
15- La production de méthane	25
16- La production des enzymes	27
17- Immobilisation des enzymes	27
18- Autres produits	29
19- Fiche TP N° 1 : Levain de panification	31
20- Fiche TP N° 2 : Isolement des bactéries lactiques.....	32
21- Fiche TP N° 3 : L'activité anti-microbienne	33
22- Fiche TP N° 4 : Conservation des souches.....	34
23- Fiche TP N° 5 : La production des exopolysaccharides	35
Références bibliographiques	36

Introduction

Des bactéries produisant l'insuline, l'hormone de croissance humaine, l'interféron, l'érythropoïétine, des vaccins, des microorganismes pour la décontamination de mers polluées par le pétrole, des biomatériaux synthétisés par des bactéries ou des virus, des cyanobactéries produisant de l'hydrogène comme énergie renouvelables, des bactéries transgénique produisant de la soie, ce ne se que quelques exemples de biotechnologie jaune, verte, rouge et bleu.

C'est en 1917, que ce terme apparait pour la première fois, date à laquelle l'ingénieur agronome hongrois Ereky l'emploi pour décrire un ensemble de procédés permettant de transformer des matières premières en produits utilisables par l'Homme à l'aide d'organismes vivants. Une très forte accélération des progrès dans l'industrialisation de la microbiologie est liée aux besoins très spécifiques apparus durant les guerres mondiales, citons la production en Allemagne au cours de la seconde guerre mondiale de glycérol par la souche *S. cerevisiae* et la production en Angleterre de l'acétone et du butanol par *Clostridium acetobutyricum*.

On distingue deux niveaux d'exploitation dans des processus de biotechnologie, le premier utilise des cellules fonctionnelles, sauvage (fermentation, bioremédiation de sites pollués, d'épuration des eaux résiduelles) ou le plus souvent génétiquement modifiées par mutagenèse ou par les techniques de l'ADN recombinant pour en augmenter la capacité de synthèse et/ou la qualité du produit cherché, et le second niveau ne met plus en jeu la cellule entière mais des constituants cellulaires (polysaccharides, toxines, segments de génomes pour la production de vaccins), certaines structures cellulaires (les fantômes bactériens), des matériaux (la couche S) et les organites (les magnétosomes).

Cependant, il existe des préoccupations sociétales dans le domaine de la biotechnologie ; il est très difficile de prédire ce qui se passera dans un écosystème où un nouvel organisme a été introduit, qu'il soit génétiquement modifié ou non. Les gouvernements craignent que les terroristes utilisent la biotechnologie pour créer de nouveaux virus infectieux ou des toxines, pour lesquels nous n'avons pas de remède. En outre, la construction de gènes à partir de zéro signifie que nous pourrions peut-être créer la vie qui va certainement contre les croyances éthiques ou religieuses d'un nombre important de personnes.

1- La fermentation

Bien que le terme fermentation soit un abus de langage, car il concerne la respiration anaérobie selon Pasteur, il est, par extension, utilisé par le monde industriel pour désigner l'opération unitaire qui va permettre d'effectuer les réactions de bioconversion, qu'elles soient aérobies ou anaérobies.

La fermentation (Le terme provient du latin *fervere* qui signifie *bouillir*) est une technologie très ancienne de transformation et de conservation des aliments : pain, boissons alcoolisées et vinaigre. Les Sumériens fabriquaient déjà du pain et de la bière en 8000 ans. av. J.-C., les Babyloniens maîtrisaient la fabrication du vin de palme en 5000 ans. av. J.-C., les Égyptiens utilisaient les levures pour la fabrication du pain et des boissons alcoolisées en 4000 ans. av. J.-C. et les Chinois se nourrissaient de chou fermenté dans le vin en 3000 ans. av. J.-C.

Antonie Van leenwenhok, grâce à un microscope de sa fabrication, fit les premières observations de levures à partir d'un moût de bière sans établir pour autant de lien entre ces corpuscules et la fermentation alcoolique, il faut attendre la fin du 17^{ème} siècle pour que débute grâce aux travaux de Lavoisier l'étude chimique de la fermentation alcoolique poursuivie au siècle suivant par Gay Lussac.

Fabroni a démontré la première interprétation de la composition chimique du ferment alcoolique qu'il a qualifié de substance végéto-animale, mais la première démonstration que la levure est la cause de la fermentation fut apporté par Charles Cagnard De La Tour en 1837, cette théorie fut confirmée par Schwann, il appela la levure de bière *Zuckerpilz* c'est-à-dire champignon du sucre d'où vien le terme *Saccharomyces* utilisé pour la première fois par Meyen en 1838.

C'est finalement Louis Pasteur qui dans ses deux fameux ouvrages : Etude sur le vin (1866) et études sur la bière (1876) accrédita définitivement la thèse vitaliste de la fermentation alcoolique, il démontra que la levure responsables de la fermentation du moût proviennent de la surface du raisin et qu'il en existe plusieurs espèces que l'on peut isoler.

Il précisa l'effet de l'oxygène sur l'assimilation des sucres par les levures et apporta la preuve que celles-ci outre l'alcool et le gaz carbonique forment d'autres produits en quantité moindre dont le glycérol.

Cours de Génie microbiologique

La fermentation est l'application du métabolisme microbien pour transformer une matière en produits à valeur ajoutée. Ce procédé est en mesure de produire une incroyable variété de substances utiles, par exemple l'acide citrique, les antibiotiques et les biopolymères... etc.

Le potentiel est immense et très vaste, il suffit simplement de connaître le microorganisme adapté, de contrôler son métabolisme et sa croissance et d'être en mesure de l'utiliser à grande échelle.

Les performances d'une culture en vue de la production industrielle tiennent dans la capacité technologique à atteindre les trois objectifs majeurs suivants :

- ✓ Obtenir une croissance efficace aboutissant à une quantité importante de biomasse dans un état physiologique compatible avec la production ;
- ✓ Maintenir pendant une période la plus longue possible la biomasse dans des conditions de production optimales ;
- ✓ Faire en sorte que ces phases de croissance, de production, ainsi que les étapes d'extraction et de purification soient les moins coûteuses possibles.

2- La biologie moléculaire et le génie microbiologie

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'éviter les difficultés de production en agissant avec précision au niveau d'un gène. Elles permettent ainsi, soit de modifier ou de supprimer une activité, soit d'introduire une nouvelle fonctionnalité.

Les stratégies d'amélioration visent à accroître la concentration finale en produit, à réduire la production de cométabolites indésirables.

Deux grandes catégories d'approches sont utilisées pour l'amélioration : la mutagenèse aléatoire et le génie métabolique.

2-1- La mutagenèse

Induit des modifications génétiques au sein du génome sans que la localisation de ces dernières puisse *a priori* être connue. Le génie métabolique peut être défini comme l'amélioration des potentialités d'une cellule par la manipulation de fonctions enzymatiques bien ciblées, grâce à l'emploi de la technologie de l'ADN recombiné.

2-1-1- Mutagenèse aléatoire

L'introduction des mutations au sein du génome des micro-organismes d'intérêt se réalise le plus souvent par action d'agents mutagènes de nature chimique ou physique (rayonnements UV, gamma, X et *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine ...etc.).

L'un des exemples les plus significatifs de l'apport de cette méthodologie est l'amélioration de la production de pénicilline, passée progressivement de quelques milligrammes à 40 grammes par litre.

Parfois en réalisant un brassage génétique entre souches présentant un potentiel génétique différent, notamment grâce à la technique de fusion des protoplastes. En présence d'agent tel que le polyéthylèneglycol, les protoplastes peuvent fusionner transitoirement. Lors de cette étape, les génomes peuvent se rassembler et subir des recombinaisons génétiques.

2-2- Amélioration par génie métabolique

La première étape consiste à identifier dans le réseau métabolique la (ou les) étape(s) enzymatique(s) à modifier pour espérer atteindre le but recherché. Il est possible d'amplifier un gène de biosynthèse et une seconde approche consiste à éliminer les voies de biosynthèse annexes.

Pour éliminer une voie de biosynthèse annexe à celle que l'on souhaite favoriser, il suffit d'inactiver la première enzyme de cette voie, soit en enlevant une partie ou la totalité de son gène, soit en intégrant dans ce gène un fragment d'ADN exogène, ce qui bloquera la synthèse de l'enzyme.

3- La technologie alimentaire

Le beurre est habituellement fabriqué à partir de crème pasteurisée à laquelle on ajoute un levain lactique. Ce levain consiste en une culture qui contient, entre autres, *Lactococcus cremoris* comme fournisseur du diacétyle et/ou *Lactococcus lactis* comme principaux producteurs d'acide lactique. L'acide lactique contribue à la saveur et le diacétyle à l'odeur et le goût caractéristiques du beurre.

Le goût typique d'acide propionique dans les fromages suisses comme la Gruyère et l'Emmental, vient de l'emploi de *Propionibacterium* spp.

Le yaourt est produit habituellement à partir de lait pasteurisé, le lait est inoculé avec *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* puis incubé à 35-45 °C pendant plusieurs heures. Le pH descend à 4,3 environ et les protéines du lait coagulent. Les bactéries agissent de façon coopérative : *Lb. bulgaricus* dégrade les protéines en acides aminés et peptides lesquels stimulent la croissance de *S. thermophilus* ; l'acide formique produit par cette dernière stimule la croissance de *Lb. bulgaricus* et fournit la majorité de l'acide lactique.

La levure la plus ancienne et la plus utilisée est le genre *Saccharomyces cerevisiae* ; il s'agit de la levure de boulangerie utilisée pour lever la pâte à pain mais aussi de la levure qui est utilisée, pour la production de bière ou de vin.

Le cidre est obtenu par fermentation d'un jus sucré obtenu par le pressage de pommes. Les levures intervenant dans la fermentation sont : *S. ellipsoïdes* et *S. uvarum*.

4- Les cellules microbiennes et la production de P.O.U

Les protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.), ou S.C.P. (de l'anglais *Single-Cell Protein*) sont une source non conventionnelle de protéines. Ces protéines sont obtenues à partir de culture de microorganismes afin de combler le déficit alimentaire.

Les P.O.U sont intéressantes dans les régions où les conditions climatiques sont défavorables aux cultures, où les terres cultivables sont rares, et pour les populations soumises à un risque élevé de famine.

Fait appel à l'utilisation de la biomasse elle-même, de cellules fongiques agglomérées, cette biomasse peut être utilisée :

Vivante : *S. cerevisiae* (levure de la bière ou du boulanger), *S. boulardii* (médicament prescrit pour remplacer provisoirement les bactéries intestinales détruites par une antibiothérapie prolongée).

Tuée : c'est l'exemple classique de la « levure-aliment », appartenant au groupe communément appelé les P.O.U en raison de sa valeur nutritionnelle protéique importante (50 g de protéines pour 100 g de levures). Ayant suscité beaucoup d'espoirs dans les années 1970, notamment pour compléter les rations alimentaires des populations souffrant de malnutrition protéique (kwashiorkor) et d'avitaminose B dans les pays en voie de développement.

5- La production des acides organiques

Les acides organiques sont principalement utilisés dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie chimique. Les exemples les plus connus sont l'acide acétique et l'acide citrique qui est utilisé, notamment, comme antioxydant dans l'industrie alimentaire.

Dès 1893, on a eu l'idée que des champignons filamenteux contenaient de l'acide citrique, et ce n'est qu'en 1923 que le citrate a été isolé d'une culture fongique fermentée.

Aspergillus niger et *Saccharomyces lipolytica* sont capables de rendements industriels importants lorsqu'elles sont placées dans des mélasses (sirop brun provenant de la cristallisation du sucre) dans la production de l'acide citrique.

Actuellement de nombreuses souches fongiques améliorées génétiquement sont également capables de sécréter cet acide (*Penicillium*, *Mucor*...etc.) mais, *Aspergillus niger* et *Saccharomyces lipolytica* semblent avoir la faveur des industriels pour cet acide dont les utilisations sont nombreuses dans l'industrie pharmaceutique (comprimés effervescents, citrate), cosmétique (lotions astringentes, shampooings) et alimentaire (boissons gazeuses, confiserie, conserverie). L'acide citrique peut également être produit par *Yarrowia lipolytica*.

Des souches mutantes d'*Aspergillus terreus*, cultivées sur mélasses de betterave, fournissent l'acide itaconique (85 %) ; l'acide érythorbique est produit par *Penicillium notatum*, et l'acide kojique par *A. flavus*.

Quelques espèces du genre *Rhizopus* sont couramment utilisées pour la production industrielle de l'acide lactique. L'acide lactique qui peut être produit par *Lactobacillus* trouve ses utilisations dans les domaines alimentaires comme acidifiant des jus de fruits et sirops. Sa production à l'échelle industrielle est réalisée avec des cultures fermentaires d'*Aspergillus niger*, qui peuvent atteindre des rendements de 125 g/l.

L'acide succinique est produit par *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succinoproducens* et des souches recombinantes d'*Escherichia coli*. Cette production pourrait s'élever à plus de 66 g/l en 84 heures pour une consommation de 98 g/l de glucose.

7-1- La production de l'acide citrique

L'acide citrique, il a été isolé sous forme cristalline à partir du jus de citron, en 1784, par Sheele et sa structure a été établie par Liebig en 1838.

La synthèse chimique de l'acide citrique, à partir de glycérine, remonte à 1880. En 1893, Wettmer découvrit quelques micromycètes capables de produire l'acide citrique par fermentation de substrats contenant du sucre. À cette époque le procédé industriel par fermentation, en utilisant *Aspergillus niger* comme micro-organisme producteur et le sucre comme matière première commença à se développer.

L'acide citrique est produit par des techniques de fermentation en surface et submergée. Il est possible d'obtenir la surproduction et l'accumulation de l'acide citrique par altération des mécanismes de régulation des principales voies métaboliques avec des modifications génétiques et/ou par la culture de micro-organismes dans un milieu de composition très déséquilibrée, c'est-à-dire avec une carence ou un excès en substances particulières.

7-1-1-Procédés de production avec l'*Aspergillus niger*

Aspergillus niger est le principal micro-organisme utilisé pour la production industrielle de l'acide citrique, qui est effectuée, en conditions aérobies, par les techniques de fermentation en surface, submergée ou en phase solide, suivies par des procédés d'extraction et de purification.

a- Fermentation en surface

Cette technique a été la première utilisée. Elle consiste à cultiver *Aspergillus niger* sur la surface d'un milieu nutritif liquide contenu dans des cuves en aluminium ou en acier inoxydable approprié (anticorrosion) équipées d'un système d'aération très efficace.

Le milieu nutritif, ou moût de fermentation, est préparé en diluant la matière première, généralement une mélasse de betterave, le substrat principal, comprise entre 15 et 20 %. D'autres substances, nécessaires à la croissance du micro-organisme, sont ajoutées à ce milieu. Celles-ci sont principalement des sources d'azote et de phosphore (ammoniaque, sels

d'ammonium, phosphates, etc.), des traces de métaux (sels de Fe, Mn, Mg, Zn, etc.), différents facteurs de croissance (vitamines, extraits de levure, etc.).

Après dilution la mélasse est généralement traitée avec de l'hexacyanoferrate de potassium pour complexer et précipiter la quantité en excès d'ions de fer qui ont une influence négative sur la production d'acide citrique. Le moût de fermentation est stérilisé et placé dans des cuves.

On procède à l'inoculation des spores d'*Aspergillus niger* qui sont dispersées à la surface du moût de fermentation en quantité variante de 70 à 150 mg/m².

Le procédé comporte deux phases : une première phase, d'une durée d'environ 2 jours, de germination et de croissance du micro-organisme avec la formation d'une couche consistante de mycélium enchevêtré en surface ; cette phase est suivie par celle de production de l'acide citrique.

La fermentation est conduite à une température de 28 à 32 °C, le pH ayant une valeur initiale de 6 à 7 descend jusqu'à une valeur d'environ 3 suite à la formation d'acide citrique. 30 à 40 % de l'eau initiale est évaporée pendant l'opération.

La durée totale du cycle de fermentation est de 6 à 12 jours, avec une production de 60 à 75 g d'acide citrique par 100 g de saccharose. En même temps, on obtient la formation d'une quantité appréciable de sous-produits, principalement les acides oxalique et gluconique.

b- Fermentation submergée

La fermentation submergée est réalisée dans des fermenteurs où les micro-organismes sont cultivés d'une façon homogène dans toute la masse du milieu nutritif liquide et maintenus aux conditions optimales d'oxygénation, de température et de pH.

Généralement, les fermenteurs sont des bacs cylindriques en acier inoxydable, et possèdent des systèmes pour la dispersion de l'air stérile et de refroidissement du liquide de fermentation.

Cours de Génie microbiologique

Les matières premières principalement utilisées sont des mélasses de betterave ou de canne et des sirops de glucose. Le moût de fermentation est préparé dans le fermenteur principal en diluant la matière première prétraitée à la concentration en sucre désirée (en général de 10 à 20 %), après addition des sources d'azote et de phosphore, des sels minéraux et des facteurs de croissance nécessaires, puis il est stérilisé. Après avoir ajusté de pH (6 à 7) et la température (28 à 30 °C), on ajoute l'inoculum préparé avec la quantité nécessaire de spores dans de petits fermenteurs.

D'une manière analogue la fermentation submergée se déroule en deux phases successives, une de croissance des micro-organismes et une d'intense production d'acide citrique. La fermentation dure 5 à 9 jours ; la température est maintenue rigoureusement à la valeur fixée comprise entre 25 et 32 °C ; le pH est en général descendu jusqu'à 2 ou 2,5.

La concentration finale de l'acide citrique est de 100 à 130 g/L, avec une production de 65 à 80 g par 100 g de saccharose contenu dans la matière première. Le principal sous-produit est l'acide oxalique.

c- Fermentation en phase solide

La fermentation en phase solide est la fermentation des sucres contenus dans les pulpes sucrées de déchets.

La fermentation, dont la durée est de 5 à 10 jours, est conduite dans des cuves placées dans des chambres stériles aérées et maintenues à une température de 30 à 32 °C, où la matière première, après avoir été humidifiée et stérilisée, est inoculée avec des spores d'*Aspergillus niger*. Les conditions de fermentation sont loin d'être optimales et restent peu contrôlables.

7-1-2- Procédés d'extraction et de purification

L'acide citrique est généralement séparé du liquide de fermentation par précipitation ou par extraction par solvant. Ce procédé, qui est le plus utilisé, met à profit la précipitation de l'acide citrique sous forme de citrate de calcium par l'ajout d'hydroxyde de calcium au liquide de fermentation jusqu'à obtenir un pH d'environ 8.

Au début de l'addition de l'hydroxyde, le pH est d'environ 3, l'oxalate de calcium précipite et il est séparé. Le citrate de calcium en suspension dans l'eau, est traité à environ 50 °C par un léger excès d'acide sulfurique pour obtenir l'acide citrique libre en solution et du sulfate de calcium insoluble.

Puis la solution d'acide citrique est traitée sur des résines échangeuses d'ions, enfin elle est décolorée avec du charbon actif. Cette solution est concentrée dans des évaporateurs puis envoyée dans les cristallisoirs.

L'acide citrique est obtenu sous forme de monohydrate quand la cristallisation est effectuée à une température inférieure à 36,5 °C, ou sous forme anhydre à une température supérieure. Après la cristallisation, on réalise le séchage et le conditionnement.

Les sous-produits de ce procédé d'extraction et de purification ce sont principalement : le mycélium (15 à 20 % du total), le sulfate de calcium (environ 60 %) et d'autres produits contenus dans le moût de fermentation.

7-1-3- Procédés de production avec des levures du type *Candida*

Au début des années 70, des procédés de fermentation par la technique submergée, avec des levures du type *Candida* utilisant des paraffines comme matière première ont été développés.

La fermentation se faisait à un pH de 4 à 6 et à une température de 26 à 30 °C. Elle donnait, en 3 à 4 jours, des rendements de conversion de 130 à 140 %. Le principal produit secondaire était l'acide isocitrique. Par la suite, d'autres levures du type *Candida* ont été sélectionnées pour utiliser le glucose, comme matière première.

Ces derniers temps, un procédé a été développé utilisant un alcool éthylique de coût très bas comme matière première et une souche mutante de *Yarrowia lipolytica* comme micro-organisme producteur.

La durée de la fermentation est de 5 à 6 jours, avec une concentration finale d'acide citrique de 110 à 130 g/L. Le pH est maintenu par addition de NaOH entre 4 et 7 et la température entre 26 et 30 °C.

6- La production des acides aminés

Les acides aminés sont utilisés pour améliorer la qualité des aliments, en médecine ou comme éléments de base pour la synthèse chimique.

La lysine est fournie par *Corynebacterium glutamicum*, des souches génétiquement modifiées produisaient 100 g/l de lysine, cette production a été amenée par génie génétique à 170 g/l, peut être produit aussi en grande quantité par fermentation directe en utilisant un mutant de *Brevibacterium flavum* qui nécessite un apport en homosérine et en leucine.

La thréonine synthétisée par *E.coli* a vu son rendement initialement très bas passer à 100 g/l suite à l'introduction de copies de l'opéron thr. Les acides glutamiques et aspartiques sont notamment produits par des espèces de *Penicillium* et *Rhizopus*.

L-tryptophane peut être produit par *Hansenula anomala* à partir de précurseurs comme l'acide anthranilique.

7- La production des vitamines

Des levures telles que *Ashbya gossypii* sont utilisés pour la fabrication industrielle de la riboflavine (vitamine B2), qui peut alors produire des quantités excédant 7g par litre.

La vitamine C (acide ascorbique) est produite par une combinaison de synthèse chimique et microbiologique. Le substrat de départ, le D-glucose, est réduit chimiquement en D-sorbitol, et une oxydation microbienne conduit à la transformation du D-sorbitol obtenu en L-sorbose, lequel est chimiquement converti en acide ascorbique. *Acetobacter suboxydans* est le microorganisme impliqué dans la déshydrogénation du D-sorboiol en L-sorbose.

Le β -carotène, qui peut servir de précurseur de la vitamine A, est synthétisé par *Blakeslea trispora* ou *Rhodotorula gracilis* et l'ergostérol, convertible en vitamine D par les rayonnements ultra-violets est synthétisé par *Saccharomyces cerevisiae* ou *Aspergillus niger*, et la vitamine B1 est synthétisé par *Eremothecium Ashbyii*, *Ashbya gossypii* et *Candida guilliermondia*. Les micro-organismes impliqués dans la fabrication de la vitamine B12 sont *Propionibacterium shermanii* et *Pseudomonas denitrificans*. Ce dernier produit environ 60 mg/l.

8- La production des lipides

De nombreuses espèces fongiques par ex : *Candida*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*... etc sont capables de produire les lipides à partir de substrats divers, tels que la mélasse et les sucres.

Trichoderma reesii est utilisé pour la production de lipides à partir de déchets agricoles, comme *Aspergillus ochraceus*, important producteur d'acide linoléique.

9- L'ensilage

C'est une méthode traditionnelle de conservation du fourrage. Elle consiste essentiellement à stocker le fourrage finement coupé dans des conditions anaérobies et à le laisser fermenter dans des silos.

Il y a des bactéries comme *Lactobacillus* métabolisent les sucres principalement par fermentation lactique. L'acide lactique produit abaisse rapidement le pH à 4 inhibant ainsi des organismes comme *Clostridium* qui sont cela, provoqueraient de la putréfaction.

10- La production des biopolymères

Les biopolymères sont utilisés dans l'industrie alimentaire (xanthane, alginates) dans l'industrie des cosmétiques (acide hyaluronique) ou dans la fabrication des plastiques (polyhydroxybutyrate).

Le chitosane est produit par *Rhizopus oryzae*, le pullulane par *Aureobasidium pullulans*, le scléroglycane par *Sclerotium glaucum*. La gomme de xanthane est un polysaccharide extracellulaire visqueux, synthétisé par des souches de *Xanthomonas campestris*.

Le PHB, polymère naturel de stockage chez les bactéries est à la base d'un nouveau plastique biodégradable, le biopol. L'homopolymère se forme lorsqu'*Alcaligenes eutrophus* utilise le glucose comme seule source de carbone, et fabrique des copolymères d'hydroxybutyrate et d'hydroxyvalérate.

11- La production des molécules thérapeutiques

a- Les antibiotiques

La majorité des antibiotiques sont produits par fermentation ; les souches productrices sont des champignons (20 %) ou des bactéries filamenteuses (80 %).

Depuis les premières observations d'Anderson en 1870 sur l'effet antagoniste d'un *Penicillium* à l'égard de bactéries, celles de quelques autres chercheurs et les travaux d'Alexander Fleming en 1928, les découvertes d'antibiotiques et d'organismes producteurs de ces molécules se sont multipliées.

Cependant, ce fut le 3 septembre 1928 qu'il effectua une découverte extraordinaire. Ce jour-là, il découvrit accidentellement la pénicilline en observant que la moisissure qui avait contaminé l'une de ses boîtes de culture avait détruit les bactéries qui s'y trouvaient. Après avoir étudié la moisissure à l'aide d'un microscope, il constata que celle-ci appartenait au *Penicillium notatum*. Le professeur de bactériologie décida alors de nommer cette substance antibactérienne, pénicilline.

Comme tous les composés issus de microorganismes, les aminosides naturels sont obtenus par fermentation à partir de souches sélectionnées, de *Streptomyces*. Le caractère très hydrophile de ces molécules complique leur extraction et purification. L'extraction se fait à partir du moût de fermentation après filtration puis passage sur résine échangeuse d'ions, qui retient ces antibiotiques, puis la purification est réalisée par passage sur charbon.

La streptomycine a été isolée en 1943 à partir d'une souche de *Streptomyces griseus* par Albert Schatz. En janvier 1944 Selman Abraham Waksman et ses assistants Albert Schatz et Elizabeth Bugie publiaient les premiers résultats de leurs travaux sur une substance naturelle qui inhibait la vie des bactéries, un "antibiotique" comme l'appelait Waksman.

Les céphalosporines ont été isolées de cultures de *Cephalosporium acremonium* issues d'égouts en 1948 par un scientifique italien Giuseppe Brotzu. Il a remarqué que ces cultures produisaient des substances agissant sur *Salmonella typhi*.

Cours de Génie microbiologique

Dans les années 1960-1970, un composé issu de la fermentation du champignon *Fusidium coccineum* s'avéra actif envers les staphylocoques, et fut appelé acide fusidique. L'acide fusidique est aussi isolé à partir de *Mucor ramannianus* et d'*Isaria kogana*.

b- Les vaccins et les hormones

La production de vaccin d'HBsAg par *Hansenula polymorpha*, *saccharomyces cervisiea* et *Pichia pastoris*. Le virus de l'hépatite B (HBV) contient un petit génome de 3,2 kb qui a été cloné et séquencé. Pour préparer un vaccin contre HBV le gène d'HBsAg a été cloné dans un vecteur d'expression de ces microorganismes.

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 (commercialisé en 1985 aux Etats-Unis).

Depuis 1984, la production à grande échelle de l'insuline est réalisée commercialement avec la bactérie *E. coli* génétiquement modifiée. En 1987, ils ont commencé à produire de l'insuline avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

c- Les fantômes bactériens

Les fantômes bactériens sont constitués de l'enveloppe de cellules bactériennes vidées de leur cytoplasme et de leur ADN par une lyse induite par un bactériophage, cette lyse laisse intacte l'enveloppe et les éléments responsables de la stimulation de la réponse immunitaire. Les FB ont en effet une plus forte immunogénicité que les mêmes cellules inactivées par des méthodes physiques ou chimiques.

Ils peuvent être utilisés pour exposer des antigènes étranger à l'extérieur de l'enveloppe cellulaire, une autre potentialité prometteuse de FB est l'administration par l'exploitation de leur capacité à transporter des substances biologiquement active et à cibler les cellules à traiter, le ciblage exploite les propriétés des FB à adhérer de façon spécifique à des tissus végétaux, animaux et humains.

Un tel système a été utilisé pour véhiculer des médicaments cytostatiques à des cellules de l'adénocarcinome colorectal humain avec des résultats très encourageants.

d- Autres produits

La griséofulvine est introduite depuis 1958, est un composé antifongique produit par *Penicillium griseofulvum*.

La cyclosporine A isolée dans un échantillon du sol en Norvège en 1969 est synthétisée par plusieurs champignons, dont *Tolypocladium inflatum*.

D'autres médicaments d'origine fongique comme certains alcaloïdes sont aussi susceptibles d'être produits par fermentation, comme les alcaloïdes de l'ergot de seigle produit par *Claviceps purpurea*, et l'acide abscissique par *Cercospora rosicola* et *Botrytis cinerea* ainsi que l'acide gibbérellique par *Fusarium moniliforme*.

11-1- La production de l'insuline

Les méthodes de production d'insuline destinées à la commercialisation utilisent à l'heure actuelle une levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ou une bactérie (*Escherichia coli*) génétiquement modifiée.

En 1980, la revue The Lancet a publié un article sur la production de l'insuline, qui ouvrait l'ère de la technologie de l'ADN recombinant, les auteurs de cet article Keen et ses collaborateurs présentaient la production de l'insuline humaine par des cellules d'*E. coli* (l'humuline, nom donné à cette hormone) semblait efficace chez l'Homme.

En 1987 la compagnie Genentech initia un programme de production biotechnologique d'insuline, en 1982 l'insuline devint le premier médicament issu d'ADN recombinant approuvé par la Food and drug administration.

Ils vont d'abord isoler et extraire d'une cellule humaine à l'aide d'une enzyme de restriction le gène INS codant pour l'insuline qui se trouve sur le chromosome 11. En même temps ils vont aussi extraire d'une bactérie le plasmide.

On va couper ce plasmide de nouveau avec une enzyme de restriction pour pouvoir y introduire le gène INS. Le gène de l'insuline va être fixé sur le plasmide avec une ligase, une

Cours de Génie microbiologique

enzyme qui aide à créer de nouvelle liaison. Puis le plasmide appelé aussi plasmide recombiné va être réintroduit dans une bactérie.

Les bactéries vont être mises ensuite dans un petit bioréacteur. Sous la présence de solution nutritive elles vont se multiplier très rapidement de manière exponentielle. C'est durant cette période que les bactéries vont produire de l'insuline.

Pour récupérer le produit fabriqué par la bactérie, il faut séparer à l'aide d'une centrifugeuse l'insuline de la bactérie. Les bactéries vont être détruites à l'aide d'un produit désinfectant. Juste après on procède à un clivage enzymatique où l'insuline va pouvoir être concentrée.

Suite à quoi on va purifier le produit via un processus de chromatographie à échange d'ion pour finir par une diafiltration ou une ultrafiltration. C'est pendant à cette étape que le produit va être stabilisé pour le cas de l'insuline dans la plupart des cas sous forme de suspension injectable. Puis il faut conditionner et préparer le transport.

11-2- Régulation de la biosynthèse des antibiotiques

La composition du milieu peut réguler la production en réprimant les gènes de biosynthèse des enzymes du métabolisme secondaire et/ou en inhibant leur activité. Les milieux doivent permettre de fournir sans limitation les précurseurs nécessaires aux synthèses des antibiotiques.

La biosynthèse des métabolites secondaires est fortement affectée par les conditions environnementales et nutritionnelles dans lesquelles le microorganisme se développe.

a- Régulation par la source carbonée

Les fortes concentrations de glucose ou d'autres sources carbonées rapidement catabolisables sont généralement défavorables à la production. Par contre, des sources d'énergie lentement catabolisables, sont favorables (dextrines, amidon, par exemple).

De nombreuses productions d'antibiotiques sont ainsi soumises à la répression catabolique, par le glucose le plus généralement, ou par le glycérol, voire même le citrate. Cette répression catabolique semble être due aux intermédiaires cataboliques du glucose, par exemple l'enzyme qui catalyse la formation du cycle du phénoxazinone de l'actinomycine est inhibée par le glucose.

Chez certains microorganismes, l'effet inhibiteur du glucose sur la production des métabolites secondaires est pH dépendant. Il est dû à l'acidification par suite de l'accumulation des acides organiques.

Les sources de carbone lentement assimilées, tel que l'amidon, permettent de meilleurs rendements de production d'antibiotiques chez les champignons.

Par exemple, le glucose est sans effet négatif lorsqu'il est en présence d'amidon et l'utilisation du glucose associé à d'autres constituants carbonés peut dans certaines conditions d'alimentation, mener à de fortes productions de tylosine. Ainsi, l'alimentation d'une culture de *Streptomyces fradiae* de 48 h avec un milieu d'alimentation contenant du glucose, du glutamate et du méthyleoléate, a permis de maintenir la production de la tylosine à un taux de biosynthèse élevé, pendant toute la fermentation.

Concernant la régulation de la production de la spiramycine par la source de carbone, ont trouvé que la capacité des différentes sources de carbone à permettre la production de la spiramycine, par ordre décroissant, est la suivante : dextrines, amidon, glucose, lactose, fructose et galactose.

L'addition de 30 g/L de glucose, entraînait un arrêt de la biosynthèse de la tylosine.

b- Régulation par les acides gras

Les acyl-CoA produits à partir des acides gras sont d'excellents précurseurs de la synthèse des macrolides.

La production de la spiramycine en milieu synthétique est facilitée par l'ajout de différents acides gras.

Le palmitate, l'oléate et le méthyloléate, à raison de 20 mM, stimulent la biosynthèse de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*, alors que l'acétate et le propionate ont besoin d'être couplés au butyrate pour avoir un effet stimulateur.

L'addition de 1 % d'oléate de méthyle dans le milieu producteur améliorerait la production de nigéricine.

c- Régulation par la source azotée

Les fortes concentrations des milieux en ammonium ou en composés azotés rapidement métabolisés suppriment la biosynthèse de nombreux antibiotiques.

L'effet négatif des sources d'azote peut être éliminé par le choix dans le milieu de culture d'un substrat naturel approprié (ex.: farine de soja) ou d'acides aminé lentement métabolisés (cas de la proline pour la production de streptomycine).

L'addition de phosphate de magnésium ou le zéolite permet dans certains cas d'augmenter la production de divers antibiotiques en piégeant l'excès d'ions ammoniums présents dans le milieu de culture. En effet, les productions de tylosine et de céruléine sont améliorées respectivement de 3 et 7 fois quand la fermentation est additionnée de 1 % de zéolite naturel.

Cours de Génie microbiologique

L'ammonium inhibe la formation de deux enzymes de la voie de biosynthèse de la céphalosporine chez *Streptomyces* : la cyclase et l'expandase, ainsi que de l'anhydrotétracycline oxygénase responsable de la biosynthèse de la tétracycline.

L'addition d'ammonium au milieu de culture augmente la production de certains métabolites secondaires tels que la streptomycine, la néomycine et la gentamicine. Cet effet positif est dû à la conversion de l'ammonium en glutamine, utilisée dans la formation des précurseurs.

La méthionine est bien connue pour son effet stimulateur sur la biosynthèse de la céphalosporine C, quand elle est ajoutée pendant la phase de croissance de *Cephalosporium acremonium*.

L'utilisation de la lysine et de l'isoleucine (même à de fortes concentrations) assure une bonne production de la spiramycine. Cependant, la thréonine, l'alanine et la valine ne stimulent la biosynthèse de la spiramycine qu'à faible concentration.

d- Régulation par le phosphate

La synthèse de nombreuses familles d'antibiotiques est supprimée en présence de fortes concentrations en phosphate.

Dans de nombreux cas, la production de l'antibiotique débute lorsque le milieu est carencé en phosphate (ex: candicidine, tétracycline, tylosine).

La présence dans le milieu de culture du phosphate de magnésium permet d'améliorer de 2 à 10 fois la production de la leucomycine et la spiramycine.

e- Régulation par les sels minéraux et les oligoéléments

La streptomycine et la tétracycline, sont améliorées par l'addition respectivement de 0,5 % et 1 % de NaCl. Cependant, l'addition de NaCl dans le milieu de culture d'une souche mutante de *Streptomyces fradiae* restaure la production de l'antibiotique.

Le Fe₂(SO₄)₃ stimule la production de la monensine par *Streptomyces cinnamonensis*.

12- Les plantes génétiquement modifiées

Les plantes à rendement productif améliorées ou protégées contre les maladies, la résistance à la sécheresse, la tolérance accrue aux sels.

Agrobacterium tumefaciens est attiré par des composés phénoliques dégagés par les plantes dicotylédones lorsqu'elles sont blessées. Au niveau de cette blessure, *Agrobacterium* est capable de se fixer sur les cellules du végétal. A la suite de ce contact, ces cellules végétales se multiplient de manière importante, donnant naissance à une formation tumorale. Elle est en général située au niveau du collet, d'où le nom de cette formation : la galle du collet (crown gall).

Les cellules de la galle libèrent des composés chimiques particuliers dans le milieu : les opines, molécules formées de deux acides aminés couplés.

Les bactéries *Agrobacterium* présentes près de la galle, dans le sol, sont capables d'utiliser alors ces opines comme source d'azote, mais aussi de carbone et d'énergie.

Agrobacterium tumefaciens est donc capable d'induire, chez une plante dicotylédone, la formation d'une galle lui fournissant un substrat.

Depuis 1974, on sait que cette induction est due au transfert d'un petit ADN plasmidique depuis la bactérie jusque dans le génome des cellules de la plante.

L'augmentation du contenu en proline peut stimuler la résistance des plantes aux stress salin, ainsi l'insertion des gènes impliqués dans la synthèse de la proline chez *E.coli* dans des plantes de tabac augmente la production de cet amino-acide chez les plantes transgéniques et leur résistance au sel.

13- La nanobiotechnologie

La génération d'une charge électrique sous l'effet d'une pression ou d'une déformation est définie comme l'effet piézoélectrique découvert en 1880 par les frères Curie.

Les phages ont cette propriété, qui a été exploitée par un groupe de chercheurs pour générer du courant piézoélectrique, 20 couches microscopiques régulières de virus sont déposées sur un film de 1 cm², bordé de 2 couches d'or reliées chacune à un fil conducteur, le dispositif génère un courant de 6 nano-ampère.

Belcher et ses collaborateurs ont ouvert en 2006 la voie pour la construction de batteries au lithium dont les électrodes sont des nanofilaments utilisant le phage M13, le phage modifié capable de se fixer sur sa surface du cobalt, se comporte alors comme une électrode de batteries à ions lithium.

14- Les organismes vivants artificiels

La fabrication artificielle d'organismes vivants *de novo* qui n'existent pas dans la nature. En 2010 l'équipe de Craig Venter a réalisé le premier remplacement du génome entièrement synthétisé d'une séquence *in silico* de *Mycoplasma capricolum* de la bactérie *Mycoplasma genitalium* aboutissant à une bactérie viable.

Les problèmes soulevés par les avancées dans la technologie de synthèse de l'ADN sont complexes que leurs applications prometteuses.

En cas de dissémination d'un microorganisme génétiquement modifié dans l'environnement, il existe un risque difficilement évaluable de la modification de la diversité naturelle par compétition entre l'organisme synthétique et les souches sauvages, impactant alors différentes fonctions écosystémiques (cycles biogéochimiques).

Avec l'augmentation croissante des connaissances sur les facteurs de virulence et la baisse du coût de séquençage, il sera de plus en plus facile de créer avec des coûts, équipements et connaissances minimaux des super virus ou super bactéries pathogènes (bioterrorisme), cette préoccupation est très bien illustrée par la polémique soulevée par la création d'un virus grippal H5N1 potentiellement mortel par l'équipe de professeur Fournier en 2012.

15- La production de méthane

La méthanisation est une digestion anaérobie, ou fermentation méthanique, qui transforme la matière organique en compost, méthane et gaz carbonique. Il existe 4 phases :

a- L'hydrolyse

Les microorganismes anaérobies facultatifs hydrolysent les molécules organiques (carbohydrates, lipides et protéines) en acides gras volatiles comme l'acétate, le formiate, le butyrate, le propionate, en alcools et en hydrogène et gaz carbonique. Les principales espèces appartiennent aux genres *Clostridium*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Enterobacteroides*, *Propionibacterium* et *Butivibrio*.

b- L'acidogénèse

Fait intervenir des microorganismes très répandus et très nombreux dans l'environnement. Leur métabolisme conduit, après hydrolyse des molécules organiques, à la formation d'alcools, puis d'acides (acide acétique, acide lactique, acides gras volatils comme l'acide propionique et l'acide butyrique). Parmi ces bactéries, on retrouve : *Clostridium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Streptococcus*.

c- L'acétogénèse

Au cours de cette étape, l'oxydation des substrats (surtout les acides propionique et butyrique et l'éthanol) est couplée à la formation d'hydrogène, de dioxyde de carbone et d'acétate.

Elle représente l'activité de trois groupes de bactéries :

Les homoacétogènes des genres *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Sporomusa*, *Acetogenium*, *Acetoanaerobicum*, *Pelobacter*, *Butyribacterium* et *Eubacterium*.

Les syntrophes des genres *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas* et *Syntrophus*.

Les sulfito-réductrices des genres *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum* et *Desulfomonas*.

d- La méthanogénèse

Les produits de cette seconde étape d'acétogénèse sont convertis en méthane par des microorganismes anaérobies stricts : les méthanogènes appartenant au domaine des *Archaea*. Deux grandes catégories d'*Archaea* méthanogènes sont responsables de la production de méthane.

Les bactéries méthanogènes acétoclastes (acétotrophes) transforment l'acétate et le méthanol en méthane et en gaz carbonique, elles appartiennent aux genres *Méthanosarcina* et *Methanotherix*.

Les bactéries méthanogènes hydrogénophiles quant à elles transforment le gaz carbonique et l'hydrogène (fournit par les bactéries fermentaires avec lesquelles elles vivent en association syntrophique) en méthane et en eau. Les genres les plus représentés sont *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* et *Methanospirillum*.

16- La production des enzymes

Parmi toutes les enzymes utilisées industriellement, plus de la moitié proviennent de champignons ou de levures, environ un tiers sont d'origine bactérienne et ce qui reste se divise entre les sources animales (8 %) et végétales (4 %).

Les amylases sont produites par *Aspergillus*, invertases sont produites par *Candida*, *Alternaria* et *Penicillium*, inulase et pectinase sont produites par *Rhizopus*.

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.

Aspergillus niger est un producteur de glucoamylase. La conversion du glucose en fructose peut être accomplie par une glucose isomérase bactérienne dont les producteurs principaux sont des espèces de *Streptomyces* et *Bacillus coagulans*.

La production commerciale de l'asparaginase s'effectue par des mutants sélectionnés d'*Escherichia coli*, d'*Erwinia carotovora*.

Les pénicillines acylases, sa production industrielle s'effectue par des mutants sélectionnés d'*E. coli*.

17- Immobilisation des enzymes

Dans l'utilisation industrielle des enzymes, qui sont de nature soluble, il est souvent bénéfique de les immobilisées sur un support insoluble. Dès 1916, Nelson et Griffith ont constaté que l'invertase, qui catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose, conservait son activité lorsqu'elle était adsorbée sur du charbon actif ou de l'hydroxyde d'aluminium.

Dans ce type de procédé, les microorganismes producteurs n'évoluent pas librement dans le milieu, mais sont immobilisés sur un support ou une matrice. À l'entrée il y a introduction du milieu frais qui alimente la biomasse et à la sortie un milieu fermenté qui contient le produit désiré.

a- Immobilisation par adsorption

Repose sur l'établissement d'interactions de type liaisons de faible niveau énergétique (van der Waals, ionique, hydrogène, transfert de charges, échange de ligands, hydrophobe et pont métallique) entre les groupes fonctionnels situés à la surface de la molécule d'enzyme et ceux présents à la surface du support insoluble (supports minéraux : les alumino-silicates, la silice et le verre poreux, les oxydes métalliques, les charbons actifs ; supports organiques : collagène, cellulose, amidon et agarose).

Ce type d'immobilisation est un processus ancien utilisé lors de la fabrication du vinaigre, dans lequel les *Acetobacter* sont adsorbés sur des copeaux d'hêtre. Maintenant, on utilise des billes de cellulose (ex : *Nocardia erythropolis* : conversion des stéroïdes).

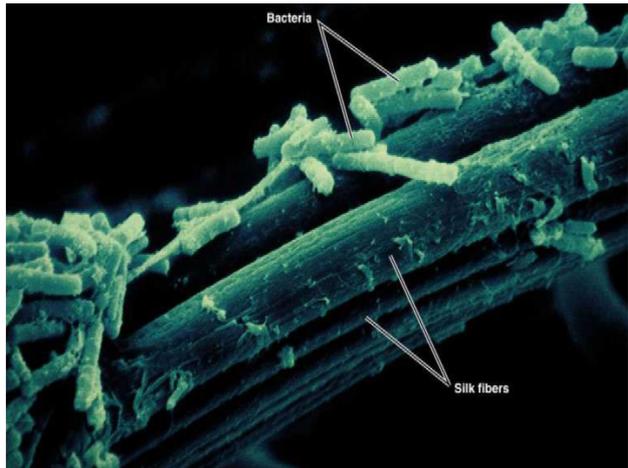


Figure 1 : Immobilisation par adsorption

b- Inclusion dans une matrice

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. L'un des polymères, les plus utilisés, est le polyacrylamide.

La polymérisation peut s'effectuer en masse, le gel étant ensuite divisé en particules, soit en émulsion dans un solvant non miscible à l'eau pour obtenir directement des billes de gel, avec incorporation des microorganismes dans une matrice d'un polymère rigide tel que l'alginate de sodium (*S. cerevisiae* : production d'alcool, *Methanosarcina barkeri* : production de méthane, polyacrylamide ; *Arthrobacter simplex* : production d'hydrocortisone, *B. subtilis* : production d' α -amylase).

18- Autres produits

Une mention peut être faite d'une dégradation de déchets celluloses par *Trichoderma*, puis par des levures, qui donne un mélange d'acétone, de butanol et d'éthanol.

La production des polyols c'est le cas de *Candida zeylanoides*, qui fournit du *meso*-érythritol et du mannitol, de *Yarrowia lipolytica* (mannitol), *Candida tropicalis* (arabitol), *Pichia miso* (glycérol, arabitol, érythritol), etc.

L'utilisation de la bactérie déinocoque permet de produire des molécules bio-sourcées, telles que le bioéthanol. La bactérie déinocoque a été isolée pour la première fois en 1956, à l'intérieur d'une boîte de conserve qui avait été irradiée en vue de sa stérilisation. Malgré ce traitement puissant, le déinocoque a survécu. L'intérêt d'une bactérie présentant de telles propriétés de résistance à des fins industrielles a été exploité à partir de 2006, en particulier pour convertir de la biomasse en produits d'intérêt industriel, tels que le bioéthanol.

Pendant de nombreuses années, *Thiobacillus ferrooxidans* a été utilisé pour extraire certains métaux de minerais (Biomining ou Biolixiviation).

Le traitement des eaux usées se fait en aérobie ou en anaérobie qui consiste à l'ajout des bactéries (filtre biologique ou lit bactérien). Comme bactéries citons : *Zoogloea ramigera*, *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Clostridium* spp. et *Bacteroides* spp..

Les microorganismes décomposeurs (biodégradables) utilisées dans le recyclage des déchets urbains, les bactéries dégradent les carburants et les déchets pétroliers (*Garcisella nitratireductans* et *Petrobacter succinatimandens*).

L'intérêt de produire de l'éthanol vient du fait que c'est une substance énergétique stratégique et son utilisation couvre un champ étendu d'activités industrielles : fabrication de spiritueux, d'intermédiaires chimiques (produits de beauté, parfums, cosmétiques, produits pharmaceutiques), de solvants, de détergents, de désinfectants et d'acides organiques... etc.

Cours de Génie microbiologique

La fabrication d'éthanol à partir de grains de maïs ou blé est un procédé connu depuis très longtemps par la levure *Saccharomyces*.

L'éthanol peut être dégradé totalement en CO₂ et H₂O comme chez certaines levures (*Brettanomyces*, *debaryomyces*, *Hansenula* et *Pichia*...etc) comme il peut être transformé en acide acétique (*Acetobacter*, *Gluconobacter*).

La cellule végétative de *Bacillus thuringiensis* n'est pas toxique, mais le cristal de protéine est efficace en tuant les lépidoptères. Cette molécule est très efficace contre les insectes ayant un pH intestinal alcalin, car la protéine toxique est solubilisée à des pH élevé.

Les protéines des spores ingérées sont clivées par des protéases intestinales et les toxines détruisent les cellules épithéliales de l'intestin. Les contenus de l'intestin passent dans le sang, entraînant une paralysie et la mort de l'insecte.

Bacillus thuringiensis se multiplie aisément en fermenteur submergé, et produit dans les conditions appropriées des spores et des corps parasporaux en trente heures. Après l'inoculation du milieu de culture dans le fermenteur, les spores et les cristaux sont récupérés et incorporés dans un adjuvant inerte avant d'être vendus comme insecticide à pulvériser sur les plantes. Le produit actif est naturel, et est dégradé par les microorganismes du sol.

19- Fiche TP N° 1 : Levain de panification

Il s'agit à la base, d'un mélange de farine de blé ou de seigle, du sel et de l'eau potable soumise à une fermentation lente (24 à 48 h) initiée par des levures et des bactéries lactiques contenues dans la farine, c'est le levain chef.

Il est utilisé comme inoculum pour la fabrication du pain. Le développement et l'activité des levains sont maintenus par une incorporation périodique et répétée de farine et d'eau à la température ambiante entre 20 et 35°C. Cette opération s'appelle le rafraîchi. Ainsi, les microorganismes continuent à produire des acides. Le levain suffisamment actif, prêt à être incorporé dans le pétrissée est appelé « levain tout point ».

Un levain peut être préparé à partir des bactéries lactiques sélectionnées, seules ou en mélange avec des levures, permettant d'ensemencer une pâte en vue de l'élaboration rapide d'un levain. Dans ce cadre, on distingue deux types de ferments: les levains liquides et les starters lyophilisés.

Un levain naturel de panification est constitué d'un équilibre entre les bactéries lactiques et les levures avec un ratio moyen de $10^9 / 10^7$ UFC/g respectivement. C'est les bactéries lactiques qui dominent dans les pains aux levains. Ces germes préexistants dans la farine sont également apportés par l'air ambiant et le milieu du travail.

Expérience : Préparation d'un levain

- Ajout de la farine dans une boîte ;
- Ajout de l'eau sur la farine ;
- Mélange de la farine avec l'eau ;
- Incubation à température ambiante pendant plusieurs jours.

20- Fiche TP N° 2 : Isolement des bactéries lactiques

Le terme bactéries lactiques a été défini pour la première fois en 1919 par Orla-Jensen basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques.

Il ne désigne pas une classe phylétique mais un ensemble de bactéries à Gram positif, catalase négative, non sporulantes, immobiles et qui produisent majoritairement de l'acide lactique par la fermentation de composés glucidiques. La production de l'acide lactique est accompagnée par la production d'autres composés comme le dioxyde de carbone, le peroxyde d'hydrogène et l'acide acétique. Ce terme est utilisé pour les genres de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*.

Le milieu utilisé pour l'isolement de la flore lactique est le milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe) à pH : 6,8 en condition d'anaérobiose.

Pour mieux sélectionner certains genres et espèces il faut utiliser le milieu MRS avec des modifications par exemple :

- Changement du pH à 5,4 pour sélectionner les lactobacilles
- Ajout de CaCo₃ ou de BCPL pour sélectionner les souches acidifiantes
- Ajout de teween 80 pour bien identifier les coques
- Ajout de cysteine ou l'acide formique pour sélectionner les lactobacilles
- Ajout de vancomycine pour sélectionner les leuconostoc et les lactobacilles
- Ajout de l'azide de sodium pour sélectionner les enterocoques
- Exposition au vapeur de lugol pour sélectionner les souches amylolytiques
- Ajout de parafilm, l'huile de paraffine, vaseline, ou conditionnement dans un sachet hermétiquement clos, ou dans des jarres spécifiques pour la création de l'anaérobiose, ou dans des jarres avec bougie ;
- Ajout de NaCl ou de la bile pour sélectionner les souches à caractère probiotique

Expérience : Isolement en profondeur

- Préparation de la dilution ;
- Ajout de 1ml de la dilution dans la boîte Pétri ;
- Ajout de milieu MRS ;
- Incubation à 30-37 °C/ 48-72h en condition d'anaérobiose ;
- Examen de colonies (coloration de Gram avec test de catalase).

21- Fiche TP N° 3 : L'activité anti-microbienne

Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans l'inhibition des microorganismes responsables de l'altération alimentaire. Cette action est due à l'abaissement du pH, à la toxicité propre de l'acide lactique, mais aussi à la sécrétion de bactériocines, le peroxyde d'hydrogène et le diacétyl.

Actuellement l'étude des conservateurs biologiques est en plein essor et contribue à remplacer les additifs chimiques par ce qui est naturel et préserve les produits alimentaires.

Expérience : Recherche de l'activité antimicrobienne par la méthode qualitative

- Ensemencement par touche de la bactérie lactique sur la surface de milieu MRS ;
- Incubation à 30-37 °C pendant 24-48h ;
- Ajout de milieu MH additionné de la souche indicatrice;
- Incubation à 30-37 °C pendant 24-48h ;
- Mesure de diamètre des zones d'inhibition.

22- Fiche TP N° 4 : Conservation des souches

Les procédés de lyophilisation et de congélation à basse (jusqu'à -70 °C) ou très basse température (jusqu'à -196 °C) permettent de conserver des échantillons dont la durée de vie peut excéder plusieurs années.

Ces techniques, impliquant d'importants refroidissements ou un vide poussé, induisent une forte mortalité. Pour limiter ces effets, l'utilisation de cryoprotecteurs tels, le glycérol, ou le DMSO (diméthylsulfoxyde) est recommandée.

Pratiquement, c'est à partir d'une culture en milieu liquide en phase exponentielle de croissance, y ajouter une solution stérile du cryoprotecteur (10 à 20 % en volume).

Conservation courte durée est réalisée par le stockage de culture à 4-10 °C pendant 1 ou 2 semaines.

Certaines souches peuvent sporuler sur milieux solides. Cette forme de résistance accrue des cellules doit être utilisée pour la conservation, sous forme de stocks congelés, de ces spores. Après sporulation sur un milieu solide adéquat, les spores et le mycélium peuvent être décrochés de la gélose par une solution stérile d'eau physiologique. La suspension est filtrée sur coton cardé pour éliminer le mycélium, additionnée de cryoprotecteur.

Le papier filtre est utilisé aussi pour la conservation des spores ainsi que le sol surtout pour les microorganismes telluriques sporulés. L'eau distillée est utilisée en particulier pour la conservation de *Pseudomonas solanaceanum*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Sarcina lutea*.

Expérience : Conservation de courte durée

- Purification de la colonie ;
- Inoculation dans un tube incliné ;
- Incubation à 30 °C/24h-48h ;
- Conservation au réfrigérateur pendant 15 jours ;
- Repiquage des souches conservées.

23- Fiche TP N° 5 : La production des exopolysaccharides

Les polysaccharides bactériens sont des polymères complexes assurant à l'organisme qui les produit un avantage compétitif vis-à-vis de son environnement.

Au stade laboratoire, la bactérie productrice du polysaccharide le synthétise spontanément sur boîte Pétri. Il est cependant possible d'optimiser cette production en intégrant la souche dans un procédé industriel de fabrication.

Le passage du stade laboratoire au stade industriel de la culture d'un microorganisme s'accompagne toujours de la nécessité d'une détermination des besoins nutritionnels élémentaires de la souche sélectionnée. Alors que l'azote et le carbone sont des éléments assez simples à maîtriser (rapport carbone sur azote, type et pureté des sucres et des protéines utilisés...etc.)

Expérience : Recherche de bactéries lactiques EPS⁺

- Préparation de milieu MRS modifié (changement de concentration de glucose) ;
- Inoculation de la bactérie lactique sur la surface de milieu ;
- Incubation à 30-37°C pendant 24-48h ;
- Examen de colonie (EPS⁺ : aspect visqueux).

Références bibliographiques

1. Bourquelot E, 1889, Les fermentations, Welter, 170 pp.
2. Delaunay S, Rondags E, Germain P, 2003, Production d'antibiotiques par biotechnologies, Technique de l'ingénieur.
3. Fatemeh S, Reihani S, Khosravi-Darani K, 2019, Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review, *Electronic Journal of Biotechnology* 37, 34-40.
4. Laakel M, 1992, Biosynthèse de la spiramycine par *streptomyces ambofaciens*: régulation de la biosynthèse et caractérisation de l'acétate kinase et des systèmes fournisseurs du malonyl-CoA, Thèse doctorat, Université de Lorraine.
5. Luciano P, Liébart J-C, 2015, Microbiologie Biologie des procaryotes et de leurs virus, Dunod, 512 pp.
6. Moretti E, Felippone F, 1996, Acide citrique par fermentation, Technique de l'ingénieur.
7. Noël ROUY, 1997, Pénicilline, Technique de l'ingénieur.
8. Thomas H, 2003, Industrial production of amino acids by coryneform bacteria, *Journal of Biotechnology* 104, 155-172.