

## CHAPITRE I : Production des protéines

### Introduction

Les protéines: sont les molécules les plus complexes et les plus variées des êtres vivants. On fabriquerait ~100 000 protéines différentes qui constituent 50% ou plus du poids sec de la cellule.

Les protéines sont des biomolécules de première importance :

- par leur présence universelle dans le monde vivant (des virus jusqu'aux animaux supérieurs), seuls des viroïdes en sont dépourvus.
- par leur abondance cellulaire : c'est le premier constituant après l'eau (10 fois plus que des glucides).
- par leur extrême diversité : elles assurent des fonctions vitales tant structurales que dynamiques et de plus elles sont le support de la spécificité des "espèces".

### 1.1. Classification des protéines

La classification des protéines peut être par différents critères

#### 1.1.1. Selon la forme :

##### 1.1.1.1. Protéines fibreuses

Ce sont des polypeptides allongés enroulés autour d'un axe sous forme hélicoïdale. Ce sont des protéines de structure qui peuvent être :

**Extracellulaires** insolubles dans l'eau, assurent la fonction de protection par exemple Kératine des cheveux, fibroïne de la soie et l'élastine de la peau.

**Intracellulaires** : par exemple la myosine et tropomyosine.

##### 1.1.1.2 Protéines globulaires

Ce sont des protéines de forme sphérique plus complexes, solubles dans l'eau, elles présentent une grande activité biologique. Ces protéines peuvent être :

**Membranaires** : par exemple : transporteurs, récepteurs, protéines d'adhésion et canaux ioniques.

**Solubles : circulantes** plasmatiques **exemple** les hormones protéiques, albumine....

#### 1.1.2. Selon la composition chimique :

On distingue deux(02) catégories

##### 1.1.2.1. Holoprotéines :

Par hydrolyse ne libèrent que des acides aminés. (Par exemple albumine et globuline).

##### 1.1.2.2. Hétéroprotéines

Ce sont des protéines conjuguées formées d'une fraction protéique (apoprotéine) et fraction de nature non protéique (qui peut être un groupement prosthétique)

Exemple : métalloprotéines, lipoprotéines glycoprotéines ( 5 à 40% glucides) proteoglycanes ( 90% glucides) et nucléoprotéines.

## **1.2 . Composition des protéines**

- Toutes les protéines contiennent du carbone, de l'oxygène, de l'hydrogène et de l'azote.
- Presque toutes comprennent du soufre(S) et parfois du phosphore(P), fer (Fe), Zinc(Zn), et du cuivre (Cu).
- Une protéine, est une macromolécule composée par une chaîne d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. On parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 100 acides aminés(Aa).
- Toutes les protéines résultent de la combinaison de 20  $\alpha$  aminoacides différents.
- Par hydrolyse acide, basique ou enzymatique, ces Aa sont libérés. L'enchaînement de ces Aa est codé par le génome.
- Un peptide peut être un oligopeptide ( $02 \leq 10$  Aa), polypeptides de 10 à 100 Aa.
- Une protéine est formée d'un ou de plusieurs peptides.
- Chaque chaîne polypeptidique possède un poids moléculaire défini, une composition chimique, un ordre séquentiel de ces(Aa) constitutifs et une forme tridimensionnelle bien déterminée.

## **1.3.Différentes fonctions des protéines**

Cette classe de macromolécules est caractérisée par sa grande diversité fonctionnelle.

- Biologiquement et quantitativement, la classe la plus importante est celle des protéines enzymatiques. Des milliers d'enzymes toutes différentes sont connues, chacune catalyse un type particulier de réaction biochimique.
- Les protéines possèdent diverses autres fonctions importantes :
- Elles transportent d'autres molécules comme l'hémoglobine qui transporte l'oxygène des poumons aux différents organes et l'hémocyanine.
- Elles jouent le rôle d'hormone et transmettent des messages à travers l'organisme, comme l'insuline.
- Elles assurent des fonctions :
  - de réserve, de stockage d'aminoacides que l'embryon utilise pour son développement (ovalbumine de l'œuf).
  - des fonctions de structures comme le collagène des tissus conjonctifs et de l'os.
- Elles donnent une forme aux cellules comme le cytosquelette (microtubules, microfilaments et filaments intermédiaires).
- Elles permettent aux cellules de se mouvoir comme les flagelles ou les spermatozoïdes.
- Certaines protéines ont des fonctions de protection ou de défense comme les protéines de coagulation sanguine, les anticorps ou les immunoglobulines, qui permettent de reconnaître le soi du non-soi.
- Elles permettent la régulation de la machinerie métabolique : ce sont les activateurs ou les répresseurs.
- Les protéines peuvent être nuisibles : comme les toxines.

Toutes les protéines renferment les mêmes aminoacides mais les **proportions relatives** et **l'ordre d'enchaînement** des acides aminés diffèrent d'une protéine à l'autre. C'est cet ordre d'enchaînement ou séquence des aminoacides qui confère à chaque protéine son **caractère spécifique**.

-Sont constamment renouvelées (6 à 20 g d'azote éliminés par jour).

Le plan de fabrication de chaque protéine est conservé dans l'ADN au niveau de son gène.

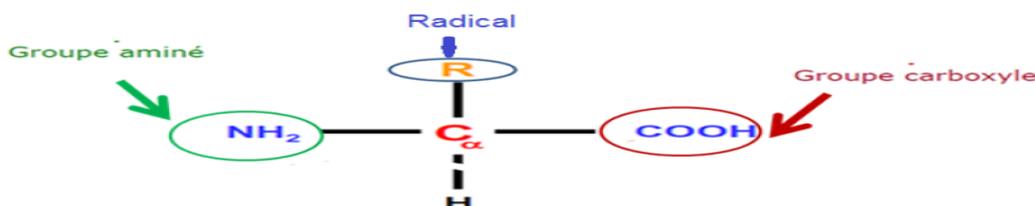
### 1.4. Structure des protéines

Les protéines peuvent être décrites selon quatre niveaux d'organisation structurale. Une séquence linéaire d'acides aminés, formant une chaîne polypeptidique, constitue la structure primaire de la protéine. Cette structure qui ressemble à un chapelet de « perles » d'acides aminés, est le squelette de la molécule de protéine. Ce squelette se tord et se replie sur lui-même pour donner des niveaux d'organisation moléculaires plus complexes (structures secondaire, tertiaire et quaternaire).

#### *1.4.1. Les $\alpha$ -aminoacides*

Les  $\alpha$ -aminoacides ont pour une formule générale  $R - C_{\alpha} - (H, NH_3^+) - COOH$

Où un carbone tétraédrique chiral (asymétrique)  $C_{\alpha}$  est uni à un carboxyle  $-COOH$ , une amine primaire  $-NH_3^+$ , un atome d'hydrogène  $-H$  et une chaîne latérale  $-R$  (radical) qui confère à l'acide aminé une structure qui lui est propre (**Fig. 1**).



**Figure 1** : structure générale d'un aminoacide

Selon le caractère polaire ou des propriétés chimiques du radical **R** : C'est la classification retenue. Les acides aminés sont regroupés en 04 classes :

- a) **Aminoacides à chaîne latérale non polaire ou hydrophobe** ( Ala ;leu ; Ile, Val ; Pro Met ;Phe ; et Trp).
- b) **Aminoacides avec une chaîne latérale (R) polaire non chargée** : ces acides aminés, leurs chaînes latérales contiennent des groupements fonctionnels neutres (non chargés).

Cette classe comprend les Aa suivants : ;Ser ; Thr ; Tyr Asn ; Gln ; Cys et Gly.

- c) **Aminoacides avec une chaîne latérale (R) chargée négativement** :

Cette famille d'Aa renferme 2 Aa : Asp. et Glu.

- d) **Aminoacides avec une chaîne latérale( R) chargée positivement** :

Cette famille renferme 3 Aa : Lys ; Arg et His.

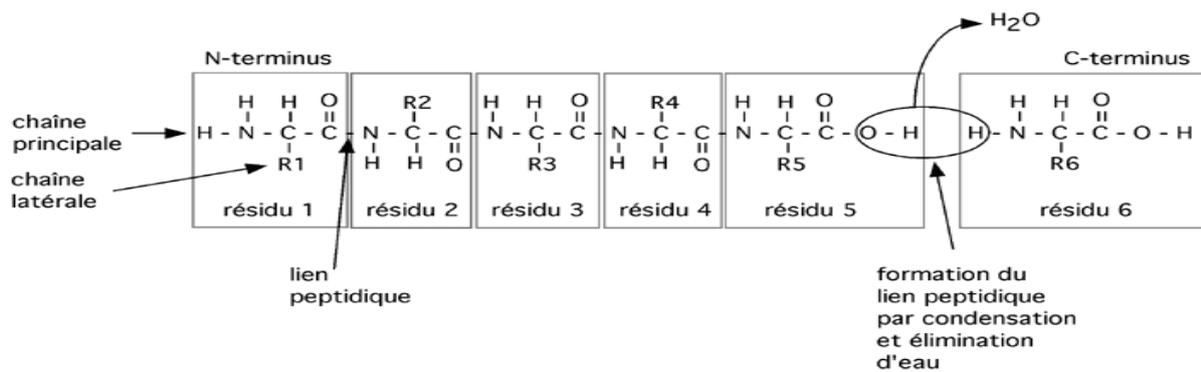
On peut aussi diviser les acides aminés selon le besoin alimentaire en deux catégories : essentiels et non essentiels. Les Aa essentiels doivent apporter à l'organisme à partir

d'aliments ou de suppléments alimentaires que nous ingérons, puisque notre corps ne peut pas les synthétiser. Chez l'Homme, 8 Aa semblent indispensables: le tryptophane, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, la valine, la leucine et l'isoleucine. Deux acides aminés de plus sont essentiels pour l'enfant: l'arginine et l'histidine. Seuls deux sont strictement indispensables (lysine et thréonine).

Les ruminants, grâce à leur flore intestinale, ont des ressources plus vastes.

### 1.4.2. Structure primaire

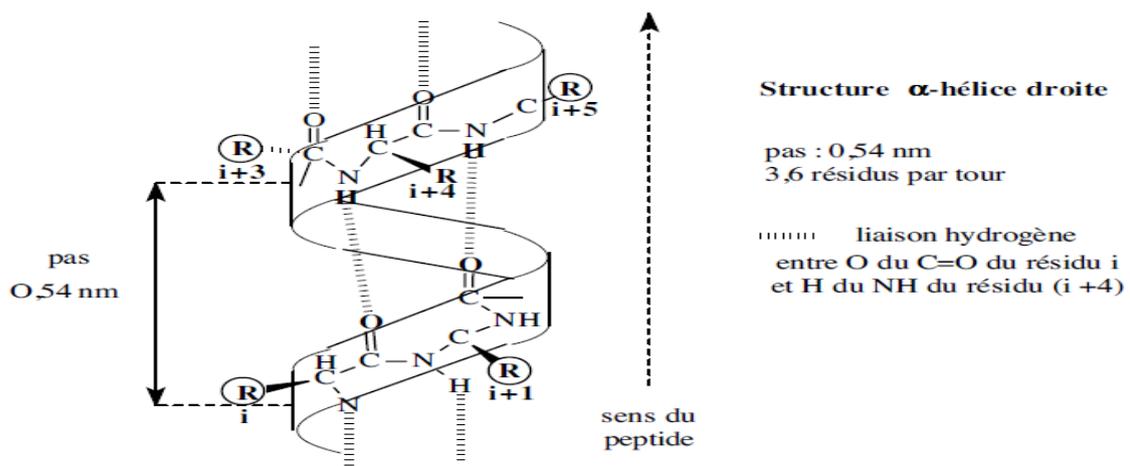
La structure primaire est formée par des aminoacides unis par des liaisons peptidiques. Elle se présente donc comme une succession de plans contenant des unités peptidiques  $-C\alpha-CO-NH-C\alpha-$  qui crée une chaîne principale d'où se projettent les chaînes latérales (**Fig. 2**).



**Figure2.** Formation de la structure primaire des protéines.

### 1.4.3. Structure secondaire

Lorsque certaines régions de la chaîne polypeptidique se replient de manière hélicoïdale hélice  $\alpha$  ou parallèle en formant des régions pliées de feuillet  $\beta$ . Il s'agit de la structure secondaire (**Fig. 3**)



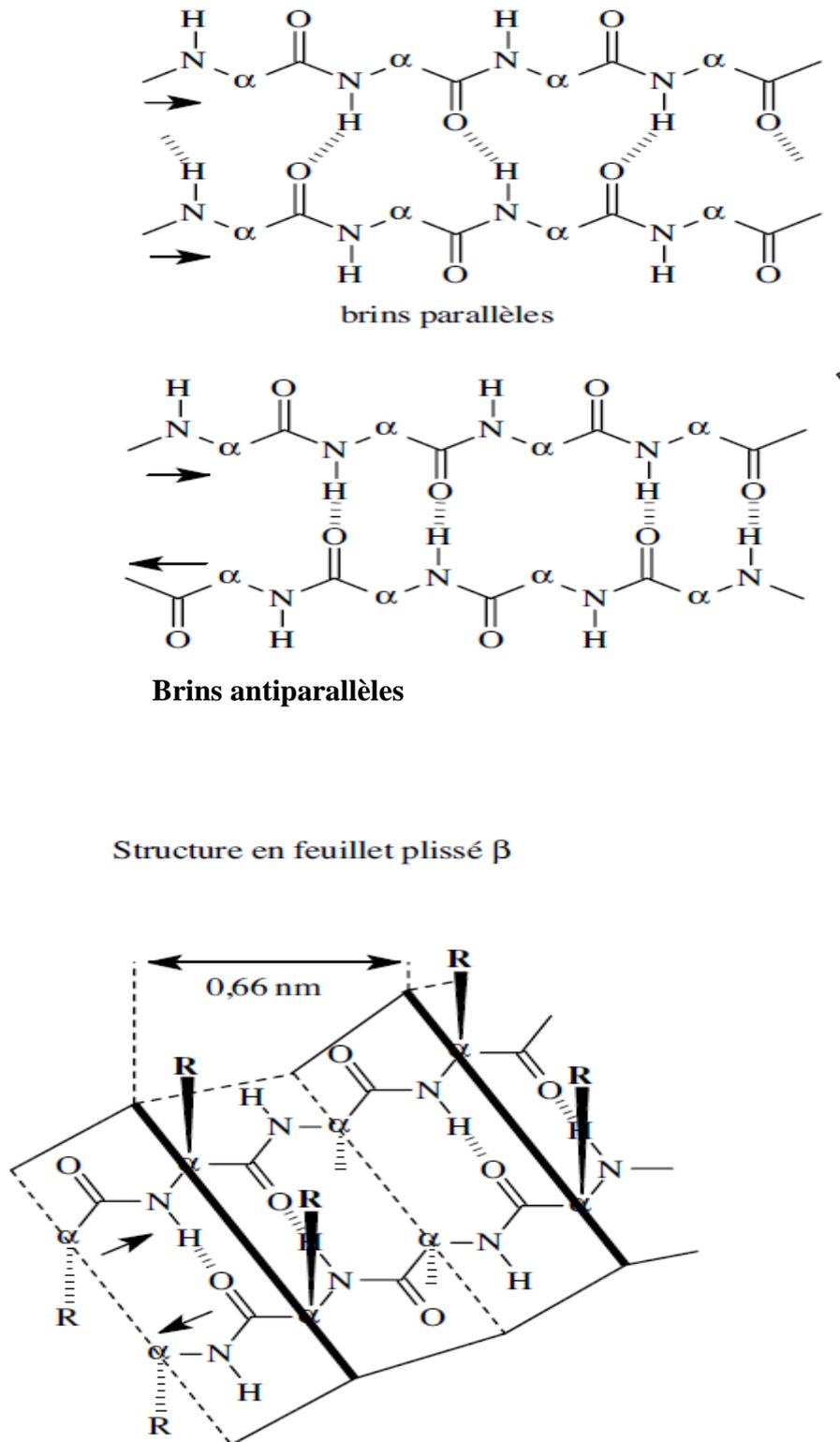
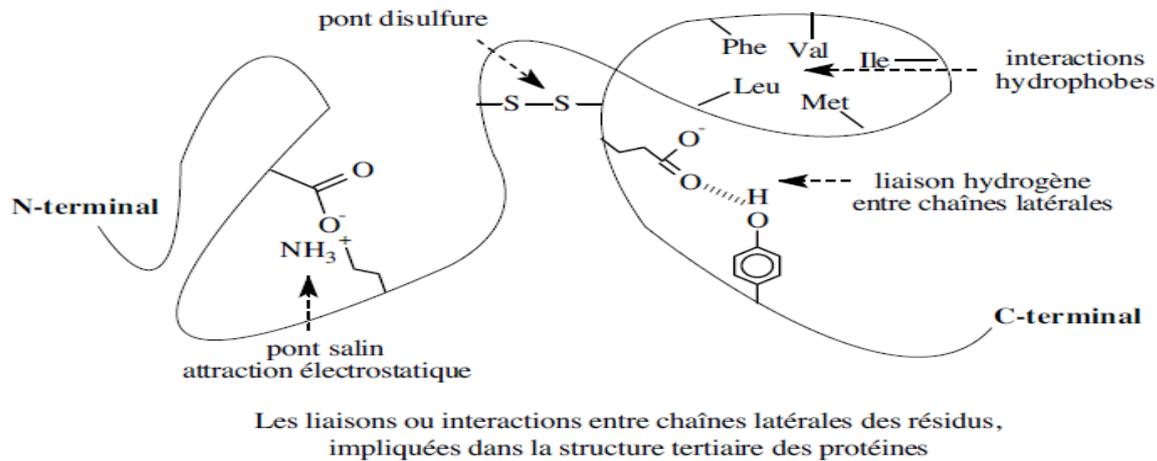


Figure 3. Feuillet B et l'hélice  $\alpha$  de la structure secondaire des protéines.

#### 1.4.4. Structure tertiaire

La structure tertiaire est le repliement dans l'espace d'une chaîne polypeptidique. Ce repliement donne une fonctionnalité à la protéine, notamment par la formation du site actif

des enzymes. La structure tertiaire correspond au degré d'organisation supérieur aux hélices  $\alpha$  ou aux feuillets  $\beta$ . Le repliement et la stabilisation de protéines à structure tertiaire dépend de plusieurs types de liaisons faibles qui stabilisent la structure (interactions hydrophobes, des liaisons ioniques, des liaisons de Van der Waals) et parfois des liaisons covalentes (**Fig. 4**).



**Figure 4. Structure tertiaire d'une protéine.**

#### 1.4.5. Structure quaternaire

La structure quaternaire représente l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques possédant chacune sa propre structure tertiaire. Chaque monomère est appelé sous-unité et l'agencement tridimensionnel des sous-unités est stabilisé le plus souvent par le biais d'interactions non covalentes.

On distingue plusieurs types de structures quaternaires. Si deux sous-unités identiques sont associées, on parle de structure homodimérique. Si les deux sous-unités sont différentes, on dira que la structure est hétérodimérique. Il existe des structures multimériques d'ordre supérieur: trimère, tétramère, etc.

On distingue, selon leur forme, deux groupes principaux de protéines, les protéines globulaires, solubles ou transmembranaires, de beaucoup les plus nombreuses, où le repliement des chaînes polypeptidiques conduit à une structure compacte, et les protéines fibreuses qui sont des molécules très allongées.

### **1.5. Sources des protéines**

Les protéines de notre alimentation sont soit d'origine animale, soit d'origine végétale et dans certains cas peuvent être d'origine microbienne.

**1.5.1. Sources animales :** Les protéines animales sont, comme leur nom l'indique, des protéines qui proviennent d'animaux (dans les viandes, les poissons et fruits de mer) (ou d'aliments dérivés, issus des animaux (produits laitiers, œufs).

Les protéines animales sont reconnues pour leur qualité nutritionnelle élevée. Elles sont très digestibles et disposent de teneurs élevées en acides aminés essentiels. Elles possèdent une

grande efficacité pour satisfaire les besoins protéiques. Lorsque les besoins sont accrus (croissance, grossesse, activité physique, agression, etc.), elles sont très bien adaptées

Les viandes sont composées essentiellement de myosine, de myoalbumine et de collagène. Pour la myosine et la myoalbumine sont considérées comme de protéines d'excellente qualité comportant tous les acides aminés indispensables.

Les poissons représentent des protéines de bonne qualité que la viande. Ils contiennent d'actine, myosine, collagène et myoalbumine.

Les protéines de l'œuf (l'albumine et globuline dans le blanc et vitelline dans le jaune) ont une excellente valeur biologique. Leur composition en acides aminés parfaitement équilibrée.

Le lait contient principalement de caséine, de lactalbumine et de lactoglobuline. Tous les acides aminés indispensables sont présents. Ces protéines sont très bien assimilées par l'organisme.

### ***Inconvénients des protéines animales***

La consommation de protéines animales en excès provoque la production de déchets par l'organisme comme l'acide urique ou l'urée qui peuvent être nuisibles et qui vont demander un travail d'élimination supplémentaire aux reins. De plus, cet excès peut être la source d'une acidification de l'organisme qui peut lui aussi prêter à conséquence et riche en graisse.

### ***1.5.2. Sources végétales***

Les protéines d'origine végétale des céréales (blé, riz, maïs, orge, seigle...) et des produits qui en sont issus (farine, pain, pâtes...), des tubercules (pommes de terre), des légumes secs ou légumineuses (pois cassés, pois chiche, lentilles, fèves, haricots blanc, haricots rouges...) sont, contrairement à ce que l'on pense souvent, déséquilibrées en un ou plusieurs acides aminés indispensables. Cependant, en associant judicieusement les aliments, soit animaux et végétaux (ex : pâtes au gruyère), soit céréales et légumineuses (ex : riz et haricots rouges, semoule et pois chiche, ...), il est possible de constituer un apport de protéines végétales de qualité nutritionnelle acceptable.

Certaines protéines végétales peuvent présenter une teneur faible en certains acides aminés indispensables, la lysine pour les céréales, et les acides aminés soufrés pour les légumineuses. Les légumes secs riche en légumine, les céréales en gliadine et gluténine du blé, zéine du maïs, le sécaline du seigle et hardéine pour l'orge.

### ***1.5.3. Production des protéines à partir des microorganismes (MO)***

L'orientation pour la fabrication de protéines en utilisant des micro-organismes pour les raisons suivantes:

- Les protéines des microorganismes sont très importantes dans l'alimentation humaine et animale car elles sont équilibrées en acides aminés indispensables.
- La récupération et la valorisation de sous-produits des industries agroalimentaires à des fins alimentaires peuvent constituer une alternative intéressante. Il s'agit de la création de biomasse sous forme de protéines d'organismes unicellulaires 'P.O.U'.
- Les protéines des microorganismes sont fabriquées pour les domaines thérapeutiques.

### **1.5.3.1. Avantages d'utilisation des micro-organismes**

Les micro-organismes sont utilisés pour produire des protéines pour les raisons suivantes:

- Extrême rapidité de croissance des cellules microbiennes (50 fois plus rapide que la production bovine).
- Le fait qu'elle ne nécessite pas de terres cultivables de grands espaces.
- L'absence de contraintes saisonnières, cette production étant possible toute l'année sans interruption.
- La modification génétique des micro-organismes.
- Elle demande peu d'espace et peu d'eau, un contenu protéique élevé et génère peu de résidus.

### **1.5.3.2. Inconvénients d'utilisation des microorganismes**

Bien qu'il existe des points positifs pour les micro-organismes, mais il y a quelques points négatifs.

- Les protéines produites peuvent présenter un contenu élevé en acides nucléiques.
- Les microorganismes peuvent produire des toxines ou autres métabolites nuisibles.
- Les protéines produites possèdent des propriétés physiologiques qui peuvent ne pas convenir à la consommation directe par les humains.

## **1.6. Micro-organismes producteurs des protéines**

### ***1.6.1. Définition***

Micro-organismes ou microbes sont des organismes invisibles à l'œil nu, qui ne peuvent être observés qu'à l'aide d'un microscope. Ils sont divisés en trois classes ; les procaryotes, les eucaryotes et non cellulaires (virus).

quatre types de micro-organismes sont utilisés pour la production des protéines. Il s'agit des micro-algues, des bactéries, des levures et des champignons (fungi) filamenteux.

### ***1.6.2. Bactéries***

Une bactérie est un micro-organisme unicellulaire procaryote, elle n'a pas un véritable noyau mais le matériel génétique baigne directement dans le cytoplasme. Les bactéries ont des formes variées (bâtonnet, en filament, arrondie).

La bactérie *Escherichia coli* est largement utilisée dans la production de protéines parce que leur matériel génétique est connu. Il est également facile à implanter dans le fermenteur (les conditions de croissances sont connues). De plus l'expression de protéines est élevée à l'aide de ces bactéries (plusieurs grammes / L de protéine produites).

Autres bactéries sont utilisées comme *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*. Elles sont caractérisées par un fort potentiel de sécrétion mais elles sont génétiquement males connues et les niveaux de la production sont faibles.

### ***1.5.3. Champignons microscopiques***

Ce sont des organismes uni ou pluri cellulaires eucaryotes. Ils se trouvent partout où il existe une source alimentaire. Il y a deux types de champignons: Levures (organismes unicellulaires) et les moisissures (organismes pluricellulaires)

*Saccharomyces cerevisiae* a été la première levure utilisée dans la production de protéines, protéines recombinantes et plusieurs produits biopharmaceutiques. Il existe plusieurs caractéristiques intrinsèques, comme la stabilité du système d'expression et la facilité de la culture. Les protéines à *Saccharomyces cerevisiae* représente déjà un processus industriel bien établi, assurant des titres de production allant jusqu'à centaines de mg / l. En alternative à *S. cerevisiae*, les levures *Pichia pastoris* et *Kluyveromyces lactis* peuvent être utilisées pour la production des protéines.

Parmi les moisissures utilisés dans la production des protéines, il y a *Rhizopus oligosporus*, *Zygorrhynchus moelleri*, *Oospora lactis*, *Penicillium roqueforti*...etc. Ils caractérisent par:

- La production de protéines ont une valeur nutritive pour l'animal et même l'humain.
- Protéines servant de complémentation des produits céréaliers.

#### **1.6.4. Micro-algues**

Les micro-algues sont des espèces microscopiques unicellulaires ou pluricellulaires. Ce sont des micro-organismes eucaryotes ou procaryotes.

Une micro-algue spirulina est connue pour élaborer toute une gamme de produits intéressants (via la photosynthèse) à intérêt pharmaceutique, cosmétique et plus particulièrement alimentaire. Sur le plan de la composition chimique, les spirulines contiennent environ 70 % de protéines. La teneur en acides aminés essentiels est mieux équilibré que celles issues de plantes (déficience en lysine).

### **I. 7. Milieux de culture**

Ce sont des préparations qui vont permettre le développement de la bactérie. Le milieu doit apporter :

- Tous les éléments dont la bactérie a besoin
- Une source d'énergie et des facteurs de croissance
- Un pH correct
- Une force ionique optimale.

#### **1.7.1. Composition d'un milieu de culture**

Plusieurs types de résidus organiques peuvent être utilisés lors de la production des protéines; notamment, les résidus agricoles, de l'industrie forestière et des usines de transformation d'aliments. Les trois critères principaux qui servent au choix d'un substrat sont, par ordre d'importance :

- a)- le prix (normalement nul ou négatif),
- b)- les frais de transport
- c)- la qualité du substrat.

##### **1.7.1.1. Besoins élémentaires ( Ou conditions de croissance)**

Les micro-organismes se multiplient à partir des aliments ou nutriment présents dans les milieux de culture. Ils ont tous un certain nombre de besoins communs:

- nécessité de source d'énergie,
- de source de carbone,
- de source d'azote

- éléments minéraux.

Ces besoins de base sont appelés besoins élémentaires.

### **A)- Source d'énergie**

Selon le type d'énergie utilisée, on peut reconnaître deux catégories des micro-organismes:

- Les phototrophes, ou photosynthétiques, qui tirent leur énergie de la lumière.
- Les chimiotrophes, ou chimiosynthétiques, qui utilisent l'énergie de l'oxydation de produits chimiques organiques ou minéraux.

Dans les deux cas, l'énergie est stockée sous forme d'énergie de liaison chimique biologiquement utilisable (il s'agit de la liaison anhydride phosphorique de l'ATP).

### **B)- Source d'électrons**

: utilisent des substances minérales comme source d'électrons.

**Organotrophe** : extraient les électrons de composants organiques!

### **C. Source de carbone**

Le carbone est le constituant de base de la cellule et doit être fourni en quantité suffisante. Les Trois (03) exigences nutritionnelles en carbone conduisent à envisager deux catégories de microorganismes :

- **Les autotrophes** sont capables de synthétiser les métabolites à partir d'éléments minéraux. Ils n'ont pas besoin de substances organiques. La source de carbone sera le dioxyde de carbone( $\text{CO}_2$ )
- **Les Hétérotrophes** exigent une source de carbone plus complexe des composés organiques afin de synthétiser tous ses métabolites. Ils sont incapables de synthétiser tous ses métabolites à partir d'éléments minéraux.

### **D)- Source de soufre et de phosphore**

Parmi les constituants minéraux des microorganismes, le soufre et le phosphore tiennent une place de choix. Le premier est présent dans certains acides aminés(Cystéine ) et donc dans les protéines sous forme de groupements thiols (-SH). Il est principalement incorporé sous forme de sulfate ou de composés soufrés organiques, rarement sous forme de soufre réduit. Le second fait partie des acides nucléiques et phospholipides , de nombreuses coenzymes et de l'ATP. Il est incorporé dans la cellule sous forme de phosphate inorganique.

### **E)- Source d'azote**

Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. La provenance de cet azote peut se faire par fixation directe de l'azote atmosphérique ou par incorporation de composés azotés (réactions de désamination, de transamination). Les besoins en azote des bactéries sont généralement assurés par les produits de dégradation des substrats organiques sous forme ammoniacale. Quelques espèces sont capables de fixer directement l'azote de l'air ou d'assimiler les nitrates et les nitrites ; elles jouent un rôle très important en

agronomie et sont étudiées d'une façon intensive, en vue d'améliorer, grâce à leur utilisation éventuelle, le rendement de croissance des végétaux. D'autres espèces bactériennes, au contraire, sont totalement incapables de synthétiser les substances azotées indispensables à leur structure, et leur croissance exige l'apport, dans les milieux de culture, de substrats préformés tels que des acides aminés (**bactéries auxotrophes**).

#### **F)- Les oligoéléments**

Les oligo-éléments sont de molécules indispensables en très faibles quantités. On peut citer le cobalt, le sodium, le potassium, le zinc, le cuivre, le manganèse, le sélénium... etc. Ils sont très importants pour le fonctionnement des enzymes. Ils ne sont pas tous requis par une même espèce.

##### **1.7.2. Besoins spécifiques**

Les microorganismes exigent des substances organiques qu'elles ne peuvent pas synthétiser. Ces substances sont nommées **facteurs de croissance**. Beaucoup de ces substances sont des vitamines, des acides aminés essentiels et des bases azotées. Les micro-organismes qui doivent trouver ces facteurs de croissance dans leur alimentation sont appelés **auxotrophes**, mais qui n'ont pas besoin de tels facteurs sont dites **prototrophes** qui sont capables de synthétiser tous ces constituants cellulaires sur un milieu minimum.

### **1.8. Types et formes des milieux des cultures**

Les milieux de culture sont des préparations qui vont permettre le développement des microorganismes. Le milieu doit apporter tous les besoins élémentaires cités ci-dessus en outre un pH correct et une force ionique optimale.

Les milieux de culture doivent permettre d'isoler les bactéries, les identifier, les compter et les conserver. Un milieu qui ne contient que ce qui est absolument nécessaire au développement de la bactérie se nomme un **milieu minimum**.

Les milieux de culture peuvent être classés par différentes manières :

#### **1.8.1. Selon la composition**

##### **1.8.1.1. Milieux complexes**

Ce sont des milieux très riches en substances organiques permettant une croissance aisée de nombreux micro-organismes. Ces différents composants mal définis vont couvrir les besoins en macroéléments (« CHOZPS ») en micro-éléments et en oligoéléments ainsi que les besoins en énergie. Il est spécifique pour les micro-organismes chimio-organotrophes, hétérotrophes et auxotrophes.

Exemples

- Extrait de protéines de soja
- Extrait de viande
- Produits sanguin (élément nutritif + observation des propriétés hémolytiques de certaines bactéries)
- Jus de tomate

##### **1.8.1.2. Milieux synthétiques**

---

Milieux constitués de substances chimiques pures, leur composition qualitative et quantitative est connue.

### **1.8.1.3. Les milieux semi-synthétiques**

Comme leur nom l'indique c'est un mélange de composés chimiques purs et de substances naturelles empiriques.

## **1.8.2. Selon leur utilisation**

### **1.8.2.1. Les milieux d'isolement**

Ils sont utilisés pour la séparation des microorganismes à partir de leur environnement.

#### **• Milieux de base**

Ce milieu cultive un maximum de micro-organismes hétérotrophes ne présentant pas de besoins nutritifs particuliers. Un micro-organisme cultivant sur ce type de milieu est dit de culture facile ou non exigeant.

#### **• Milieux sélectifs**

Ces milieux inhibent la croissance de la majorité des micro-organismes et stimulent celles des bactéries qu'on cherche à isoler. On fait intervenir un pH acide, une concentration de sel élevée.

#### **• Milieux différentiels**

Contiennent un indicateur (colorant) qui permet de différencier deux types bactériens qui poussent sur le même milieu, mais ne dégradent pas tous les deux un substrat particulier.

### **1.8.2.2. Milieux d'identification**

Ces milieux permettent la connaissance de caractères biochimiques.

### **1.8.2.3. Milieux de conservation**

Ces milieux permettent la survie des micro-organismes. Il s'agit en général de milieux très pauvres.

### **1.8.2.4. Les milieux de culture utilisés dans une unité biotechnologique (fermenteur).**

## **1.9. Conditions environnementaux des milieux de culture**

Les nutriments constitutifs ou énergétiques nécessaires à un micro-organisme pour son développement doivent lui être apportés dans certaines conditions d'environnement. Un certain nombre de facteurs physiques interviennent au cours de la nutrition. Ils peuvent l'empêcher, l'inhiber ou la favoriser.

Certaines conditions environnementales (paramètres physico-chimiques) influencent la croissance des micro-organismes. Parmi celles-ci figurent **le pH (acidité et alcalinité), la température, la présence d'O<sub>2</sub>, de CO<sub>2</sub>, la disponibilité de l'eau (Aw Activity of Water)**. La plupart des micro-organismes tolèrent une gamme de pH permettant la croissance.

### **1.9.1. Effet de l'oxygène**

Selon l'exigence des microorganismes à l'oxygène, on distingue les catégories suivantes :

**1 - Les bactéries aérobies strictes** ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. L'oxygène moléculaire, ultime accepteur d'électron, est réduit en eau (Pseudomonas, Acinetobacter, Neisseria).

**2 - Les bactéries anaérobies strictes** ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique. Ces bactéries doivent se cultiver sous atmosphère réductrice. La totalité de l'énergie est produite par fermentation.

**3 - Les bactéries aéro-anaérobies facultatives** se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale : les entérobactéries (Escherichia, Salmonella), les streptocoques, les staphylocoques. L'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire.

**4- Les bactéries microaérophiles** se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air (une faible concentration d'oxygène) (Campylobacter, Mycobacteriaceae) (Fig.5).

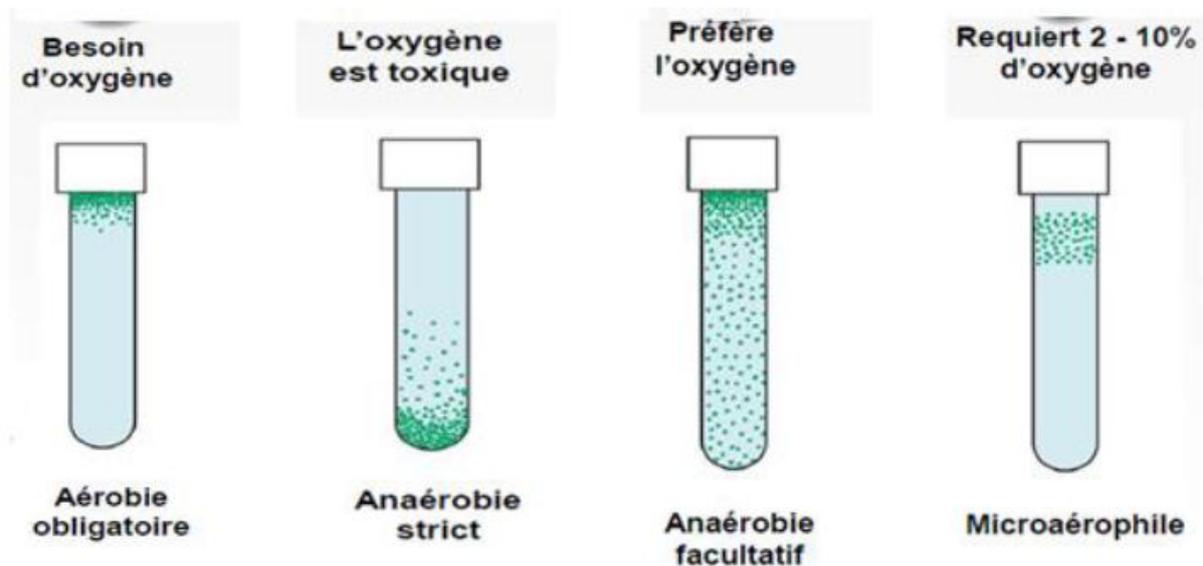


Figure 5. Effet d'oxygène sur la croissance bactérienne.

### Remarque

Toutes les levures peuvent se développer en présence d'oxygène: il n'existe pas de levures anaérobies strictes.

La croissance des levures en anaérobiose n'a lieu que si les vitamines sont en quantité suffisantes car ils ne peuvent être synthétisés en l'absence d'oxygène.

### 1.9.2. Effet de la température

La température influence profondément la croissance, aussi bien a un effet direct sur la vitesse des réactions métaboliques. Chaque augmentation de 10°C augmente par 2 la vitesse de réaction enzymatique. Au-delà d'une certaine température, il y a dénaturation des protéines, destruction des membranes cellulaires et mort de la bactérie.

#### • Mécanismes moléculaires de l'adaptation des bactéries à la température

-S'il y a baisse importante de température il y a risque de gélification de membrane. Les bactéries vont synthétiser de nouveaux acides gras au niveau des phospholipides, ces acides gras sont insaturés et vont permettre de maintenir la fluidité.

-Si la température augmente, il y a risque de dénaturation des enzymes. Les bactéries vont synthétiser de nouvelles protéines qui vont résister à la chaleur.

Les techniques de laboratoire Pour cultiver une bactérie, on va se placer à température optimale et constante. On peut utiliser le bain marie et des étuves, des frigos, boucles de régulation (fermenteur).

Selon la température optimale de développement, on distingue généralement 06 classes des micro-organismes

**1• Les psychrotrophes:** Peuvent se cultiver à 0°C. La température optimale de multiplication entre 20 à 25 °C.

**2• Les psychrophiles:** Température maximale 20°C et température optimale de croissance inférieure à 15 °C.

**3• Les cryophiles:** peuvent se développer à des températures négatives. Température optimale de croissance (- 5 °C).

**4• Les mésophiles:** croissance entre 25 et 40 °C. Optimum à 37°C.

**5• Les thermophiles:** température optimale entre 50 et 60 °C.

**6• Les hyperthermophiles:** Température optimale de croissance entre 70 °C et 110°C.

Cette classification n'a pas de limites strictes. Il peut exister des chevauchements d'un groupe à l'autre.

**Remarque** : Les champignons et les levures sont des mésophiles mais certaines levures se développent à 45 °C et d'autres à 1 °C.

### ***1.9.3. L'effet de pH***

Le pH optimal de croissance de beaucoup de bactéries est proche de la neutralité (pH 7).

Les bactéries pathogènes ou liées à l'écosystème humain se développent le plus souvent dans des milieux neutres ou légèrement alcalins

Il joue un rôle important au niveau :

- de la production d'énergie par la chaîne respiratoire : gradient de pH

- de la perméabilité membranaire et des échanges

- activité métabolique : activité des enzymes est sensible aux variations de pH

On distingue 3 catégories de micro-organismes déterminées en fonction de leur pH optimum:

Les micro-organismes se développent dans une gamme de pH de 1 à 11. Il en existe trois classes, déterminées en fonction de leur pH optimum:

- **Acidophiles** qui se multiplient mieux dans des milieux acides ( $1 < \text{pH optimum} < 5.5$ ) : cas des Lactobacillus.

- **Neutrophiles** qui se développent pour des pH sont compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7. La plupart des bactéries médicalement importantes sont ainsi.

Exemple : isolement d'une souche d'Escherichia coli sur un milieu usuel

- **Alcalinophiles** qui préfèrent les pH alcalins ( $8 < \text{pH optimum} < 11$ ): cas de Pseudomonas et Vibriion, donc milieux de culture particuliers

### ***1.9.4. L'effet de l'eau***

La quantité de l'eau présente dans une substance intervient dans la croissance microbienne.

L'activité de l'eau (activity of water; Aw) est inversement proportionnelle à la pression

osmotique d'un composé. Elle est affectée par la présence de sels ou sucres dissous dans l'eau.

➤ **Présence de sels:** Les microbes **halophiles** nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance.

1-6% pour les **faiblement halophiles**.

De 15-30% pour les bactéries **halophiles extrêmes**.

Les microbes **halotolérants** acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance.

➤ **Présence de sucres:** Les microbes **osmophiles** nécessitent des sucres pour leur croissance.

Les **osmotolérants** acceptent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance. Enfin les microbes **xérophiles** peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

### 1.9 5. la pression osmotique

Les bactéries sont très résistantes aux variations de pression osmotique. Si on met la bactérie dans un milieu hypotonique, l'eau va rentrer mais la bactérie va être protégée grâce à sa paroi. Si on met la bactérie dans un milieu hypertonique, la bactérie va synthétiser des solutés à très forte concentration et donc l'eau arrête de sortir

## 1.10. Paramètres de la croissance (constantes de la croissance)

### 1.10.1. Définition

La croissance est définie comme une augmentation des constituants cellulaires et peut se traduire par une augmentation **de la taille** des micro-organismes, du **nombre** d'organismes ou des **deux**. On a trois paramètres suffisants pour la détermination de la croissance microbienne:

- Le nombre de divisions ou générations: **n**
- La population microbienne (nombre des cellules): **N** ; on note **N<sub>0</sub>** la population initiale, et **N<sub>n</sub>** la population après **n** divisions.
- Le temps de génération: **G**; c'est le temps nécessaire pour que la population double ou le temps qui sépare deux divisions successives.

### 1.10.2. Expression mathématique de la croissance

Considérons **N<sub>0</sub>**= nombre initiale de cellules

**N<sub>t</sub>**= nombre de cellule en division au temps (**t**)

**n**= le nombre de génération dans le temps **t**.

Après 1 division:  $N_1 = 2^1 \cdot N_0$

Après 2 divisions:  $N_2 = 2^2 \cdot N_0$

Après **n** division:  $N_n = 2^n \cdot N_0$

La valeur de **n**, le nombre de génération, peut être obtenue en prenant les logarithmes en base 10 des deux membres de l'équation.

$\text{Log } N_n = \text{Log } 2^n \cdot N_0$

$\text{Log } N_n = n \cdot \text{log} 2 + \text{log } N_0$

$n = (\text{log } N_n - \text{log } N_0) / \text{log } 2$

$n = (\text{log } N_n - \text{log } N_0) / 0.301$

Le temps de génération  $G = (t_n - t_0) / n$

Le temps de génération peut être compté à partir de la représentation semi-logarithmique.

On définit le taux de croissance horaire grâce à la formule:  $\mu = n/t = 1/G$ . ( $G = t/n \rightarrow n = t/G$ )

**donc**  $\mu = \frac{t}{G} = \frac{1}{G}$ .

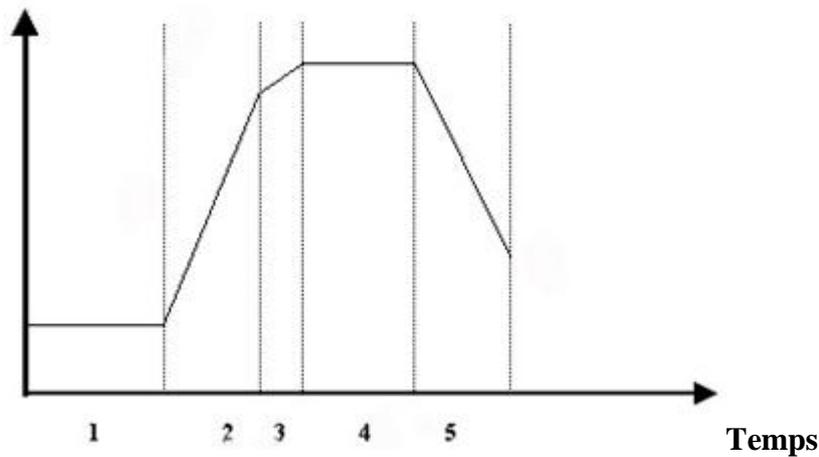
### 1.10.3. Expression graphique de la croissance

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries.

Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide.

La croissance des micro-organismes est représentée graphiquement comme le logarithme du nombre de cellules viables en fonction du temps d'incubation, Il existe 5 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance (**Fig. 6**).

#### Logarithme de cellules viables



**Figure 6. Courbe de croissance microbienne dans un système fermé.**

1 : phase de latence ; 2 : phase de croissance exponentielle ; 3 : phase de ralentissement ; 4 : phase stationnaire ; 5 : phase de déclin.

#### 1. Phase de latence

Dans cette période, les cellules synthétisent les enzymes qui vont leur être nécessaires pour utiliser les substrats (éléments nutritifs) du milieu. Il n'y a pas de division cellulaire:

$N=N_0$  et  $\mu=0$ . La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu.

#### 2. Phase exponentielle

La vitesse de reproduction cellulaire est maximum ( $\mu = \mu_{max}$ ) et reste constante en présence des nutriments et en absence des toxines.  $N$  augmente dans les conditions opératoires et  $G$  est aussi constant. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

#### 3. Phase de ralentissement :

La vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

#### 4. Phase stationnaire

Il y a une égalité entre les bactéries qui meurent, par autolyse, et celles qui continuent à se multiplier, (c'est-à-dire le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ ) ; les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent) . Cette phase est déclenchée par l'épuisement du milieu et l'accumulation de déchets toxiques.

### **5. Phase de déclin**

le taux de croissance est négatif ( $\mu < 0$ ). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique).

## **1.11. Croissance industrielle du microorganisme (fermentation industrielle).**

### ***1.11.1. Définition de la Fermentation***

En biochimie, les fermentations sont des voies cataboliques anaérobies.

En microbiologie industrielle, le terme de fermentation désigne l'opération simple qui permet de produire de la biomasse ou des différents produits par la culture de micro-organismes. Ce terme s'applique en industrie pour des métabolismes aérobies et anaérobies.

### ***1.11.2. Fermenteur***

Le bioréacteur (ou fermenteur) est un appareil permettant d'assurer une croissance des micro-organismes et une production optimale des différentes molécules.

### ***1.11.3. Types des fermenteurs***

Les modèles de laboratoire vont de 0,1 à 15 litres. Les modèles employés pour les tests en vue de l'industrialisation (appelés "pilotes") vont de 20 à 1 000 litres, alors que ceux destinés à la production industrielle peuvent dépasser les 1 000 m<sup>3</sup>. Des modèles de bioréacteurs jetables utilisés principalement pour des volumes allant du millilitre à quelques centaines de litres.

### ***1.11.4. Description du fermenteur***

Un bioréacteur comporte

- Une cuve ou enceinte en verre (pour les modèles de laboratoire) ou en acier inoxydable.
- Un bouchon si nécessaire pour ne pas laisser passer l'air du milieu intérieur et celui du milieu extérieur.
- Une seringue avec cathéter pour injecter une solution.
- Un système d'agitation comportant une ou plusieurs turbines selon leur taille.
- Des capteurs pour la mesure de la température (thermomètre), du pH (pH-mètre), de la concentration en oxygène dissous (sonde oxymétrie) ...
- Un système de contrôle-commande géré par ordinateur permettant d'enregistrer et piloter tous les paramètres de fonctionnement.

### ***1.11.5. Les diverses techniques de culture***

Deux grandes techniques de culture utilisées dans le fermenteur pour la production des différents produits microbiens; culture discontinue (en batch) et culture continue (renouvelée).

#### **1.11.5.1. Culture discontinue**

Le procédé est réalisé dans un système fermé dans lequel un même volume de milieu non renouvelé est utilisé pour la croissance des micro-organismes; la quantité de nutriments est donc limitée.

#### **1.11.5.2. Culture continue**

La culture du microorganisme se fait en vase non clos de façon à maintenir en permanence en phase exponentielle grâce à:

- Renouveler constamment le milieu de culture.
- Récupérer les produits du métabolisme et les déchets.

### **1.12. Biomasse**

#### ***1.12.1. Définition***

Le terme de biomasse désigne le matériel organique cellulaire des organismes mis en culture (animaux, végétaux ou microbiens). La biomasse microbienne est aussi appelée "Single Cell Protein" (SCP) ou protéines d'organismes unicellulaire (POU). Cette biomasse microbienne peut être une source de protéines, des vitamines, des antibiotiques, des vaccins, additifs – alimentaires, des aliments et le bioéthanol. Une technique est utilisée dans la production de ces produits, il s'agit de la fermentation.

#### ***1.12.2. Détermination de la biomasse microbienne***

Dans une population bactérienne en croissance, la biomasse (ou quantité de matière vivante) augmente régulièrement. On peut l'évaluer de différentes façons (méthodes directe ou indirectes).

##### **1.12.2.1 Méthodes de dosage direct**

###### **A)- Détermination du poids sec**

Il s'exprime en g/L de culture. C'est la méthode de référence, car la plus précise quand elle est bien maîtrisée, mais elle est délicate à mettre en œuvre. (Masse de microorganismes complètement déshydratés dans une culture).

Détermination de la masse sèche: on récupère la biomasse par centrifugation puis séchée dans un dessiccateur. On procède ensuite au pesage. Plus la biomasse est élevée plus le nombre de bactérie est grand. Cette technique ne différencie pas les bactéries vivantes des mortes.

###### **B)- Enumération microbienne**

Le nombre de cellules d'un milieu peut-être évalué par des méthodes directes c'est à dire compter directement le nombre de cellules en appliquant différentes techniques :

###### **a)- Compteur de particules**

C'est un système automatique qui dénombre les bactéries qui passent entre 2 électrodes au niveau d'une micropipette.

Mais, ce système est peu adapté à la taille des bactéries. De plus il dénombre les cellules vivantes et mortes. Donc par excès

**b)- on utilise les cellules de Malassez ou de Thomas**

### **1.12.2 Méthodes de dosage indirect**

**a)- Mesure d'une absorbance**

#### **Opacimétrie**

Le trouble d'un milieu où sa densité optique est directement proportionnel à la concentration cellulaire dans le milieu, selon la loi de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times c \times l$$

Les mesures d'opacimétrie se font entre 550 et 650 nm.

Avantages: Simples à mettre en œuvre; Peu coûteux.

Inconvénients: Domaine de linéarité :  $\lambda = 650\text{nm}$ ; A linéaire jusqu'à  $A = 0,5$  --> A réelle du milieu. Inapplicable lorsque le milieu est trouble.

Valeur estimée par excès: on compte ici les cellules vivantes et les cellules mortes donc on surestime la quantité de biomasse.

#### **Turbidimétrie:**

La turbidité d'un milieu contenant des particules provoque des altérations du trajet optique dues aux phénomènes de diffusion / réfraction.

La turbidité se mesure par détermination de l'épaisseur minimale de suspension empêchant la vision nette d'une mire, ou par comparaison avec un étalon.

#### **Néphélométrie:**

Mesure de la diffusion de la lumière par les particules.

Mesure du nombre de cellules

**b)- Détermination de l'activité**

Il est possible de suivre par des techniques biochimiques la consommation d'un substrat (ex : suivi de la consommation de glucose par dosage enzymatique) ou l'apparition d'un produit (ex: dosage de l'éthanol).

**c)- Dosage d'un constituant spécifique**

Il consiste à doser par exemple un polysaccharide caractéristique de la paroi de certaines bactéries.

**d)- Mesure de quelques constituants cellulaires**, tels que l'azote total, les protéines totales ou encore l'ADN total.

**e)- Mesure indirecte de l'activité métabolique**, en appréciant, par exemple la production ou la consommation d'oxygène ou de CO<sub>2</sub>.

### **1.12.3. Applications de la biomasse**

La production de biomasse constitue souvent le but de nombreuses fermentations industrielles:

➤ Production de biomasse-aliment et plus particulièrement production de protéines d'organismes unicellulaires (Single Cell Protéins) essentiellement de levures, plus rarement de bactéries, moisissures ou algues. Lorsque la biomasse est produite dans ce but, les protéines ne sont que rarement extraites et purifiées et le produit, en contenant environ 50%.

➤ Production de levure diététique

- Production de levains pour les industries de fermentations.
- Production d'agents biologiques pour bioconversions (cellules utilisées libres ou immobilisées, comme catalyseur).
- Production pour des applications particulières comme la lutte biologique (action insecticide).

#### ***1.12.4. Milieu de culture pour la production de la biomasse***

Pour obtenir de bonnes productions de biomasse, il est nécessaire de se placer dans des conditions où le rendement énergétique est le meilleur, c'est-à-dire lorsqu'il y a oxydation complète du substrat par l'oxygène de l'air et que toute l'énergie potentielle est libérée et utilisée pour les synthèses. Il est donc préférable, lorsqu'il est possible, d'utiliser des germes aérobies ne possédant pas de métabolisme fermentaire ou d'orienter le métabolisme d'un germe ayant plusieurs voies énergétiques vers la voie oxydative. Pour obtenir les meilleurs résultats, il faut fournir une quantité d'oxygène pour permettre l'oxydation complète et tenir compte des mécanismes de régulation.