

LE TRANSPORT MEMBRANAIRE ACTIF DE L'ACIDE PHÉNYLACÉTIQUE CHEZ *PENICILLIUM CHRISOGENUM* ET SON INFLUENCE SUR LA VITESSE SPÉCIFIQUE DE BIOSYNTHÈSE DE LA PÉNICILLINE

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

Mots clef : transport actif, acide phénylacétique, vitesse spécifique de transport, mycélium, pénicilline

Résumé : Le but du présent travail consiste en la mise en évidence d'une corrélation existante entre la cinétique du transport membranaire actif de l'acide phénylacétique et la vitesse de biosynthèse de la benzylpénicilline, ainsi qu'en l'espace temporel du moment optimal d'activation du système de transport de l'acide phénylacétique. Les informations présentées peuvent être particulièrement utiles dans les programmes d'optimisation des processus industriels. Elles permettent d'éviter le gaspillage d'acide phénylacétique, par son administration dans le milieu de fermentation au moment où le système membranaire de transport actif est prêt.

INTRODUCTION

La première étape dans la biosynthèse de la benzylpénicilline consiste en la condensation des acides aminés avec formation du tripeptide δ (L- α -aminoadipyl)-L-cystéinyl-D-valine (ACV). Cette étape est catalysée par la ACV synthétase (ACVS), qui se trouve libre dans le cytosol. Ultérieurement a lieu la transformation oxydative du tripeptide en une structure bicyclique formée d'un noyau β -lactame et d'un noyau thiazolidinique. Le composé qui en résulte se nomme isopénicilline N (IPN) et représente le premier intermédiaire bioactif des voies biosynthétiques spécifiques aux pénicillines et aux céphalosporines [1,4,8]. La réaction de cyclisation est catalysée par la IPN synthétase (IPNS). La dernière étape dans la biosynthèse de la pénicilline consiste en le remplacement de la chaîne latérale hydrophile de l'isopénicilline N, représentée par l'acide L- α -aminoadipique, par le radical de l'acide phénylacétique qui est, lui, hydrophobe. Ce changement est catalysé par la acyl-coenzyme A : isopénicilline N-acyle transférase (IAT). Dans les milieux naturels, avec les pénicillines G et V, sont synthétisées les pénicillines D, F, DF, K, dont les chaînes latérales sont représentées par les radicaux des acides n-héxanoïque, Δ 3-héxanoïque et n-octanoïque. Étant donné que ces pénicillines ne présentent pas d'importance économique, afin d'orienter la biosynthèse vers la production de pénicilline G, on ajoute dans le milieu de fermentation de l'acide phénylacétique (PA).

Dans la cellule, l'assimilation de l'acide phénylacétique se réalise par diffusion passive à des valeurs de pH comprises entre 3 et 5,5 et par un mécanisme de transport membranaire actif pour des valeurs de pH entre 5 et 8,5. Le transport passif induit un effet toxique, par l'abaissement du gradient de pH transmembranaire et, implicitement, par le blocage des systèmes de transport membranaire. Pour cette raison, lors de la biosynthèse industrielle la diffusion passive de l'acide phénylacétique est évitée par la modulation de la concentration en PA et des valeurs du pH. Le système de transport membranaire actif du PA est activé par l'administration de l'acide phénylacétique dans le milieu de culture. Les tentatives d'activer ce système de transport avec d'autres inducteurs se sont montrées insatisfaisantes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé comme matériel d'étude une souche hautement productive de *Penicillium chrysogenum* issue de la collection de microorganismes de la S.C. « Antibiotice » Iași.

Le milieu végétatif a été formé de : extrait de maïs 20g/l, sucrose 20g/l, carbonate de calcium 5g/l, à pH 6,5) [7].

Le milieu de fermentation pour la vérification du potentiel biosynthétique du mycélium a été préparé d'après Hersbach [5] (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).

75 ml de milieu végétatif ont été inoculés avec 1 ml de suspension de spores de *Penicillium chrysogenum* avec une concentration de 108 spores/ml et incubé pendant 30 heures à 25°C, sur agitateur rotatif à 220 rpm. En fin d'incubation, le mycélium développé dans les flacons contenant du milieu végétatif a été lavé par centrifugation 8 minutes à 2000 rpm dans de l'eau distillée stérile, resuspendu dans de l'eau distillée stérile et utilisé pour l'inoculation des flacons de

fermentation. Chaque flacon de fermentation, contenant 75 ml de milieu, a été inoculé avec 4 ml de suspension de jeunes hyphes avec une concentration de 25% en mycélium humide compacté. Une fois inoculés, ces flacons ont été incubés dans des conditions similaires à ceux de végétatif, pendant 160 heures.

L'expérience s'est déroulée en trois étapes :

En une première étape, nous avons suivi la cinétique de consommation du PA dans un milieu riche en acide phénylacétique, 100 mM. Les études sur la biosynthèse de la pénicilline publiées auparavant [2] ont utilisé une concentration de 6,4 mM en précurseur, concentration maintenue par ajouts fractionnés sur toute la durée du processus. Dans le cas présent, toute la quantité de PA a été administrée dans le milieu avant son inoculation avec la suspension d'hyphes. À chaque 12 heures d'intervalle ont été déterminées les concentrations en benzylpénicilline et en PA par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) [6], ainsi que la concentration du mycélium humide compacté par centrifugation 15 minutes à 3500 rpm.

Lors de la deuxième étape, la concentration en acide phénylacétique dans le milieu de fermentation a été maintenue constante, entre 7-10 mM, par ajouts fractionnés. Le système membranaire de transport du PA a été activé, comme dans l'étape précédente, à partir du moment initial de la fermentation, par la présence de l'acide phénylacétique dans le milieu de culture.

En une troisième étape, le système de transport membranaire du PA a été activé à différents âges du mycélium. Ainsi, la première dose d'acide phénylacétique a été administrée dans le système à 12, 24, 36, 48, 60, 72 et 84 heures. Après la première administration, la concentration en acide phénylacétique a été maintenue entre 7-10 mM par ajouts fractionnés.

Durant les trois étapes présentées ci-dessus, la dynamique du transport de l'acide phénylacétique a été suivie jusqu'en fin de fermentation, en déterminant la vitesse spécifique de consommation du PA à 12 heures d'intervalle.

Afin d'éviter l'influence de la composition du milieu sur le système de transport membranaire, la vitesse de transport du PA a été également déterminée en solution tampon phosphate. Dans ce cas, aux âges où a été déterminée la concentration en acide phénylacétique lors de la troisième étape (voir ci-dessus), respectivement à 12 heures d'intervalle, le mycélium a été lavé par centrifugation dans de l'eau distillée stérile et introduit dans une solution tampon phosphate 0,06 M à pH 6,5. Les flacons ainsi préparés ont été préincubés 5 minutes à 25°C, l'acide phénylacétique étant quant à lui ajouté par la suite en concentration de 6,4 mM. Les flacons ont ensuite de nouveau été incubés deux heures sur l'agitateur rotatif et finalement a été déterminée la vitesse spécifique de consommation du PA.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

La vitesse spécifique de transport membranaire actif du PA représente la quantité d'acide phénylacétique consommé à partir du milieu de culture, rapportée à l'unité de volume (cm^3) de mycélium humide compacté et à l'unité de temps (heure). La formule de calcul est la suivante :

$v_{\text{PA}} = \Delta [\text{PA}] / m \times \Delta t$, avec :

v_{PA} – vitesse spécifique de transport membranaire actif de l'acide phénylacétique ;

$\Delta [\text{PA}]$ – différence entre les concentrations en acide phénylacétique au début de l'intervalle de temps et à sa fin ($\text{PA}_i - \text{PA}_f$), pour les variantes pour lesquelles l'entière quantité d'acide phénylacétique a été administrée dans le milieu au moment initial

– différence entre la somme de la concentration initiale d'acide phénylacétique du milieu plus la quantité de PA administrée au cours de l'intervalle de temps d'une part, et la concentration finale d'acide phénylacétique d'autre part ($\text{PA}_i + \text{PA}_{\text{ad}} - \text{PA}_f$), pour les variantes pour lesquelles la concentration de PA du milieu a été maintenue par des ajouts ;

m – volume du mycélium humide compacté ;

Δt – intervalle de temps, qui a été de 12 heures pour toutes les déterminations.

Les valeurs obtenues ont été rapportées en pourcentage vis-à-vis de la plus grande valeur, considérée comme étalon et enregistrée dans l'intervalle 84-96 heures par l'échantillon V3a, où l'activation du système de transport a été effectuée à 60 heures.

Dans le Tableau 1 sont présentés les résultats enregistrés dans la première étape de l'expérience, quand toute la quantité de PA a été administrée dans le milieu en début de fermentation. Afin de mettre en évidence l'effet de la concentration élevée en acide phénylacétique sur la biosynthèse de la pénicilline, nous avons présenté dans le même tableau les

valeurs des vitesses spécifiques de biosynthèse (Vp). Vp est représentée en pourcentage par rapport à la valeur étalon (vitesse spécifique de biosynthèse de la pénicilline enregistrée dans l'intervalle 0-24 heures dans les échantillons où la concentration en acide phénylacétique a été maintenue constante entre 7-10 mM par ajouts au cours de la fermentation.

Tableau 1. Vitesse spécifique de transport de l'acide phénylacétique avec toute la quantité administrée au début (vPA) et vitesse spécifique de biosynthèse de la pénicilline (Vp)

| Âge (heures) | 12 | 24 | 36 | 48 | 60 | 84 | 96 | 108 | 120 |
|----------------|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| Vp (% étalon) | 70 | 8 | 23 | 28 | 49 | 46 | 40 | 23 | 28 |
| vPA (% étalon) | 2 | 4 | 8 | 12 | 18 | 40 | 60 | 52 | 41 |

Les données présentées dans le Tableau 1 montrent qu'une concentration élevée en PA dans le milieu de fermentation n'influence pas positivement le transport membranaire actif du précurseur, tout en influençant cependant l'évolution de ce même transport au cours du temps. Ainsi, la vitesse de transport a augmenté plus lentement que dans les échantillons où la concentration en PA n'a pas dépassé 7-10 mM, les valeurs maximales enregistrées étant inférieures à ces échantillons. La concentration élevée en acide phénylacétique a également influencé négativement la vitesse spécifique de biosynthèse de la pénicilline. Les valeurs enregistrées dans les premières 24 heures, quand la vitesse de biosynthèse est la plus élevée, n'ont pas atteint la valeur étalon, étant enregistrées à 70% de cette valeur. Dans tous les cas, on peut observer que, même si le système de transport membranaire a été activé par la présence de l'acide phénylacétique dans le milieu dès le début de la fermentation, la vitesse maximale de transport a été atteinte tardivement, à l'âge de 96 heures.

Au cours de la deuxième étape de l'expérience, nous avons suivi l'évolution de la vitesse spécifique de transport actif du PA, ainsi que l'évolution de la vitesse spécifique de biosynthèse, dans le milieu de fermentation où la concentration en acide phénylacétique a été maintenue constante, entre 7 et 10 mM, par ajouts fractionnés. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Vitesse spécifique de transport de l'acide phénylacétique (vPA) et vitesse spécifique de biosynthèse (Vp), en pourcentages par rapport à l'étalon, avec la concentration en PA maintenue constante

| Âge (heures) | 12 | 24 | 36 | 48 | 60 | 84 | 96 | 108 | 120 |
|----------------|----|-----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| Vp (% étalon) | 96 | 100 | 61 | 6 | 28 | 39 | 42 | 40 | 31 |
| vPA (% étalon) | 8 | 12 | 30 | 54 | 30 | 81 | 68 | 50 | 51 |

Le maintien de la concentration en PA à des valeurs basses a influencé positivement le transport membranaire actif, mais également la vitesse spécifique de biosynthèse de pénicilline. La différence entre les situations apparues dans les deux étapes pourrait être expliquée par la pression qu'une concentration élevée en PA exercerait sur la membrane cellulaire, en actionnant aussi bien sur les systèmes actifs de transport que sur les systèmes entretenant le gradient de pH transmembranaire.

Dans la troisième étape de l'expérience a été suivie la vitesse spécifique de transport membranaire actif du PA par l'activation du système membranaire de transport à différents âges

de la culture (24, 36, 48, 72 et 84 heures). Afin d'éviter l'influence éventuelle de la composition du milieu de fermentation sur la vPA, la vérification s'est effectuée d'un coté dans ce milieu de fermentation (données présentées dans le Tableau 3), et d'un autre coté en milieu tampon phosphate (données présentées dans le Tableau 4).

Tableau 3. Vitesse spécifique de transport actif du PA dans le milieu de fermentation, sur les variantes où l'activation du système de transport s'est effectuée à différents âges de la culture

| Variante | T induction PA (heures) | 36 heures | 48 heures | 60 heures | 72 heures | 84 heures | 96 heures | 108 heures | 120 heures |
|----------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| V1a | 24 | 8 | 12 | 30 | 81 | 56 | 20 | 50 | 51 |
| V2a | 36 | ----- | 14 | 28 | 50 | 86 | 38 | 51 | 54 |
| V3a | 48 | ----- | ----- | 30 | 57 | 68 | 92 | 60 | 54 |
| V4a | 60 | ----- | ----- | ----- | 29 | 60 | 100 | 85 | 74 |
| V5a | 72 | ----- | ----- | ----- | ----- | 20 | 64 | 95 | 76 |
| V6a | 84 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 34 | 70 | 98 |

Tableau 4. Vitesse spécifique de transport actif du PA dans du tampon phosphate 0,06 M, à pH 6,5, sur les variantes où l'activation du système de transport s'est effectuée à différents âges de la culture

| Variante | T induction PA (heures) | 36 heures | 48 heures | 60 heures | 72 heures | 84 heures | 96 heures | 108 heures | 120 heures |
|----------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| V1 | 24 | 10 | 12 | 38 | 50 | 80 | 52 | 63 | 61 |
| V2 | 36 | ---- | 10 | 35 | 62 | 86 | 58 | 64 | 63 |
| V3 | 48 | ---- | ---- | 15 | 31 | 47 | 89 | 60 | 63 |
| V4 | 60 | ---- | ---- | ---- | 20 | 52 | 100 | 70 | 68 |
| V5 | 72 | ---- | ---- | ---- | ---- | 21 | 62 | 98 | 75 |
| V6 | 84 | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 34 | 68 | 96 |

L'activité du système de transport membranaire du PA est dépendante de l'âge du mycélium. Les résultats enregistrés aussi bien en milieu de fermentation qu'en solution tampon phosphate ont démontré que l'assimilation du PA enregistre ses valeurs maximales lorsque le système de transport est activé à 60 heures de végétation. Son activation à des âges plus bas induit un transport membranaire d'une intensité réduite, alors que les valeurs maximales enregistrées dans ces situations sont placées au-delà de 60 heures. L'activation du système de transport après 60 heures d'âge est suivie par l'augmentation rapide de la consommation de PA les valeurs maximales étant atteintes dans ces cas très rapidement.

Dans tous les cas étudiés, lorsque les valeurs maximales de transport du PA sont atteintes on observe par la suite une diminution de ces valeurs, alors que le taux d'accumulation du PA se maintient à des valeurs importantes même si le taux de biosynthèse de la pénicilline G est en diminution. Ce comportement démontre que l'acide phénylacétique n'est pas utilisé dans la cellule uniquement pour la substitution du radical latéral de la molécule d'isopénicilline, mais qu'il est consommé également dans d'autres voies métaboliques. Les études antérieures sur le transport membranaire de l'acide phénylacétique par l'utilisation de PA marqué au ¹⁴C, études menées par Susanne Havn Ericsen [3], avait démontré que 17-50% de la quantité de PA assimilé à partir du milieu serait métabolisé au cours de son transport membranaire, comportement spécifique pour la souche Wisconsin. En échange, en utilisant pour la même expérience une souche hautement productive, on constate que la conversion de l'acide phénylacétique assimilé en benzylpénicilline a été quasiment totale. Ces résultats confirment nos conclusions, ainsi que le fait que les données obtenues sont caractéristiques pour la souche utilisée dans notre travail ; leur adaptation à d'autres souches devrait par conséquent être effectuée avec beaucoup de précaution.

CONCLUSIONS

Les concentrations élevées en acide phénylacétique dans le milieu de fermentation n'influencent pas d'une manière significative le comportement de son système membranaire de transport actif, mais influencent négativement le métabolisme de l'organisme à long terme. Par conséquent, même lorsque la concentration en acide phénylacétique dans le milieu a baissé, le taux de biosynthèse a été moindre que dans le cas où la concentration du PA a été maintenue à des valeurs faibles sur toute la durée de l'expérience.

L'activité du système membranaire de transport du PA est dépendante de l'âge du mycélium. L'assimilation (vPA) enregistre les valeurs maximales lorsque le système de transport est activé à 60 heures d'âge, c'est-à-dire en fin de la période de croissance maximale et de biosynthèse maximale de la pénicilline N. Ce comportement pourrait être expliqué par la façon dont la cellule administre ses réserves énergétiques. Ainsi, durant les premières 60 heures ces réserves sont consommées principalement dans des processus impliqués dans la croissance cellulaire et dans la formation des systèmes enzymatiques dont fait partie celui impliqué dans la biosynthèse de la pénicilline.

La composition du milieu de fermentation n'influence pas significativement la cinétique du système de transport actif de l'acide phénylacétique.

La biosynthèse de la benzylpénicilline n'est pas strictement dépendante de la quantité de PA assimilé, mais la présence du précurseur est nécessaire pour la modification du rapport entre les pénicillines synthétisées, et ceci en faveur de la benzylpénicilline.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brakhage, A.A., 1998, Molecular Regulation of β -Lactam Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 547-585.
2. Demain, A.L., 1983, Biosynthesis of β -lactam antibiotics. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 189-228.
3. Ericson, S.H. and Soderblom, T.B., 1998, Uptake of phenylacetic acid by two strains of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 60, 310-316.
4. Fernandez-Canon, J.M., Reglero, A., Martinez-Blanco, H. and Luengo, J.M., 1989, Uptake of phenylacetic acid by *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255: a critical regulatory point in benzylpenicillin biosynthesis. *J. Antibiot.*, 42(9), 1398-1409.
5. 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.
6. 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.
7. Luengo, J.M., Iriso, J.L. and 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.
8. MacCabe, A.P., van Liempt, H., Palissa, H., Unkles, S.E., Riach, M.B., Pfeifer, E., von Dohren, H. and Kinghorn, J.R., 1991, Delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-

valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. Molecular characterization of the acvA gene encoding the first enzyme of the penicillin biosynthetic pathway. *J Biol Chem*, 266(19), 12646-12654.

1) S.C. «Antibiotice S.A.» – Iași

2) Universitățile «Alexandru Ioan Cuza» – Iași

*) agodja@uaic.ro