

Les polysaccharides exocellulaires microbiens d'intérêt industriel

Introduction

Les polysaccharides produits par les micro-organismes sont des gommes solubles dans l'eau qui modifient les propriétés de leur environnement de deux façons possibles : soit en formant des gels, soit en conférant au milieu aqueux dans lequel ils sont solubilisés un caractère non newtonien, en général de type pseudo-plastique ou thixotrope.

L'utilisation des polysaccharides microbiens reste faible en regard de celle de polysaccharides végétaux comme l'amidon ou les dérivés cellulosiques (tableau I). Cependant, si l'on compare la production industrielle de xanthane, qui est le polysaccharide microbien majeur, à la production des autres gommes, on constate qu'elles sont du même ordre de grandeur. D'autre part, ces polysaccharides microbiens connaissent un réel développement et ils émergent rapidement d'autant plus que l'on peut s'attendre à obtenir de nouveaux polymères présentant une grande diversité de structure et des propriétés nouvelles. Ces polysaccharides ont un large spectre d'applications comme agents émulsifiant, gélifiant, stabilisant, etc. Ils sont utilisés aussi bien par l'industrie alimentaire, qui constitue leur principal débouché, que par les industries chimique, pharmaceutique ou même pétrolière.

TABLEAU I. - Consommation et prix de polysaccharides industriels aux États-Unis ¹.

Polysaccharide	Consommation (tonnes/an)	Prix (\$/kg)	Valeur totale (million \$)
Amidon	1 800 000		4 400
Carboxyméthylcellulose	38 000	1,8-4,9	
Hydroxyéthylcellulose	31 000	5,3	164
Alginate	8 800		44
Pectine	6 000- 8 000		
Xanthane	3 600- 6 800	10-14	50-80
Gomme arabique	9 000-11 000	1,6-3,0	20
Gomme guar	45 000	1,1-1,8	
Carraghénane	6 000	6,4	38,4

¹ D'après Yalpani et Sandford [1].

La fonction naturelle des principaux polysaccharides végétaux est bien connue, puisqu'ils ont un rôle de réserve intracellulaire de glucides comme l'amidon ou un rôle structural comme la cellulose qui est localisée au niveau de la paroi cellulaire. Dans le cas des micro-organismes, les polysaccharides sont souvent localisés à l'extérieur de la cellule, soit sous forme d'une capsule

entourant celle-ci, soit sous forme d'une gangue muqueuse ("slime") qui diffuse dans le milieu environnant. Ce dernier point est intéressant à double titre puisque cette sécrétion externe va, d'une part, simplifier la récupération du produit et, d'autre part, faciliter la sélection de souches productrices de tels polymères en les repérant au sein d'une population (les colonies issues d'une culture en milieu gélosé présenteront un aspect visqueux). La fonction de ces polymères est souvent mal élucidée dans le cas des polysaccharides excrétés dans le milieu. Dans le cas du xanthane, qui est synthétisé par une bactérie pathogène de végétaux, la sécrétion du polymère serait en relation avec la virulence du micro-organisme (reconnaissance des cellules hôtes, lutte contre la dessiccation, contre les phages, ...) comme pour les bactéries encapsulées généralement pathogènes.

Nous nous sommes ici intéressés uniquement aux polysaccharides microbiens industriels définis comme étant effectivement produits industriellement ou connaissant un réel développement.

A travers l'exemple du xanthane, qui est le polysaccharide microbien le plus utilisé et le mieux connu, sont abordés différents aspects liés à la production et à l'utilisation de ces polysaccharides, utilisation dépendante des propriétés et donc de la structure de ces polymères.

Le xanthane

Structure

Le xanthane est constitué d'une chaîne principale cellulosique portant tous les deux résidus glucose un chaînon latéral trisaccharidique comprenant un acide glucuronique entouré de deux mannoses (figure 1). Le mannose situé à proximité de la chaîne principale peut être acétylé alors que le mannose situé à l'extrémité des chaînons latéraux peut être pyruvaté. Les taux d'acétate et de pyruvate sont variables en fonction de la souche utilisée pour produire le biopolymère et des conditions de culture du micro-organisme. La masse moléculaire du xanthane est généralement de l'ordre de 5.10⁶.

Si la nature hélicoïdale du xanthane, quand il est en conformation ordonnée, ne fait pas de doute (figure 2), son existence à l'état de simple ou de double hélice a été sujette à controverse. Il semble que, à l'état natif, le xanthane existe sous forme de double hélice, mais qu'il subisse un changement de conformation en simple hélice par diminution de la salinité ou augmentation de la température [4]. Le xanthane en double hélice peut également subir des transitions d'un état désordonné à un état ordonné où les chaînons latéraux se disposent le long de la chaîne principale

(figure 3). Ainsi, en solution aqueuse peu salée, la chaîne est désordonnée et fortement étendue à cause des répulsions électrostatiques entre les groupements des chaînes latérales. Lors de l'ajout de sel, il y a écrantage de ces répulsions électrostatiques et fixation des chaînons latéraux par liaisons hydrogène le long de la chaîne principale et passage à un état ordonné. La transition ordre-désordre peut également être provoquée par chauffage [5]. La température de transition est dépendante de la salinité (figure 4).

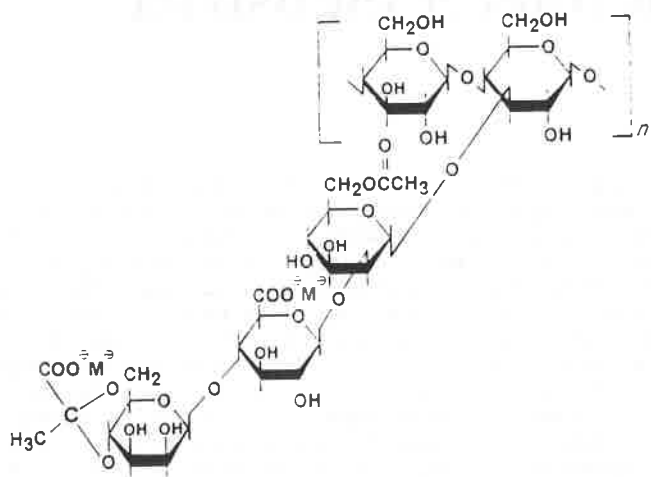


FIGURE 1. - Structure primaire du xanthane (d'après Janson et al. [2]).

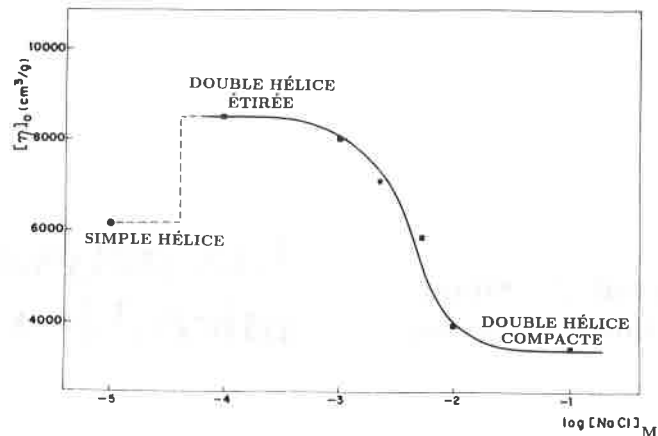


FIGURE 3. - Viscosité intrinsèque ($[\eta]$) du xanthane en fonction de la salinité (d'après Lecourtier et al. [4]).

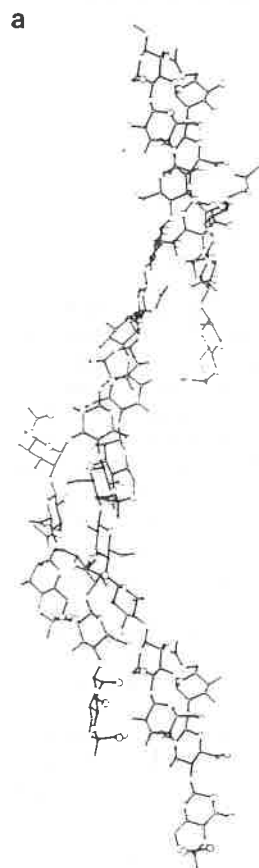


FIGURE 2. - Structure secondaire du xanthane (d'après Moorhouse et al. [3]). Représentation a : perpendiculaire à l'axe, b : selon l'axe de l'hélice.

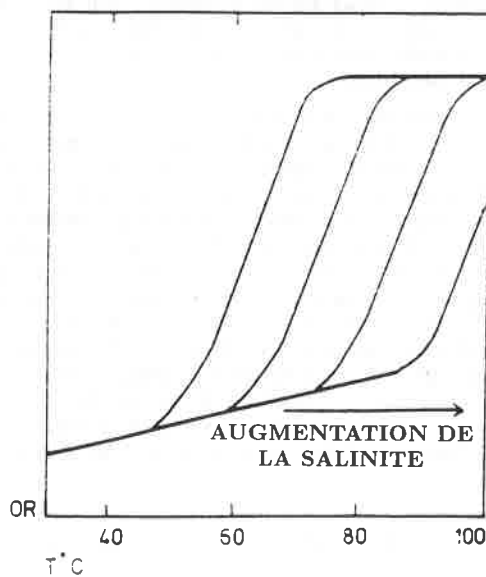


FIGURE 4. - Variation de la température de transition du xanthane (d'après Morris [6]).

Influence de la souche productrice

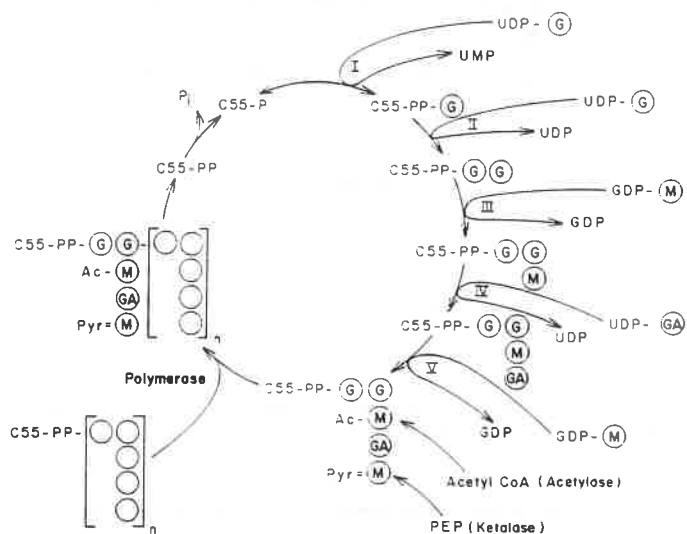
Le xanthane est le polysaccharide produit par des souches de bactéries appartenant au genre *Xanthomonas*. L'espèce retenue comme référence est aussi celle utilisée par les industriels : *Xanthomonas campestris*. Cependant, si l'on considère la composition de différents xanthanes commerciaux, on observe une relative constance dans la composition en sucres et des variations très sensibles des teneurs en pyruvate et acétate (tableau II). Ces variations peuvent être imputables à l'utilisation de souches différentes, bien qu'appartenant à la même espèce. De telles différences s'expliquent par la complexité de la synthèse du xanthane. En effet, les sucres constitutifs de ce polysaccharide sont d'abord phosphorylés, puis greffés sur des nucléosides phosphates. L'assemblage de l'unité pentasaccharidique se fait sur un transporteur lipidique par l'intermédiaire de glycosyl-transférases spécifiques (figure 5). Acétylation et pyruvylation interviennent à ce stade par le biais d'une acétylase et d'une kétalase. Il y a ensuite polymérisation, extrusion du polymère et recyclage du transporteur lipidique par des processus encore inconnus. Toutes les enzymes impliquées dans ces réactions sont soumises à des régulations aux niveaux de leur activité et de leur synthèse. Concer-

nant ce dernier point, de récents travaux de génie génétique font état de l'obtention de souches mutées au niveau des différents gènes codant pour la synthèse des glycosyl-transférases, de l'acétylase et de la kétalase évoquées ci-dessus. Il a ainsi été possible de produire des xanthes ayant toutes les compositions possibles (figure 6). Ces travaux présentent un double intérêt, fondamental pour la mise en évidence de relations structure-propriété, appliqué pour l'obtention de polysaccharides nouveaux.

TABLEAU II. - Composition de différents xanthes commerciaux ¹.

Échantillon	Fournisseur	Degré d'acétylation	Degré de pyruvylation
Keltrol 1	Kelco Co.	0,39	0,90
Keltrol 2	Kelco Co.	0,32	0,35
Kelzan	Kelco Co.	0,40	0,34
Rhodopol	Rhône-Poulenc	0,44	0,67
Rhodigel	Rhône-Poulenc	0,39	0,53

¹ D'après Smith et al. [7].



UDPG = uridine-5'-diphosphoglucose
 GDPM = guanidine-5'-diphosphomannose
 UDP-GA = uridine-5'-diphosphoglucuronate
 GG = cellobiose
 C55 = isoprenoid-lipid carrier

FIGURE 5. - Voie de synthèse du xanthane (d'après Belach et al. [8]).

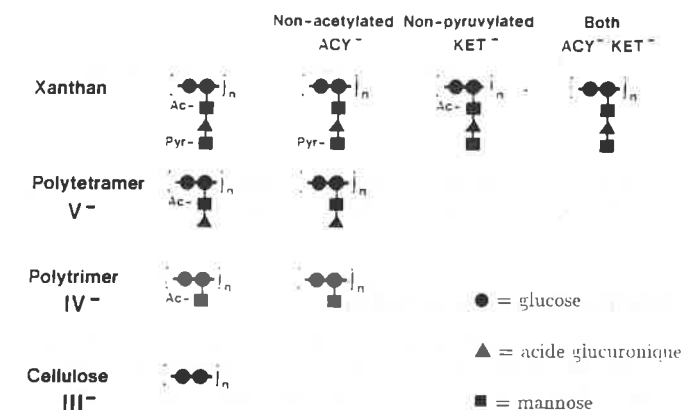


FIGURE 6. - Contrôle de la composition du xanthane par modification de la souche (d'après Hassler et Doherty [9]).

Influence des conditions de fermentation

Nous avons représenté sur la figure 7 des cinétiques de fermentation productrice de xanthane dans des conditions standard. On constate que les productions de cellules et de xanthane sont concomitantes dans un premier temps, puis que la synthèse de xanthane à partir du glucose (substrat de fermentation) se poursuit une fois la croissance bactérienne arrêtée. On peut noter que la production de xanthane est d'environ 20 g.L⁻¹ en une cinquantaine d'heures.

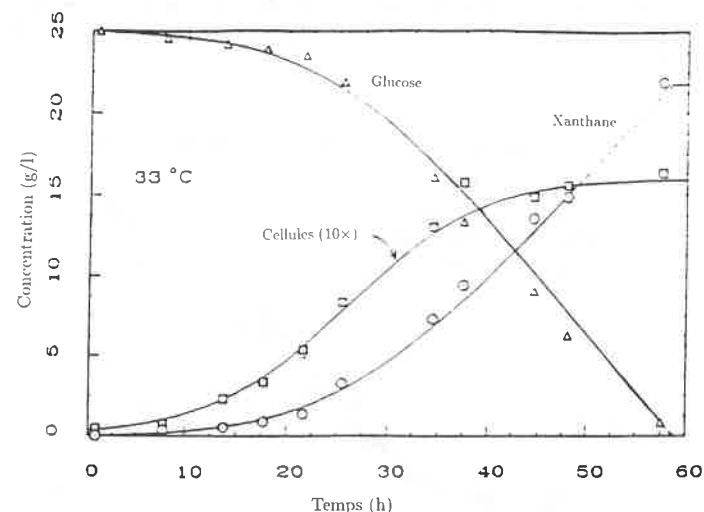


FIGURE 7. - Cinétiques de production du xanthane (d'après Shu et Yang [10]).

Une fois la souche de *Xanthomonas* choisie et éventuellement améliorée, il est nécessaire d'optimiser les conditions de fermentation afin d'améliorer les performances, sachant qu'un effet simultané sur la qualité du polymère obtenu est fréquent. Les paramètres sur lesquels il est possible d'agir sont la composition du milieu de culture, la température, le pH, l'aération (la fermentation est aérobie et exige un apport d'oxygène), l'agitation, la géométrie du réacteur, le cisaillement. A titre d'illustration, nous allons montrer quelques résultats concernant l'influence de deux de ces paramètres.

La composition du milieu de fermentation est un paramètre important influant tant sur les performances de production que sur la qualité du xanthane produit. Ainsi, en culture continue, en fonction de l'élément limitant retenu (en fermentation continue, la population bactérienne atteint un état d'équilibre dépendant de la teneur en un constituant du milieu qui est alors dit limitant), on note des productions de xanthane, des rendements en polymère, des productivités et des taux de pyruvate du polysaccharide formé très variables (tableau III).

TABLEAU III. - Influence du milieu de fermentation lors de la production de xanthane ¹.

Agent limitant	Concentration en xanthane (g.L ⁻¹)	Rendement de conversion (g.g ⁻¹)	Productivité volumique (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Taux de pyruvate (%)
C	2,7	0,54	0,13	5,8
N	7,0	0,60	0,35	6,6
S	6,4	0,53	0,32	8,5
Mg	5,7	0,55	0,28	1,1
K	5,3	0,43	0,26	5,5
P	5,0	0,31	0,25	0,9

¹ D'après Davidson [11].

Parmi les autres paramètres importants de la fermentation figure le transfert d'oxygène. La figure 8 illustre l'influence de la vitesse d'agitation sur la cinétique de production de xanthane. On remarque que celle-ci est d'autant plus importante que l'agitation est forte. Les traits pointillés indiquent que le taux d'oxygène dissous est devenu nul et donc que l'aération du milieu, devenue trop faible, limite la production de polymère. L'aération peut également influencer sur la masse moléculaire du xanthane produit. Ces phénomènes sont liés à la viscosité du milieu de fermentation qui augmente de façon importante au fur et à mesure que le xanthane est produit. Les vitesses de transfert de matière et de chaleur sont alors affectées par cette augmentation de viscosité du milieu.

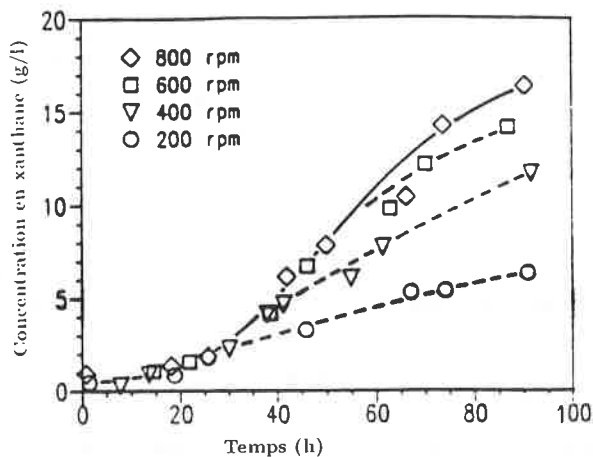


FIGURE 8. - Influence de l'agitation sur la production du xanthane (d'après Peters et al. [12]).

Rhéologie des solutions de xanthane

La propriété majeure du xanthane est d'être fortement viscosifiant. Sans entrer dans le détail de la rhéologie des solutions de xanthane, il est intéressant de connaître le rhéogramme d'une solution de xanthane peu concentrée (figure 9). Aux faibles vitesses de cisaillement, on observe un plateau newtonien surtout visible aux faibles concentrations de polymère. En augmentant la vitesse de cisaillement, il y a une chute de la viscosité qui correspond à un comportement de type pseudoplastique (si l'on considère la loi de puissance d'Ostwald : $\eta = K\dot{\gamma}^{n-1}$, $n < 1$). Ce type de comportement est indispensable dans de nombreuses applications, par exemple en récupération assistée du pétrole où l'on recherche une faible viscosité lors de l'injection de la solution de polymère et une forte viscosité lorsqu'il se retrouve au sein de la roche-réservoir et qu'il sert de fluide de balayage.

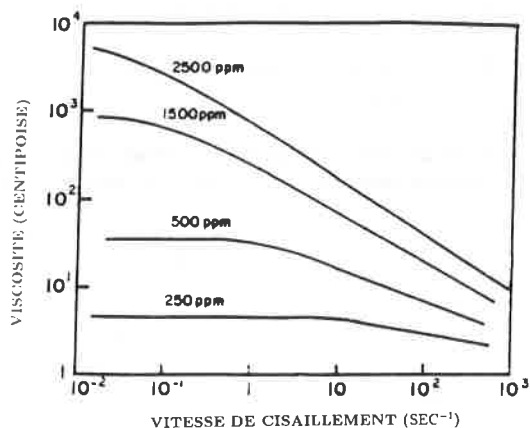


FIGURE 9. - Rhéologie des solutions de xanthane (d'après Elliott [13]).

Propriétés des solutions de xanthane

En plus de son fort pouvoir viscosifiant et de son comportement pseudoplastique, le xanthane, du fait de sa structure secondaire, possède d'autres propriétés intéressantes pour de multiples applications. Ainsi, sa stabilité en fonction de la salinité (figure 10), due à sa structure en bâtonnets semi-rigides, en fait un viscosifiant de choix dans les milieux très salés. De plus, il est très stable thermiquement s'il est en solution salée (figure 11). Cette dernière propriété est liée à sa structure en double hélice ordonnée qui fait qu'il peut tolérer plusieurs fractures de la chaîne principale tout en conservant son volume hydrodynamique, grâce aux interactions moléculaires interchaînes. En conformation désordonnée (donc en milieu peu salé), il n'y a pas de stabilisation intermoléculaire et, par conséquent, le xanthane n'est pas stable en température. De la même façon, en milieu salé, le xanthane est très peu sensible au pH. C'est pour toutes ces raisons qu'il est utilisable dans de nombreuses formulations.

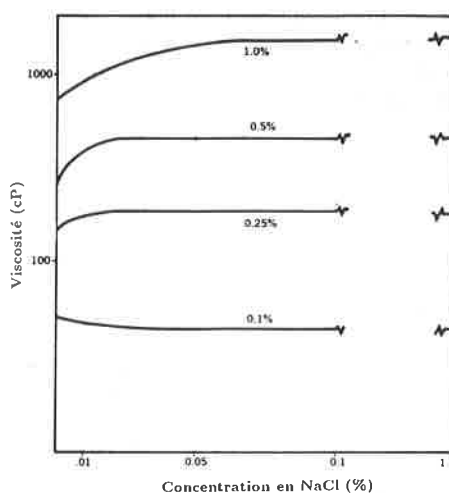


FIGURE 10. - Stabilité du xanthane en fonction de la salinité (d'après Kang et Cottrell [14]).

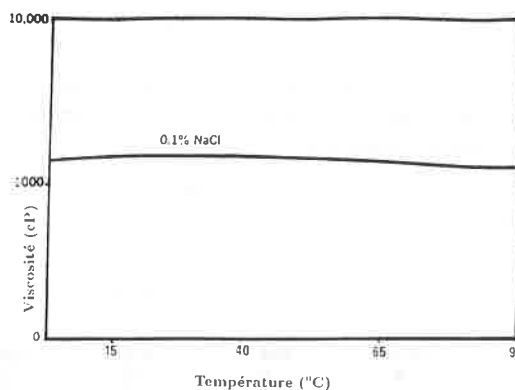


FIGURE 11. - Stabilité thermique du xanthane (d'après Kang et Cottrell [14]). Solution de xanthane à 1 %.

Applications du xanthane

Le xanthane est produit par plusieurs sociétés dont Kelco (groupe Merck & Co.), Rhône-Poulenc et Pfizer. Il est principalement utilisé dans les industries alimentaires où son emploi est en expansion. Ses propriétés le destinent aussi à des applications variées dans différents secteurs industriels tels que l'agrochimie, la cosmétologie, les industries chimiques ou dans certains domaines pétroliers (tableau IV).

TABLEAU IV. - Applications du xanthane.

Industries alimentaires
Assaisonnements, sauces
Boissons
Produits à base d'amidon
Crèmes glacées
Fromages
Surgelés
Autres industries
Agrochimie (pulvérisation de produits de traitements)
Peintures (dispersant de pigments)
Métallurgie (solution de décapage)
Céramiques
Cosmétologie (dentifrices, gels déodorants)
Explosifs (gélification en présence de borate)
Industrie du pétrole (fluides de forage, de fracturation, récupération assistée du pétrole)

Les autres polysaccharides

Les autres polysaccharides décrits ci-dessous sont soit produits industriellement soit au stade du développement.

L'alginate

L'alginate microbien vient en concurrence de l'alginate extrait des algues marines. Il est étudié par Tate & Lyle Ltd et est synthétisé par une bactérie *Azotobacter vinelandii* [15]. Sa structure est identique à celle de l'alginate marin. Il est constitué d'acides β -D-mannuronique et α -L-gulonique et sa masse moléculaire est d'environ 5.10^5 . Ses propriétés, identiques à celles de l'alginate marin, sont celles d'un gel (gélification en présence de Ca^{++}). L'alginate est principalement utilisé comme agent de gélification dans l'industrie alimentaire. Il est encore employé pour l'immobilisation des cellules ou des enzymes.

Le curdlane

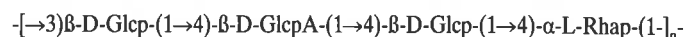
Ce polysaccharide, développé par Takeda Chemical Industry, est un homopolysaccharide constitué d'unités glucose assemblées par des liaisons α -(1 \rightarrow 3). Il est synthétisé par *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* et sa masse moléculaire est d'environ 7.10^4 [16]. Il a comme principal intérêt de gélifier à chaud et de former alors un gel compact et élastique, très stable entre pH 2,5 et 10. Il est principalement destiné à des usages alimentaires.

Le dextrane

Le dextrane est produit principalement par *Leuconostoc mesenteroides* mais sa synthèse a comme particularité d'être extracellulaire si bien qu'il peut être produit à l'aide de préparations acellulaires contenant l'enzyme responsable de la synthèse de dextrane, la dextrane-sucrase. Le seul sucre utilisé pour cette réaction est le saccharose. Le polymère synthétisé est constitué de résidus glucose liés à 95 % par des liaisons α -(1 \rightarrow 6), le reste étant des liaisons α -(1 \rightarrow 3) [17]. La masse moléculaire du polymère synthétisé est largement fonction des conditions de culture, ou de synthèse. Il peut être de 4 à 5.10^7 daltons mais, dans certains cas dépendants de la destinée des produits, on cherchera des masses beaucoup plus faibles. C'est un polysaccharide qui est peu viscosifiant et qui offre de bonnes compatibilités avec sels, acides et bases. Ses principales utilisations concernent l'industrie pharmaceutique, par exemple comme substitut de plasma sanguin. Il est également employé, après réticulation, comme tamis moléculaire (gels *Sephadex*).

Le gellane

Le gellane est un hétéropolysaccharide développé par Kelco [18]. Il est produit par une bactérie, *Auromonas elodea*, et est composé de glucose, rhamnose et acide glucuronique liés de la façon suivante :



Ces sucres sont porteurs de quelques groupements glycérate et acétate. Sa masse moléculaire est d'environ $0,5.10^6$. Ce polysaccharide peut former des gels de nature différente selon que le gellane est désacétylé ou non, élastique si acétylé, ferme si désacétylé. Les gels de gellane présentent de bonnes stabilités thermique et chimique. Ils sont a priori plutôt destinés à l'industrie alimentaire. Le gellane peut aussi être utilisé en remplacement de l'agar comme agent gélifiant des milieux de culture microbiologiques.

Le pullulane

Le polysaccharide produit par le champignon *Aureobasidium pullulans* est un α -D-glucane dans lequel des unités maltotriose (trois glucoses liés en α -1,4) sont assemblées par des liaisons α -(1 \rightarrow 6) pour former un polymère de masse fortement dépendante des conditions de culture, entre 5.10^4 et 4.10^6 [19]. Les solutions aqueuses de pullulane sont transparentes, visqueuses et collantes. D'autre part, dans certaines conditions, il peut former des films imperméables à l'oxygène et résistants à l'eau. Ces propriétés en font un produit intéressant pour les emballages dans l'industrie alimentaire, comme substitut de l'amidon dans les aliments allégés, ou comme adhésif. Il est par ailleurs préconisé comme agent de floculation d'argiles.

Le scléroglycane

Le scléroglycane est, comme le pullulane, un polysaccharide fongique produit cette fois par des champignons appartenant au genre *Sclerotium*, principalement par *Sclerotium glucanicum* ou *Sclerotium rolsfii* [20]. Il est constitué d'une chaîne principale linéaire β -(1 \rightarrow 3) glucosidique sur laquelle, environ tous les trois glucoses, est greffé un autre résidu glucose par une liaison β -(1 \rightarrow 6). Sa masse est variable mais atteint fréquemment 5.10^6 . Il est développé par Pillsbury et Sanofi. C'est un polymère fortement viscosifiant et très stable à haute température, à forte salinité et dans une large gamme de pH. En solution aqueuse, il a un comportement de type pseudoplastique. On retrouve là les principales propriétés du xanthane, ce qui explique pourquoi le scléroglycane vient souvent en concurrence du xanthane pour certaines applications, en particulier celles liées au secteur pétrolier.

Le Zanflo

Zanflo est un nom de marque, car il n'existe pas de terme générique pour ce polysaccharide bactérien produit par *Klebsiella pneumoniae* anciennement identifié comme étant un *Erwinia tahitica* [21]. Ce polymère est produit par Kelco et sa structure n'est pas connue avec précision. Il est constitué à 39 % de glucose, à 29 % de galactose, à 19 % d'acide glucuronique et à 13 % de fucose. Son taux d'acétylation est de 4 % environ. C'est un liquide pseudoplastique, développant une forte viscosité à faible concentration et compatible avec les colorants anioniques. L'ensemble de ces propriétés le destine à des applications dans les teintures et les peintures.

Conclusion

Bien qu'appartenant au monde des polymères, issus du vivant, les polysaccharides exocellulaires microbiens constituent une classe à part, non seulement par leur mode de synthèse, mais aussi par les structures qu'ils possèdent qui peuvent être relativement complexes comme dans le cas du xanthane. De nouveaux

polysaccharides ayant des propriétés originales sont susceptibles d'apparaître, soit par isolement de nouvelles souches, soit par modification génétique des souches existantes. Si leur utilisation est longtemps restée cantonnée à l'industrie alimentaire, elle gagne maintenant d'autres domaines proches de la chimie. Enfin, produits du vivant, ils peuvent aussi bien être substrats du vivant et ces polysaccharides sont considérés comme biodégradables et non toxiques pour l'environnement, ce qui peut étendre leurs débouchés vers d'autres secteurs sensibles à ce critère.

Bibliographie

- [1] M. Yalpani, P.A. Sandford, in "Industrial Polysaccharides : Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications" (M. Yalpani, ed.), Elsevier, Amsterdam, **1987**, 311-335.
- [2] P.E. Janson, L. Kenne, B. Lindberg, *Carbohydr. Res.*, **1975**, *45*, 275-282.
- [3] R. Moorhouse, M.D. Walkinshaw, S. Arnott, in "Extracellular Microbial Polysaccharides" (P.A. Sandford, A. Laskin, eds), ACS Symposium Series 45, ACS, Washington D.C., **1977**, 90-102.
- [4] J. Lecourtier, G. Chauveteau, G. Muller, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1986**, *8*, 306-310.
- [5] G. Muller, J. Lecourtier, *Carbohydr. Polym.*, **1988**, *9*, 213.
- [6] E.R. Morris, in "Extracellular Microbial Polysaccharides" (P.A. Sandford, A. Laskin, eds), ACS Symposium Series 45, ACS, Washington D.C., **1977**, 81-89.
- [7] I.H. Smith, K.C. Symes, C.J. Lawson, E.R. Morris, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1981**, *3*, 129-134.
- [8] M.R. Betlach, M.A. Capage, D.H. Doherty, R.A. Hassler, N.M. Henderson, R.W. Vanderslice, J.D. Marelli, M.B. Ward, in "Industrial Polysaccharides : Genetic Engineering, Structure/Property, Relations and Applications" (M. Yalpani, ed.), Elsevier, Amsterdam, **1987**, 35-50.
- [9] R.A. Hassler, D.H. Doherty, *Biotechnol. Progr.*, **1990**, *6*, 182-187.
- [10] C.H. Shu, S.T. Yang, *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, *35*, 454-468.
- [11] I.W. Davidson, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1978**, *3*, 347-349.
- [12] H.U. Peters, H. Herbst, P.G.M. Hesselink, H. Lünsdorf, A. Schumpe, W.D. Deckwer, *Biotechnol. Bioeng.*, **1989**, *34*, 1393-1397.
- [13] J.H. Elliott, in "Extracellular Microbial Polysaccharides" (P.A. Sandford, A. Laskin, eds), ACS Symposium Series 45, ACS, Washington D.C., **1977**, 144-159.
- [14] K.S. Kang, I.W. Cottrell, in "Microbial Technology", 2nd ed. (H.J. Peppler, D. Perlman, eds), Academic Press, New York, **1979**, 417-481.
- [15] J.A.M. Fyfe, J.R.W. Govan, *Progr. Industr. Microbiol.*, **1983**, *18*, 45-83.
- [16] T. Harada, in "Extracellular Microbial Polysaccharides" (P.A. Sandford, A. Laskin, eds), ACS Symposium Series 45, ACS, Washington D.C., **1977**, 265-283.
- [17] A. Jeanes, in "Extracellular Microbial Polysaccharides" (P.A. Sandford, A. Laskin, eds), ACS Symposium Series 45, ACS, Washington D.C., **1977**, 284-297.
- [18] K.S. Kang, G.T. Veeder, I.W. Cottrell, *Progr. Industr. Microbiol.*, **1983**, *18*, 231-253.
- [19] B.J. Catley, in "Microbial Polysaccharides and Polysaccharases" (R.C.W. Berkeley, G.W. Gooday, D.C. Ellwood, eds), Academic Press, London, **1979**, 69-84.
- [20] F.E. Halleck, **1967**, U.S. Patent 3 301 848.
- [21] K.S. Kang, G.T. Veeder, D.D. Richey, in "Extracellular Microbial Polysaccharides" (P.A. Sandford, A. Laskin, eds), ACS Symposium Series 45, ACS, Washington D.C., **1977**, 211-219.