

# CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE CERTAINS HYBRIDES DE MAÏS UTILISÉS COMME SUBSTRAT DANS L'OBTENTION DES SPORES DE *PENICILLIUM CHRISOGENUM* : MISE EN ÉVIDENCE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE OPTIMALE PRO *PENICILLIUM*

MARIANA ZAHARIA<sup>1</sup>, ANCA-MIHAELA HUMĂ<sup>2\*</sup>, LUCIAN NEGURĂ<sup>2</sup>,  
VLAD ARTENIE<sup>2</sup>

**Mots clef** : pénicilline, spore, mycélium, culture submergée, substrat pro *Penicillium*

**Résumé** : La présente étude a pour but l'identification des différents caractères biochimiques de quelques 23 hybrides de maïs cultivés dans notre pays, ainsi que l'analyse de leur influence sur le comportement du mycélium de *Penicillium chrysogenum* développé en culture submergée à partir de spores poussées sur des caryopses de maïs. Les données accumulées nous ont permis l'établissement d'un tableau biochimique contenant des intervalles de valeurs définissant un substrat optimal pour l'obtention de spores donnant des mycéliums productifs de *Penicillium*.

## INTRODUCTION

La biosynthèse de la pénicilline par *Penicillium chrysogenum* [8] représente un processus complexe qui, quoique apparemment très bien connu, nous surprend avec de nouveaux aspects concernant les variables le caractérisant. Ainsi, alors que dans le passé il était considéré comme certain le fait que la biosynthèse de la pénicilline débute à la fin de la période de croissance logarithmique, de nos jours il a été constaté que la vitesse de biosynthèse atteindrait sa valeur maximale pendant la période de croissance maximale du mycélium. Après cette période, la valeur de la vitesse de biosynthèse serait comprise entre 30-50% par rapport aux valeurs enregistrées en phase logarithmique. Ce comportement étudié par nous est également soutenu par les recherches de Brakhage [2,3] concernant les mécanismes intimes de régulation moléculaire de la biosynthèse de la pénicilline. En suivant, tout au long de la végétation, l'évolution de la concentration des ARNm correspondants aux enzymes impliquées dans la biosynthèse de la pénicilline, il a été constaté que la biosynthèse de la aminoacyl-cystéinyl-valine synthétase (ACVS), enzyme catalysant la première étape de biosynthèse, c'est-à-dire la formation du tripeptide  $\delta(L\text{-}\alpha\text{-aminoacyl})\text{-L-cystéinyl-D-valine}$ , se réalise jusqu'à l'âge de 60 heures. Après ce moment, la biosynthèse du tripeptide reposera uniquement sur les réserves enzymatiques accumulées dans la cellule pendant la période de croissance. Ce comportement démontre le fait que dans la formation des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'antibiotique, un rôle déterminant est détenu par la composition chimique du très jeune mycélium, et implicitement, de la spore à partir de laquelle ce mycélium se développera. À son tour, la composition chimique de la spore est déterminée par l'information génétique du mycélium ayant généré la spore et par la composition chimique du substrat sur lequel ce mycélium s'est développé.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé comme matériel de recherche les caryopses de maïs provenues de 23 hybrides de maïs obtenus au Centre de Recherches Agricoles « Podu Iloaiei », ainsi qu'une souche hautement productive de *Penicillium chrysogenum* issue de la collection de microorganismes de la S.C. « Antibiotice » Iași.

Pour l'obtention des spores de *Penicillium chrysogenum* nous avons utilisé comme milieu de culture des caryopses de maïs stériles, humectés.

La vérification de la capacité des spores à produire la biomasse mycélienne en culture submergée s'est réalisée sur un milieu végétatif à base d'extrait de maïs (extrait de maïs 20g/l, sucrose 20g/l, Carbonate de calcium 5g/l, à pH 6,5) [6,7].

Le potentiel biosynthétique du mycélium de *Penicillium chrysogenum* a été vérifié en utilisant un milieu de fermentation, dont la composition a été indiquée par Hersbach [4] (glucose 5g/l, lactose 70g/l, extrait de maïs 50g/l, nitrate d'ammonium 5g/l, sulfate de sodium 1g/l, carbonate de calcium 8g/l, phosphate mono potassique 4g/l, sulfate d'ammonium 5g/l, sulfate de magnésium 0,25g/l, sulfate de zinc 0,04g/l, sulfate de manganèse 0,02 g/l, acide phénylacétique en addition continue et en maintenant la concentration entre 0,2 et 0,6g/l, antimoussant : huile de soja, à pH 7-7,4).

Le dosage de la pénicilline dans les milieux s'est effectué par la méthode HPLC (High Performance Liquid Chromatography) [5].

Les variantes de substrat (hybrides de maïs) testées sont présentées dans le Tableau 1. Comme témoin, il a été utilisé un hybride d'importation.

Tableau 1. Les différents hybrides de maïs utilisés comme substrat

Variante	Hybride de maïs	Variante	Hybride de maïs
V1	Helga	V12	P 226
V2	Merlin	V13	SV 95
V3	Turda	V14	Carpatin
V4	Seorumpic	V15	Presto
V5	Orange de Tg. Frumos	V16	Moldova 425
V6	Orange de Ezăreni	V17	Perlis
V7	Podu Iloaiei	V18	Podu Iloaiei 110
V8	LC 255	V19	Montana
V9	Simona	V20	P 348
V10	Oana	V21	Eva
V11	Cicantîn	V22	Élan
TÉMOIN	-----	V23	P 223

L'établissement de la composition biochimique des caryopses de maïs a comporté la détermination des indicateurs suivants [1] :

- Le contenu en matière sèche par thermostatisation à 105°C ;
- Le contenu en protéines, selon la méthode Kjeldha [A+T] ;
- La quantité de sucres solubles, selon la méthode Fehling ;
- La quantité d'azote aminique, selon la méthode Sorensen ;
- Le niveau du phosphore, par la méthode spectrophotométrique ;
- Le contenu en calcium et en magnésium, par la méthode complexométrique ;
- Le contenu en acides aminés, à l'aide de l'appareil « Aminoacid Analyser T339 Microtechna Praha ».

L'expérience s'est déroulée en deux étapes :

➤ Durant la première étape, les caryopses des hybrides de maïs ont été inoculés avec des spores de *Penicillium chrysogenum* et incubés à 25°C jusqu'à la sporulation du mycélium développé sur ces caryopses. Les spores obtenues ont été inoculées en cultures submergées afin de vérifier le potentiel de biosynthèse du mycélium issu des spores respectives ;

➤ Dans la deuxième étape, il a été établi la composition biochimique des hybrides de maïs.

➤ Des limites de variation ont été préfigurées pour les caractères biochimiques analysés correspondant aux hybrides de maïs possédant des qualités pro *Penicillium*.

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les valeurs des variables biochimiques déterminées ont été centralisées dans les tableaux 2 et 3. Les analyses biochimiques ont été effectuées uniquement pour les hybrides ayant favorisé l'obtention de résultats en biosynthèse équivalents ou supérieurs à ceux enregistrés sur le maïs témoin. Les hybrides associés à des résultats non appropriés en fermentation (V5: Orange de Tg. Frumos et V6: Orange de Ezăreni) ont été éliminés.

Dans le tableau 2 on peut observer que les hybrides testés présentent des valeurs proches en ce qui concerne leur contenu en matière sèche, les petites différences enregistrées n'influençant pas la qualité des spores de *Penicillium*.

Le contenu en protéines des hybrides de maïs est différent et, généralement, les meilleurs résultats en biosynthèse ont été associés avec un contenu protéique compris entre 9,5 et 11%. Le contenu en sucres solubles est différent d'un hybride à l'autre et on peut observer que les meilleurs résultats en biosynthèse ont été réalisés avec les spores obtenues sur des caryopses de maïs avec un contenu glucidique situé entre 63 et 75%. En ce qui concerne l'azote, les meilleurs résultats ont été enregistrés avec les hybrides dont les valeurs de l'azote aminique comprises entre 0,042-0,065%. Les macroéléments dosés (phosphore, calcium, magnésium), quoique présentant des valeurs très diverses et différenciant d'une manière intéressante les hybrides étudiés, ne semblent pas influencer directement la qualité des spores de *Penicillium*.

Tableau 2. Les valeurs des variables biochimiques déterminés pour les hybrides de maïs étudiés

Variante	Matière sèche %	Protéines %	Sucres solubles %	Azote aminique %	Phosphore mg/100g	Calcium, Magnésium mg/100g	Pénicilline % /témoin
M	89	13.7	60.8	0.015	25	0.034	100
V1	87	11.66	70	0.034	176	0.070	105
V2	88	9.57	71	0.050	190	0.065	105
V3	87	7.48	63	0.030	198	0.072	103
V4	88	7.61	71	0.054	177.4	0.080	105
V8	89	7.67	72.61	0.034	200.5	0.060	105
V9	89	11.12	60	0.050	222.4	0.069	103
V10	89	10.85	72.04	0.056	197.8	0.069	106
V12	87	9.11	66.82	0.030	174.6	0.065	107
V13	87	14.0	61	0.042	220	0.050	115
V14	87	12.6	60	0.040	205	0.050	116
V15	88	11.66	63.55	0.040	172.1	0.052	120
V16	87	9.8	66.82	0.040	217.8	0.133	132
V17	87	9.76	74.4	0.056	215.1	0.075	128
V18	87	9.56	69.78	0.056	65.6	0	122
V19	91	9.7	72.56	0.056	81.3	0.028	124
V20	88	7.9	74.9	0.042	74.8	0.055	124
V21	88	9.7	65.37	0.042	90.8	0.086	121
V23	88	11.3	69.18	0.065	131.1	0.07	126

Tableau 3. Composition en acides aminés des différentes variantes de maïs (g% \* 10<sup>-3</sup>)

V	Asparagine	Thréonine	Sérine	Acide glutamique	Proline	Glycine	Alanine	Valine	Méthionine	Isoleucine	Leucine	Tyrosine	Phénylalanine	Histidine	Lysine	Arginine
M	897	476	696	2738	1122	469	1697	626	264	475	1911	627	1702	714	254	510
V1	680	391	499	1210	1006	234	659	465	321	428	1020	530	1269	645	210	302
V2	560	297	470	1345	1084	198	720	432	308	379	1243	378	1196	587	198	295
V3	699	397	531	1997	1078	210	910	488	337	430	1486	507	1233	600	245	390
V4	550	281	349	1184	269	126	459	333	259	247	774	389	1353	657	177	0
V7	743	389	558	2249	1095	185	1077	527	286	471	1716	564	1359	638	192	250
V8	504	275	394	1493	550	151	623	365	238	297	1050	380	766	570	158	280
V9	602	303	410	1594	688	133	710	455	133	139	1035	578	478	744	117	250
V10	581	299	397	1684	576	135	660	405	169	329	1186	404	958	592	152	200
V11	668	360	518	2005	604	210	793	611	369	490	1525	665	1212	1070	250	320
V12	470	249	363	1250	910	220	530	390	350	316	910	420	710	520	250	260
V13	616	323	485	1885	990	266	825	543	380	390	1420	410	1150	493	250	170
V14	710	365	586	2382	1290	276	1069	550	285	432	1720	626	1290	563	230	380
V15	710	373	548	2020	933	232	874	650	260	395	1514	517	1180	575	244	400
V16	615	358	533	2150	1317	250	934	623	337	433	1636	717	1550	542	226	270
V17	613	334	514	1757	1350	236	742	436	240	210	1135	536	798	500	191	350
V18	528	276	453	1690	988	240	750	490	220	338	1217	528	1040	533	260	360
V19	614	350	540	2017	1130	280	865	488	233	358	1390	545	1060	740	224	320
V20	487	264	383	1364	880	245	621	430	310	310	988	556	880	490	260	280
V21	596	273	453	1577	630	220	710	411	188	350	1159	414	430	460	270	300
V22	429	236	375	1390	610	200	610	353	257	295	1040	490	860	450	240	310
V23	699	366	630	2550	1320	268	1112	620	357	510	1960	630	1580	660	250	310

Dans le tableau 3 est présentée la composition en acides aminés des caryopses de maïs. La variante témoin se caractérise par les valeurs les plus élevées pour la plupart des acides aminés dosés, la méthionine et l’histidine étant les seules exceptions. La variante V23 (l’hybride P223) présente une composition semblable à celle du témoin, mais aussi un contenu élevé en méthionine. Cette différence est accompagnée par un comportement différent du mycélium issu des spores élevées sur les deux variantes de maïs. Ainsi, les spores formées sur les caryopses de l’hybride P223 ont développé en culture submergée un mycélium dont le potentiel biosynthétique est supérieur avec 26% à celui du mycélium développé à partir des spores obtenues sur le témoin. Les variantes qui ont favorisé le potentiel biosynthétique le plus élevé (V16, V17 et V23) se caractérisent par un contenu important en proline, phénylalanine, leucine (V16 et V23), valine et alanine. De façon générale, le meilleur hybride de maïs utilisé comme substrat pour l’obtention des spores de *Penicillium*, c'est-à-dire le V16 (Moldova 425), se caractérise par un contenu élevé ès aminoacides présentés dans le tableau 3.

Parmi toutes les variantes du lot étudié, 8 hybrides de maïs (présentés dans le tableau 4) se remarquent par l’induction de qualités supérieures aux spores de *Penicillium*, qualités concrétisées par des résultats en biosynthèse supérieurs de 20 à 32% à ceux obtenus en utilisant les spores élevées sur le témoin.

Tableau 4. Les 8 hybrides représentant de meilleurs substrats que le témoin

Variante	Nom de l'hybride	Résultat en biosynthèse, en % par rapport au témoin
Témoin	-----	100
V16	Moldova 425	131.54
V17	Perlis	128.46
V23	P 223	125.96
V19	Montana	122.34
V20	P 348	124
V18	Podu Iloaiei 110	122.34
V21	Eva	120.59
V15	Presto	119.96

À cause du fait que parmi les 23 hybrides étudiés 21 ont présenté des qualités supérieures au témoin et que chaque caractère biochimique a présenté une large intervalle de variabilité à l’intérieur de lot testé, il a été difficile de réaliser un tableau biochimique aux intervalles strictes qui puisse définir un substrat optimum pour l’obtention des spores de *Penicillium*. Pour cette raison, nous avons considéré que l’établissement de deux intervalles de valeurs pour chaque caractère biochimique serait plus efficace.

Tableau 5. Intervalles de données biochimiques pour les meilleurs hybrides étudiés

Composé analysé	Intervalle de valeurs	
	Résultats très bons	Résultats bons
Matière sèche %	87.4 – 87.9	86.5 – 90.7
Contenu en protéines %	9.7 – 9.8	7.9 – 11.3
Contenu en sucres %	66.8 – 74.7	63.55 – 74.9
Azote aminique %	0.04 – 0.065	0.040 – 0.065
Soufre	1.19 – 1.22	0.2 – 2.34
Phosphore mg/100g	131.1 – 216.8	65.6 – 216.8
Ca <sup>2+</sup> et Mg <sup>2+</sup> %	0 – 0.075	0 – 0.133
Asparagine %	0.613 – 0.699	0.429 – 0.71
Thréonine %	0.334 – 0.336	0.236 – 0.366
Sérine %	0.514 – 0.63	0.375 – 0.630
Acide glutamique %	1.757 – 2.55	1.364 – 2.550
Proline %	1.317 – 1.35	0.61 – 1.35
Glycine %	0.236 – 0.268	0.20 – 0.268
Alanine %	0.742 – 1.112	0.610 – 0.934
Valine %	0.436 – 0.62	0.353 – 0.623
Méthionine %	0.240 – 0.357	0.188 – 0.357
Isoleucine %	0.21 – 0.51	0.21 – 0.51
Leucine %	1.135 – 1.96	1.04 – 1.96
Tyrosine %	0.536 – 0.717	0.49 – 0.717
Phénylalanine %	0.798 – 1.58	0.43 – 1.58
Histidine %	0.5 – 0.66	0.45 – 0.74
Lysine %	0.191 – 0.25	0.191 – 0.27
Arginine %	0.27 – 0.35	0.27 – 0.4

Le tableau 5 présente ces deux intervalles de valeurs. Dans la première sont notées les valeurs correspondant aux hybrides sur lesquels les meilleurs résultats ont été obtenus (V16, V17 et V23 avec des résultats de 126-132% par rapport au témoin), alors que dans la deuxième sont présentées les valeurs pour les hybrides ayant donné de bons résultats (V15, V16, V19, V20, V21 avec des résultats entre 120-125% par rapport au témoin).

## CONCLUSIONS

Les résultats enregistrés démontrent que de petites variations dans la composition biochimique du substrat sur lequel sont obtenues les spores de *Penicillium* peuvent induire des variations dans la composition biochimique de la spore même et, implicitement, du jeune mycélium développé à partir de cette spore. Ces modifications affectent la capacité de biosynthèse du mycélium, probablement en influençant la synthèse des enzymes impliquées dans la formation de la pénicilline.

Par la connaissance du tableau biochimique optimal pour le substrat utilisé dans l'obtention des spores de *Penicillium*, ainsi que des hybrides de maïs correspondant à ce tableau, d'autres hybrides possédant des qualités pro- *Penicillium* peuvent être créés.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Artenie, V. și Tănase, E., 1981, *Practicum de biochimie generală*. Centrul de Multiplicare al Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași.
2. Brakhage, A.A., Sept.1998, Molecular Regulation of  $\beta$ -Lactam Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 547-585.

3. Brakhage, A.A., Sprote, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H. and Tuncher, A., 2004, Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 88, 45-90.

4. Hersbach, G.J.M., van der Beek, C.P. and van Dijck, P.W.M., 1984, The penicillins : properties, biosynthesis and fermentation. *Biotechnology of industrial antibiotics*. Vandamme EJ editor, New York, Marcel Dekker Inc., p. 45–140.

5. Knox, J.H. and Kauer, B., 1989, *High Performance Liquid Chromatography*. Brown. P.R. and Hartwick, R.A. Eds., Wiley Interscience: New York, Chapter 4.

6. Luengo, J.M., Iriso, J.L., Lopez-Nieto, M.J., 1986, Direct enzymatic synthesis of natural penicillins using phenyl-acetyl-CoA : 6aAPA phenylacetyl transferase of *Penicillium chrysogenum*, minimal and maximal side chain length requirements. *J. Antibiotics*, 39(12), 1754-1759.

7. Revilla, G., Lopez-Nieto, M.J., Luengo, J.M., Martin, J.F., 1984, Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiotics*, 37(7), 781-789.

8. Tudose, G., 1982, *Genetica microorganismelor*. Editura Didactică si Pedagogică, Bucuresti.

1) S.C. «Antibiotice S.A.» – Iași

2) Universită «Alexandru Ioan Cuza» – Iași

\*) agodja@uaic.ro