

Chapitre VI. Anabolisme et production de biomasse et de métabolites

Production des vitamines, d'antibiotiques, de toxines et production des enzymes

1- Production des vitamines

Les microorganismes **prototrophes** sont capables de synthétiser tous les facteurs de croissance, et en particulier toutes les **vitamines dont ils ont besoin** ; certains en libèrent dans le milieu des quantités intéressantes. **Il est possible, par perturbation du métabolisme**, de faire préparer par des microorganismes la plupart des vitamines ou provitamines (panthoténate, pyridoxine, biotine, thiamine, acide folique, acide lipoïque, nicotinamide, riboflavine, cyanocobalamine, précurseurs des vitamines A, C, D, vitamine K, coenzyme Q, inositol...). Certaines de ces productions ont un grand intérêt industriel, comme la vitamine B₂ ou riboflavine et surtout la vitamine B₁₂ ou cyanocobalamine dont la seule source est microbienne. En outre, le β -carotène, précurseur de la vitamine A, est souvent préparé par voie microbiologique.

- La biosynthèse d'une molécule de **riboflavin** (vitamine B₂) nécessite comme substrats ; une molécule de GTP et deux molécules de ribulose 5-phosphate. La biosynthèse de riboflavin comprend donc une voie à deux branches avec deux précurseurs principaux : GTP et ribulose-5-phosphate. La riboflavine intervient dans la synthèse des coenzymes flaviniques.

De nombreux microorganismes sont capables de synthétiser ce produit :

- ✓ Bactéries (*Azotobacter*, *Aerobacter*, *Mycobacterium* et surtout *Clostridium*, où la riboflavine est un sous-produit de la fermentation acétonobutylique),
- ✓ levures, surtout du genre **Candida**, et **moisissures**. C'est dans ce dernier groupe que l'on trouve les meilleurs producteurs de riboflavine, *Eremothecium ashbyii* et *Ashbya gossypii*, spécialement lorsqu'ils sont cultivés en milieu agité et supplémenté en lipides.

- La **cyanocobalamine ou vitamine B₁₂** est le facteur anti anémie pernicieuse. Il existe de nombreux produits très proches (analogues B₁₂). La structure de base de la molécule de vitamine B₁₂ est un cycle pseudoporphyrinique lié à un atome de cobalt. Après cyclisation, il y a incorporation du cobalt, amidation, puis liaison à un D-1-amino-2-propanol et à un 3-phosphoribose, Les micro-organismes les meilleurs producteurs appartiennent au genre

Streptomyces, mais la vitamine B₁₂ reste toujours intracellulaire. *Bacillus megaterium* et *Propionibacterium freudenreichii* ont également été utilisés.

- L'**acide pantothénique** peut être produit par culture de *Sporobolomyces holsaticus*. Il est synthétisé par condensation de β -alanine et d'acide pantoïque, dérivé de la valine. L'acide pantothénique peut être inclus dans un complexe appelé coenzyme A, qui est produit par diverses bactéries.

- La **biotine, ou vitamine H**, peut être aussi produite par culture de certains *Sporobolomyces* et autres levures.

- La production de la **nicotinamide, ou vitamine PP**, n'est pas réalisée partir des micro-organismes : en revanche, le NAD qui contient de la niacine (forme désaminée), peut être obtenu par culture de certains *Corenebacterium*.

Le **β -carotène ou provitamine A** est le pigment caroténoïde le plus important. Il s'agit d'un composé terpénoïde, synthétisé à partir de l'isopentylpyrophosphate. Le carotène est présent chez de nombreuses **algues**, et chez les Mucorales. Il peut être préparé par culture de la **moisissure Choanephora**.

- La **pyridoxine (vitamine B6)**, la **thiamine (vitamine B₁)**, l'**acide folique (vitamine F)** et l'**acide lipoïque** peuvent être produits par diverses cultures microbiennes, mais l'intérêt industriel de cette production n'est pas encore important.

- La **vitamine K1**, dérivée de la ménadione, peut être préparée par culture de l'algue *Chlorella* ou de certains *Bacillus* et le coenzyme Q, ou ubiquinone, peut être obtenu à partir de diverses **bactéries et levures**.

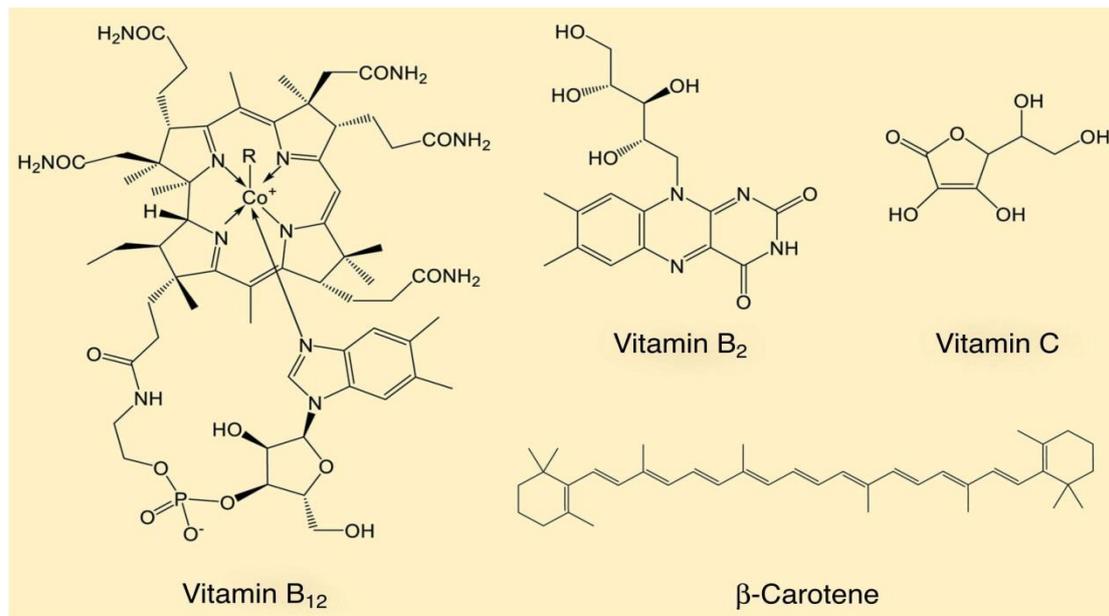


Fig 1. Structures de certaines vitamines typiques produites par des microbes génétiquement modifiée. la vitamine B12, B2, vitamin C, and pro-vitamin A(β -carotene).
 R = 5'-deoxyadenosyl, Me, OH, CN

Tableau 1. Vitamines produites par des méthodes biotechnologiques (Survase et al.2006)

| Vitamin | Biotechnological method | | Reference |
|-----------------------------------|---|---|-----------|
| | Enzyme/ microorganism used | Method | |
| Fat-soluble vitamins | | | |
| Vitamin E (α -tocopherol) | Freshwater microalgae <i>Euglena gracilis</i> | Fermentative production from glucose | (1) |
| Vitamin K ₂ | Mutated strain of <i>Bacillus subtilis</i> | Fermentation using soybean extract | (2) |
| Water-soluble vitamins | | | |
| Ascorbic acid (vitamin C) | 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase <i>Cynobacterium</i> sp. | Fermentative process to 2-keto-L-gulonic acid followed by chemical conversion to L-ascorbic acid | (3,4) |
| Biotin | Fermentation (<i>Serratia marcescens</i>) | Fermentative production from glucose by genetically engineered bacterium | (5) |
| | Multiple enzyme system (<i>Bacillus sphaericus</i>) | Conversion from diaminopimelic acid using the biotin biosynthetic enzyme system of mutant of (<i>Bacillus sphaericus</i>) | |
| Riboflavin | Fermentation (<i>Eremothecium ashbyii</i> , <i>Ashbya gossypii</i> , <i>Bacillus</i> sp., etc.) | Fermentative production from glucose | (6) |
| Vitamin B ₁₂ | Fermentation (<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Pseudomonas denitrificans</i>) | Fermentative production from glucose | (7) |

2- Production des antibiotiques

Les antibiotiques sont des métabolites secondaire produites par des microorganismes et ayant le pouvoir d'inhiber ou de détruire d'autres microorganismes. Leur intérêt économique provient de l'utilisation médicale pour lutter contre les maladies infectieuses.

Ce sont des substances spécifiques, ils n'ont pas une distribution généralisée parmi les microorganismes et ne sont produits que par un nombre limité d'espèces. Le genre *Streptomyces* contient une grande partie des microorganismes producteurs d'antibiotiques.

La production d'antibiotique fait appel à des **souches améliorées** par **mutation**, par **recombinaison** et par **génie génétique**. Le génie génétique permet, par exemple, le transfert du gène de l'acyl-transférase (pénicilline acylase) de *Penicillium* dans diverses souches. Le gène de la résistance aux aminoglycosides peut aussi être transféré, ce qui se traduit par la possibilité d'une hyper-production sans inhibition.

on distingue divers types d'antibiotiques selon leur structure chimique. Leurs voies de synthèse sont différentes.

Tableau 2. Toutes les classes d'antibiotiques cliniquement utilisés et leur source

| All classes of clinically used antibiotics and their source | | | | |
|---|---------------------------------|-----------------------|---|--|
| Class ^a | Discovery reported ^b | Introduced clinically | Example (and producing organism) | Molecular target |
| Antibiotics from actinomycetes | | | | |
| Aminoglycosides | 1944 | 1946 | Kanamycin A (<i>Streptomyces kanamyceticus</i>) | Protein synthesis: 30S ribosomal subunit |
| Tetracyclines | 1948 | 1948 | Tetracycline (<i>Streptomyces aureofaciens</i>) | Protein synthesis: 30S ribosomal subunit |
| Amphenicols | 1947 | 1949 | Chloramphenicol (<i>Streptomyces venezuelae</i>) | Protein synthesis: 50S ribosomal subunit |
| Macrolides | 1952 | 1952 | Erythromycin (<i>Saccharopolyspora erythraea</i>) | Protein synthesis: 50S ribosomal subunit |
| Tuberactinomycins | 1951 | 1953 | Viomycin (<i>Streptomyces puniceus</i>) | Protein synthesis: 30S and 50S ribosomal subunits (binds to the intersubunit bridge B2a) |
| Glycopeptides | 1954 | 1958 | Vancomycin (<i>Amycolatopsis orientalis</i>) | Cell wall synthesis: D-Ala-D-Ala termini of lipid II |
| Lincosamides | | | Clindamycin | |
| | 1962 | 1963 | Semi-synthetic derivative of lincomycin (<i>Streptomyces lincolnensis</i>) | Protein synthesis: 50S ribosomal subunit |
| Ansamycins | | | Rifamycin SV | |
| | 1959 | 1963 | Semi-synthetic derivative of rifamycin (<i>Amycolatopsis rifamycinica</i>) | Nucleic acid synthesis: RNA polymerase |
| Cycloserines | 1955 | 1964 | Seromycin (<i>Streptomyces orchidaceus</i>) | Cell wall synthesis: inhibition of alanine racemase and D-alanine-D-alanine ligase |
| Streptogramins | 1953 | 1965 | Pristinamycin (<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>) | Protein synthesis: 50S ribosomal subunit |
| Phosphonates | 1969 | 1971 | Fosfomycin (<i>Streptomyces fradiae</i>) | Cell wall synthesis: MurA (UDP-GlcNAc-3-enolpyruvyltransferase) inhibition |
| Carbapenems | | | Meropenem | |
| | 1976 | 1985 | Synthetic molecule based on thienamycin (<i>Streptomyces cattleya</i>) | Cell wall synthesis: penicillin-binding proteins |
| Lipopeptides | 1987 | 2003 | Daptomycin (<i>Streptomyces roseosporus</i>) | Cell wall: cell membrane disruption. |
| Lipiamycins | 1975 | 2011 | Fidaxomicin (<i>Dactylosporangium aurantiacum</i> subsp. <i>hamdenensis</i>) | Nucleic acid synthesis: RNA polymerase |
| Antibiotics from other bacteria | | | | |
| Polypeptides | 1939 | 1941 | Gramicidin A (<i>Bacillus brevis</i>) | Cell wall: forms ion channels that increase the permeability of the bacterial cell membrane |
| Bacitracin | 1945 | 1948 | Bacitracin A (<i>Bacillus subtilis</i>) | Cell wall synthesis: inhibition of dephosphorylation of C ₅₅ -isoprenyl pyrophosphate |
| Polymyxins | 1950 | 1959 | Colistin (<i>Paenibacillus polymyxa</i>) | Cell wall: cell membrane disruption |
| Mupirocin | 1971 | 1985 | Mupirocin (<i>Pseudomonas fluorescens</i>) | Protein synthesis: isoleucyl t-RNA synthetase |
| Monobactams | | | Aztreonam | |
| | 1981 | 1986 | Synthetic molecule based on SQ 26,180 (<i>Chromobacterium violaceum</i>) | Cell wall synthesis: penicillin-binding proteins |
| Antibiotics from fungi | | | | |
| Penicillins | | | Amoxicillin | |
| | 1929 | 1943 | Semi-synthetic derivative of penicillin (<i>Penicillium chrysogenum</i>) | Cell wall synthesis: penicillin-binding proteins |
| Fusidic acid | 1958 | 1962 | Fusidic acid (<i>Fusidium coccineum</i>) | Protein synthesis: elongation factor G |
| Enniatins ^c | 1953 | 1963 | Fusafungine (<i>Fusarium lateritium</i>) | Cell wall: cell membrane disruption |
| Cephalosporins | | | Cefacetrile | |
| | 1948 | 1964 | Semi-synthetic derivative of cephalosporin C (<i>Acremonium chrysogenum</i>) | Cell wall synthesis: penicillin-binding proteins |
| Pleuromutilins | | | Retapamulin | |
| | 1951 | 2007 | Semi-synthetic derivative of pleuromutilin (<i>Pleurotus mutilus</i>) | Protein synthesis: 50S ribosomal subunit |
| Synthetic antibiotics | | | | |
| Arsphenamines ^d | 1907 | 1910 | Salvarsan | Not known |

| Class ^a | Discovery reported ^b | Introduced clinically | Example (and producing organism) | Molecular target |
|--------------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------|---|
| Sulfonamides | 1932 | 1936 | Mafenide | Folate synthesis: inhibition of dihydropteroate synthetase |
| Salicylates ^e | 1902 | 1943 | 4-Aminosalicylic acid | Folate synthesis: prodrug that inhibits dihydrofolate reductase |
| Sulfones | 1908 | 1945 | Dapsone | Folate synthesis: inhibition of dihydropteroate synthetase |
| Pyridinamides | 1952 | 1952 | Isoniazid | Cell wall: prodrug that inhibits the synthesis of mycolic acids |
| Nitrofurans | 1945 | 1953 | Nitrofurantoin | DNA synthesis: DNA damage |
| Azoles ^f | 1959 | 1960 | Metronidazole | DNA synthesis: DNA damage |
| (Fluoro)quinolones | 1962 | 1962 | Ciprofloxacin | DNA synthesis: inhibition of DNA gyrase, and topoisomerase IV |
| Diaminopyrimidines | 1950 | 1962 | Trimethoprim | Folate synthesis: inhibition of dihydrofolate reductase |
| Ethambutol | 1962 | 1962 | Ethambutol | Cell wall: arabinosyl transferase inhibition |
| Thioamides | 1956 | 1965 | Ethionamide | Cell wall: prodrug that inhibits the synthesis of mycolic acids |
| Phenazines ^f | 1954 | 1969 | Clofazimine | DNA synthesis: binds to guanine bases |
| Oxazolidinones | 1987 | 2000 | Linezolid | Protein synthesis: 50S ribosomal subunit |
| Diarylquinolines | 2004 | 2012 | Bedaquiline | ATP synthesis: proton pump inhibition |

^a Classes are defined by origin, structure and/or mechanism of action, which distinguishes between bacitracin, colistin and daptomycin, for example.

^b Year reported refers to first report in literature.

^c The European Medicines Agency recommended the withdrawal of fusafungine from the market in February 2016.

^d Salvarsan is no longer in clinical use.

^e Salicylic acids are found in nature, but this was not the source of this class of antibiotic.

^f Compound synthesis was inspired by natural antibiotic classes.

3- Production des toxines

Certaines bactéries et moisissures excrètent des toxines. Dans certains cas, la production industrielle de ces toxines présente un grand intérêt car elles sont utilisées pour la fabrication d'antigènes, de vaccins et antitoxines utilisés en médecine.

Chez les bactéries, il y a deux types de toxines :

Les **exotoxines**: de nature protéique, très actives mais thermolabiles, excrétées généralement pendant la croissance et rencontrées essentiellement chez des bactéries à Gram positif.

Les principales sont la toxine diphtérique (*Corynebacterium diphteriae*), les entérotoxines staphylococciques (*Staphylococcus aureus*), la toxine tétanique (*Clostridium tetani*), les toxines botuliniques (*Clostridium botulinum*), les toxines de *Clostridium perfringens*. Elles sont utilisées comme source d'antigènes mais surtout comme source d'anatoxines (vaccins).

Les **endotoxines**: de nature plus complexe (glucidolipidoprotéiques), moins actives et thermostables, libérées par lyse des cellules et rencontrées surtout chez les bactéries à Gram négatif. Les principales sont l'entérotoxine cholérique (*Vibrio cholerae*) et l'endotoxine typhoïdienne (*Salmonella*).

Certains produits peuvent jouer un grand rôle dans la lutte biologique (insecticide).

Diverses moisissures excrètent aussi des substances toxiques :

Alcaloïdes de l'ergot de seigle : ces substances sont produites par *Claviceps purpurea* et sont dotées de propriétés pharmacologiques et ont un intérêt médical.

Aflatoxines et autres **mycotoxines** : les aflatoxines dérivées de la coumarine sont produites par *Aspergillus flavus*. De nombreuses autres moisissures produisent des mycotoxines. L'intérêt de la production de ces mycotoxines est faible.

4- production des enzymes

De nombreuses enzymes peuvent être produites par culture microbienne (souvent grâce à des **mutants** hyper-producteurs et hyper-excréteurs) : il s'agit aussi bien d'enzymes recueillies dans le milieu de culture, que d'enzymes à localisation interne qu'il faut ensuite extraire du corps microbien.

Elles sont utilisées comme agent de transformation sous forme libre ou immobilisée, sous forme d'additifs, de biocapteurs...

Les enzymes de grande importance industrielle sont : les cellulases, les pectinases, les amylases, les lipases, les protéases, l'invertase, la glucose oxydase, la glucose isomérase, la dextrane sucrase, la pénicillinase, la catalase.

Tableau 3. Application industrielle des enzymes

| Industrial Application of Enzymes | | | |
|-----------------------------------|--|----------------------|---|
| Enzyme | Source organism | Method of production | Industrial application |
| Amylase (α and gluco) | Bacteria (<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>) | SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Mashing for beer making 2. Sugar recovery from scrap candy in candy industry 3. Starch modification for paper coating in paper industry 4. Cold swelling laundry starch in starch and syrup industry 5. Wall paper removal 6. Desizing of fabrics in textiles 7. Degradation of protein, causing stains in detergent industry |
| | Fungi (<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i> sp.) | SSF and SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Precooked baby foods and breakfast foods in cereals industry 2. Sugar recovery from scrap candy in candy industry 3. Removal of starch, clarification, oxygen removal for flavour enhancement 4. Starch removal from pectin in fruits and fruit juices 5. Corn syrup in starch and syrup industry 6. Production of glucose in starch and syrup industry 7. Bread baking in baking and milling industry 8. Digestive aids in clinics and pharmaceuticals 9. Liquefying purees and soups |
| Protease | Bacteria (<i>B. amyloliquifaciens</i>) | SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Chillproofing in beer industry 2. For condiment in food industry 3. Milk protein hydrolysate making in dairy industry 4. Unhairing and bating in leather industry 5. Recovery of silver from films in photography 6. Degradation of fat, causing stains in detergent industry |

| | | | |
|-----------------|--|-------------|---|
| | Fungi (<i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Penicillium chrysosporium</i> , <i>R. oligosporus</i> , <i>Actinomycetes</i> strain) | SSF and SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Bread baking in baking and milling industry 2. Chillproofing in beer industry 3. For condiment in food industry 4. Milk protein hydrolysate making in dairy industry 5. Evaporated milk stabilization in dairy industry 6. Spot removal in dry cleaning, laundry industry 7. Digestive aids in clinics and pharmaceuticals 8. Unhairing and bating in leather industry 9. Meat tendering, tenderizing casings, condensed fish soluble 10. Resolution racemic mixture of amino acids |
| Glucose oxidase | Fungi (<i>A. niger</i> and <i>Penicillium</i> sp.) | SSF and SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Oxygen removal in beer and beverages 2. Dried milk, oxygen removal in dairy industry 3. Oxygen and oxygen removal, mayonnaise in dried and egg industry 4. Paper test strips for diabetic glucose in pharmaceuticals 5. Oxygen removal for flavours enhancement in fruits and juices 6. In tooth paste to convert glucose into gluconic acid and hydrogen peroxide as both acts as disinfectant |
| Pectinases | Fungi (<i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp.) | SSF and SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Coffee bean fermentation, coffee concentrates in coffee industry 2. Clarification, filtration, concentration in fruits and fruit juices 3. Pressing, clarification, filtration in wine industry |
| Lactase | Yeast (<i>Kluceromyces</i>) | SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Whole milk concentrates 2. Ice cream and frozen desserts 3. Whey concentrates 4. Lactose hydrolysis in dairy industry |
| Cellulase | Fungi (<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Humicola grisea</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Chrysosporium lucknowense</i> , <i>Acremonium</i> sp.) | SSF and SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Deinking of papers for recycling in paper and pulp industry 2. Bio stonewashing denim in textile industry 3. Hydrolyzing cellulosic biomass to generate glucose for ethanol production in biofuel industry 4. Loosening of cellulose fibers to easily remove dirt and color in detergent industry |

| Enzyme | Source organism | Method of production | Industrial application |
|-------------------------|--|----------------------|--|
| Xylanase | Fungi (<i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>A. oryzae</i> , <i>Trichoderma</i> sp.) | SSF and SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Biobleaching in paper and pulp industry 2. Fiber solubility in animal feed industry |
| Lipase and proteinase | <i>A. oryzae</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Pseudomona</i> ssp., <i>Alcaligena</i> ssp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Candida albicans</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i> | SSF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Contact lens cleaning 2. Brightening in detergent industry 3. Ripening of cheese in dairy industry |
| Phytase | <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. ficuum</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas oryzae</i> | SSF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Release of phosphate in animal feed industry |
| Dextrinase | Fungi | SSF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Corn syrup preparation in starch and syrup making |
| Invertase | Yeast (<i>Saccharomyces</i>) | SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Soft center candies and fondants 2. High test molasses |
| Laccases and peroxidase | <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Basidiomycetes</i> | SSF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Polymerize materials with wood based fibers in paper and pulp industry |
| Hemicellulase | Fungi (<i>A. niger</i> , <i>T. reesei</i> , <i>Penicillium</i> sp.) | SSF and SmF | <ol style="list-style-type: none"> 1. Coffee concentrates 2. Hydrolyzing hemicellulosic biomass to generate glucose for ethanol production in biofuel industry |
| Catalase | <i>Aspergillus</i> sp. | | <ol style="list-style-type: none"> 1. Biopolishing and bleach clean-up in textile industry |

SSF, solid-state fermentation; SmF, submerged fermentation.