

L'INFLUENCE DES PARTICULARITÉS BIOCHIMIQUES DE CERTAINS HYBRIDES DE MAÏS UTILISÉS COMME SUBSTRAT SUR LA QUALITÉ DES SPORES DE *PENICILLIUM CHRISOGENUM*

MARIANA ZAHARIA¹, ANCA-MIHAELA HUMĂ^{2*}, LUCIAN NEGURĂ²,
VLAD ARTENIE²

Mots clef : spore, mycélium, caryopses de maïs, biosynthèse de la pénicilline

Résumé : Dans ce travail, nous avons essayé de mettre en évidence la modalité dont le substrat sur lequel sont obtenues les spores utilisées comme inocule peut influencer le taux de biosynthèse du mycélium issu de ces spores en culture submergée (en flacons agités). Nous avons également cherché à déceler la variante optimale de substrat et la mise en évidence des éventuels aspects biochimiques qui pourraient influencer négativement la qualité des spores. Pour des raisons pratiques, on a opté pour des variantes de substrat naturel appartenant à une même espèce végétale (caryopses de 23 hybrides de maïs autochtones).

INTRODUCTION

L'optimisation des processus industriels de biosynthèse de la pénicilline a été orientée spécialement vers la modélisation de la composition du milieu de fermentation et vers l'obtention de mutants au potentiel biosynthétique élevé. Au contraire, la qualité des spores utilisées comme inocule, ainsi que l'espacement temporel de la synthèse des systèmes enzymatiques impliqués dans ce processus ont été insuffisamment traités. Ces deux aspects peuvent influencer décisivement l'évolution d'un système industriel, même avec un fort potentiel de la souche utilisée et un milieu de fermentation optimal.

Généralement, pour l'obtention des spores de *Penicillium* sont utilisés des substrats naturels ou synthétiques, capables d'induire une sporulation abondante. Cependant, la façon dont la composition biochimique de la spore influence les mécanismes intimes de synthèse des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la pénicilline au sein du jeune mycélium développé à partir de la spore est très peu connue et dépendante d'une série de variables intrinsèques.

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, humectées.

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, antimoissant : huile de soja, à pH 7-7,4).

Les variantes de substrat (hybrides de maïs) testées sont présentées dans le Tableau 1. Comme témoin, nous avons 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	Cicantin	V22	Élan
TÉMOIN	-----	V23	P 223

Les variables suivies ont été les suivantes :

- L'aspect du mycélium en fin de thermostatisation des flacons contenant les caryopses inoculés avec des spores de *Penicillium chrysogenum* ;
- La biomasse microbienne obtenue en culture végétative, calculée en pourcentage de mycélium humide compacté obtenu par la centrifugation du milieu pendant 15 minutes à 1500 rpm ;
- La vitesse spécifique moyenne de biosynthèse de pénicilline en milieu de fermentation, calculée en fonction de la concentration en pénicilline (Déterminée, quant à elle, par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) [5].), par rapport à la quantité de matière sèche et par unité de temps.

Les flacons contenant des caryopses stériles ont été inoculés avec une suspension de spores de *Penicillium chrysogenum* et incubés à 25°C jusqu'à l'obtention des spores pigmentées. En fin de thermostatisation, des observations ont été effectuées sur l'épaisseur de la couche de mycélium développée sur les caryopses, sur le degré de sporulation et celui de pigmentation des spores. Les caryopses enveloppés de mycélium sporulé ont été lavés et les suspensions obtenues ont été diluées à l'eau distillée stérile jusqu'à une densité d'environ 1010 spores/ml. La suspension résultée a servi pour inoculer les flacons contenant du milieu végétatif. Après cette inoculation, les flacons ont été incubés à 25°C sur un agitateur rotatif, pendant 20 heures à 240 rpm. En fin de thermostatisation on a déterminé le pourcentage de mycélium humide compacté. 10 ml de milieu végétatif développé a été centrifugé dans des éprouvettes stériles pendant 15 minutes à 1500 rpm, le surnageant a été enlevé et le mycélium a été redissout dans de l'eau distillée stérile en complétant le volume à 10 ml. 2 ml de ce volume ont servi comme inocule pour le milieu de fermentation. Les flacons ainsi inoculés ont été incubés 25°C sur un agitateur rotatif, pendant 120 heures à 240 rpm. À chaque 24 heures d'intervalle on a déterminé la vitesse spécifique de biosynthèse, en fin du processus la vitesse spécifique moyenne étant calculée pour chaque variante. Afin d'obtenir les résultats les plus précis possibles, chaque hybride de maïs a été vérifié sur 4 cultures pures différentes appartenant à la même souche de *Penicillium chrysogenum*.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Dans le Tableau 2 sont centralisées les valeurs des variables suivies, correspondant à chaque hybride de maïs. L'épaisseur du mycélium, le degré de sporulation et le degré de pigmentation des spores ont été appréciés en comparaison avec l'aspect du mycélium développé sur les caryopses témoin. Ainsi, pour le symbole 0 la variable caractérisée a été approximativement identique au témoin, le symbole + signifie que la variante a été plus intense que dans le cas du témoin (mycélium plus épais, degré de sporulation plus intense ou degré de pigmentation plus accentué), alors que – signifie que la variable a été représentée plus faiblement que sur le témoin. La vitesse spécifique moyenne de biosynthèse de pénicilline a été donnée en pourcentages par rapport à la valeur correspondant au témoin.

Tableau 2. Variables suivies pour les différentes variantes par rapport aux valeurs du témoin

Variante	Épaisseur du mycélium	Degré de sporulation	Degré de pigmentation	Mycélium humide compacté (%)	Vitesse spécifique moyenne de biosynthèse (%)
M	0	0	0	100	100
V1	0	0	+	118	107
V2	0	0	0	107	101
V3	+	+	+	118	105
V4	0	0	0	107	105
V5	+	+	+	121	88
V6	+	+	+	121	94
V7	0	0	0	107	109
V8	0	0	-	111	105
V9	0	0	0	111	103
V10	0	0	0	111	106
V11	0	0	0	111	113
V12	0	0	-	111	107
V13	0	0	0	104	115
V14	+	+	+	114	116
V15	0	0	+	125	120
V16	-	-	-	111	132
V17	+	+	0	111	128
V18	-	-	-	118	122
V19	+	+	+	114	124
V20	0	0	-	118	125
V21	-	-	-	118	121
V22	0	0	0	109	100
V23	+	+	-	107	126

On peut observer dans ce tableau que les différentes variantes de substrat végétal appartenant à la même espèce ont induit des différences significatives d'ordre morphologique et physiologique, aussi bien dans la première génération (mycélium développé sur les caryopses) que dans la génération suivante (mycélium développé à partir des spores obtenues sur les caryopses, en culture submergée). Nous allons présenter ces différences plus en détail :

- L'aspect macroscopique du mycélium développé sur les caryopses de maïs

En analysant l'influence du substrat, d'un côté sur la vitesse de croissance de la biomasse en culture de surface, appréciée par l'épaisseur de la couche de mycélium sur la surface des caryopses, et de l'autre côté sur le degré de sporulation, apprécié en fonction de l'aspect plus ou moins velouté, ainsi que par le calcul du nombre de spores dans la suspension obtenue lors du lavage des caryopses, on constate les différences suivantes :

- Les variantes V3, V5, V6, V14, V17, V19 et V23 ont représenté des substrats facilement métabolisables, par conséquent la couche de mycélium développée sur ces caryopses a été plus épaisse et plus intensément sporulée que celle développée sur le témoin ;

- Les variantes V1, V2, V4, V7, V8, V12, V13, V15 et V20 ont favorisé le développement d'une couche de mycélium comparable à celle développée sur le témoin ;

- Sur V16, V18 et V21 la couche de mycélium a été moins épaisse et moins intensément sporulée que sur le témoin.

En ce qui concerne le degré de pigmentation des spores :

- Sur V1, V3, V5, V6, V14, V15 et V19 – pigmentation plus intense que celle des spores obtenues sur le témoin ;

- Sur V2, V4, V7, V8, V10, V11, V13 et V17 – pigmentation approximativement identique avec le témoin ;

- Sur V12, V16, V18, V20, V21, V22 et V23 – pigmentation moins intense que sur le témoin.

- La capacité des spores à produire de la biomasse en culture submergée, appréciée par le pourcentage de mycélium humide compacté, a démontré que :

- Les spores obtenues sur les variantes V3, V5, V6, V14, V15 et V19 ont développé en cultures submergées un pourcentage de mycélium humide compacté supérieur à celui obtenu avec les spores développées sur le témoin ;

- Les spores obtenues avec les autres variantes ont développé un pourcentage de mycélium comparable au témoin.

- En analysant le potentiel de biosynthèse du mycélium développé en culture submergée à partir des spores obtenues sur les caryopses de maïs, apprécié par la vitesse spécifique moyenne de biosynthèse de benzylpénicilline, on constate que :

- Le mycélium développé à partir des spores obtenues sur les variantes V5 et V6 (respectivement les hybrides Orange de Tg. Frumos et Orange de Ezăreni) se caractérise par un potentiel biosynthétique inférieur au témoin ;

- On distingue huit hybrides de maïs (présentés dans le Tableau 3) qui, utilisés comme substrat, ont induit aux spores de *Penicillium chrysogenum* et par conséquent au mycélium développé à partir des spores en culture submergée des qualités pro *Penicillium* supérieures. Dans le cas de ces huit variantes (V15, V16, V17, V18, V19, V20, V21 et V23), la vitesse spécifique moyenne de biosynthèse a été avec 20-30% supérieure à celle enregistrée sur le témoin ;

- Le mycélium issu des spores développées sur les autres variantes de maïs a présenté une vitesse spécifique moyenne de biosynthèse comparable au témoin.

Tableau 3. Les huit variantes donnant des spores aux qualités supérieures au témoin

Variante	Hybride	Résultats en biosynthèse [% par rapport au témoin]
Témoin	-----	100
V16	Moldova 425	132
V17	Perlis	128
V23	P223	126
V19	Montana	122
V20	P348	124
V18	Podu Iloaiei 110	122
V21	Eva	121
V15	Presto	120

Généralement, les hybrides de maïs sur lesquels le mycélium se développe rapidement, sporule abondamment avec des spores intensément pigmentées peuvent être utilisés comme substrat pour *Penicillium* uniquement dans les situations où on cherche l'obtention de biomasse mycélienne ou de spores capables de produire rapidement de la biomasse en cultures submergées. Par contre, ces hybrides ne doivent pas être utilisés comme substrat lorsqu'on cherche l'obtention de spores utilisées dans la biosynthèse de la pénicilline en cultures submergées, car les résultats obtenus seront assez modestes. Lors des applications industrielles qui ont pour but la biosynthèse de la pénicilline, il est conseillé d'éviter les hybrides de maïs pigmentés en rouge (Orange de Tg. Frumos et Orange de Ezăreni) qui, par leur composition biochimique, influencent négativement la composition biochimique de la spore de *Penicillium* et implicitement du mycélium développé

à partir de la spore. Les mécanismes enzymatiques mis en œuvre dans ce mycélium facilitent les processus anaboliques, au détriment de ceux biosynthétiques. Ce comportement se traduit finalement par une biomasse abondante et vigoureuse, mais d'un potentiel biosynthétique bas.

Les meilleurs résultats en biosynthèse ont été obtenus avec la variante 16 (Moldova 425), la couche de mycélium qui s'y est développée étant peu épaisse, faiblement sporulée et faiblement pigmentée. La composition biochimique du hybride Moldova 425 a influencé la composition biochimique de la spore de *Penicillium* et donc du mycélium développé à partir de la spore dans le sens d'une favorisation des systèmes enzymatiques impliqués dans la biosynthèse de la pénicilline.

La présente étude démontre que l'optimisation de la biosynthèse de la pénicilline doit être initiée à partir du substrat sur lequel sont obtenues les spores de *Penicillium*. La composition de la spore, ainsi que les systèmes enzymatiques qui se forment au sein de la spore en germination et du jeune mycélium sont décisives pour la biosynthèse de la pénicilline. Ces observations sont soutenues par les études effectuées sur les mécanismes intimes de régulation de la biosynthèse, qui ont démontré que l'enzyme ACVS (aminoacyl-tRNA synthétase) qui catalyse la première étape de biosynthèse est synthétisée dans la cellule uniquement pendant les 60 premières heures de végétation. Le déroulement de la biosynthèse après cet âge est assuré par les réserves enzymatiques accumulées dans la cellule auparavant.

À quelques exceptions près, les spores obtenues sur les hybrides de maïs sur lesquels le mycélium de *Penicillium* a formé une couche pas très épaisse et pas intensément pigmentée se sont caractérisées par des qualités supérieures, en conférant au mycélium développé en culture submergée un potentiel biosynthétique supérieur au mycélium développé à partir des spores élevées sur les variantes de maïs couvertes de mycélium épais et aux spores intensément pigmentées.

CONCLUSIONS

Généralement, les hybrides de maïs qui, par leur composition, ont favorisé les systèmes métaboliques impliqués dans l'anabolisme mycélien, ce qui a conduit à un mycélium abondant, fortement sporulé et bien pigmenté, ont été associés à des faibles résultats en biosynthèse. Les spores respectives cultivées en submersion ont donné naissance à une biomasse abondante, formée de hyphes vigoureuses, mais avec un faible potentiel de biosynthèse.

Les hybrides de maïs intensément pigmentés (Orange de Tg. Frumos et Orange de Ezăreni) doivent être évités dans les applications industrielles. Ces hybrides, utilisés comme substrat pour *Penicillium*, favorisent l'obtention d'un mycélium de surface épais, fortement sporulé, aux spores intensément pigmentées capables de produire rapidement un mycélium submergé mais ayant un faible potentiel de biosynthèse. Pour les applications industrielles sont recommandées les huit variantes que nous avons caractérisées comme ayant des qualités biosynthétiques supérieures.

Les résultats obtenus démontrent l'importance du substrat sur lequel sont obtenues les spores utilisées comme inocule dans la biosynthèse de la pénicilline en cultures submergées.

Avec l'identification des hybrides de maïs aux propriétés pro *Penicillium*, peuvent être établies les caractéristiques biochimiques optimales du substrat, ainsi que les aspects biochimiques non appropriés.

BIBLIOGRAPHIE

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