

## 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 B<sub>2</sub> ou riboflavine et surtout la vitamine B<sub>12</sub> ou cyanocobalamine dont la seule source est microbienne. En outre, le  $\beta$ -carotène, précurseur de la vitamine A, est souvent préparé par voie microbiologique.

- La biosynthèse d'une molécule de **riboflavin** (vitamine B<sub>2</sub>) 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 B<sub>12</sub>** est le facteur anti anémie pernicieuse. Il existe de nombreux produits très proches (analogues B<sub>12</sub>). La structure de base de la molécule de vitamine B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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  $\beta$ -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.

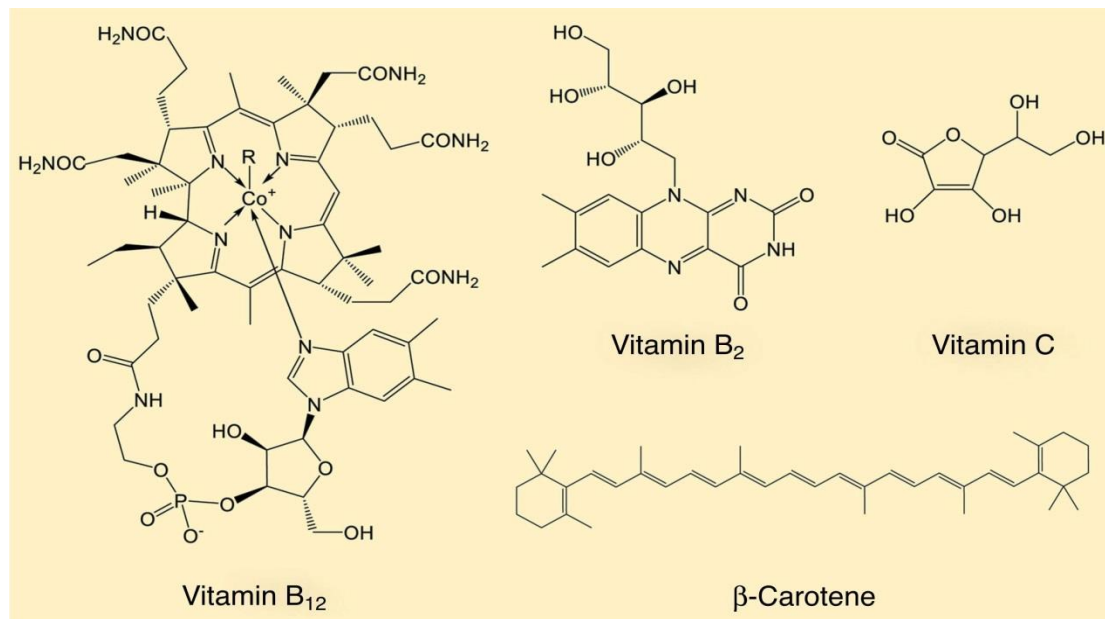
- La **biotine, ou vitamine H**, peut être aussi produite par culture de certains *Sporobolomyces* et autres levures.

- 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  **$\beta$ -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 B<sub>1</sub>)**, 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 ( $\alpha$ -tocopherol)	Freshwater microalgae <i>Euglena gracilis</i>	Fermentative production from glucose	(1)
Vitamin K <sub>2</sub>	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 <sub>12</sub>	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 <sup>a</sup>	Discovery reported <sup>b</sup>	Introduced clinically	Example (and producing organism)	Molecular target
Antibiotics from actinomycetes				
Aminoglycosides	1944	1946	<b>Kanamycin A</b> ( <i>Streptomyces kanamyceticus</i> )	Protein synthesis: 30S ribosomal subunit
Tetracyclines	1948	1948	<b>Tetracycline</b> ( <i>Streptomyces aureofaciens</i> )	Protein synthesis: 30S ribosomal subunit
Amphenicols	1947	1949	<b>Chloramphenicol</b> ( <i>Streptomyces venezuelae</i> )	Protein synthesis: 50S ribosomal subunit
Macrolides	1952	1952	<b>Erythromycin</b> ( <i>Saccharopolyspora erythraea</i> )	Protein synthesis: 50S ribosomal subunit
Tuberactinomycins	1951	1953	<b>Viomycin</b> ( <i>Streptomyces puniceus</i> )	Protein synthesis: 30S and 50S ribosomal subunits (binds to the intersubunit bridge B2a)
Glycopeptides	1954	1958	<b>Vancomycin</b> ( <i>Amycolatopsis orientalis</i> )	Cell wall synthesis: D-Ala-D-Ala termini of lipid II
Lincosamides			<b>Clindamycin</b>	
	1962	1963	Semi-synthetic derivative of lincomycin ( <i>Streptomyces lincolnensis</i> )	Protein synthesis: 50S ribosomal subunit
Ansamycins			<b>Rifamycin SV</b>	
	1959	1963	Semi-synthetic derivative of rifamycin ( <i>Amycolatopsis rifamycinica</i> )	Nucleic acid synthesis: RNA polymerase
Cycloserines	1955	1964	<b>Seromycin</b> ( <i>Streptomyces orchidaceus</i> )	Cell wall synthesis: inhibition of alanine racemase and D-alanine-D-alanine ligase
Streptogramins	1953	1965	<b>Pristinamycin</b> ( <i>Streptomyces pristinaespiralis</i> )	Protein synthesis: 50S ribosomal subunit
Phosphonates	1969	1971	<b>Fosfomycin</b> ( <i>Streptomyces fradiae</i> )	Cell wall synthesis: MurA (UDP-GlcNAc-3-enolpyruvyltransferase) inhibition
Carbapenems			<b>Meropenem</b>	
	1976	1985	Synthetic molecule based on thienamycin ( <i>Streptomyces cattleya</i> )	Cell wall synthesis: penicillin-binding proteins
Lipopeptides	1987	2003	<b>Daptomycin</b> ( <i>Streptomyces roseosporus</i> )	Cell wall: cell membrane disruption.
Lipiamycins	1975	2011	<b>Fidaxomicin</b> ( <i>Dactylosporangium aurantiacum</i> subsp. <i>hamdenensis</i> )	Nucleic acid synthesis: RNA polymerase
Antibiotics from other bacteria				
Polypeptides	1939	1941	<b>Gramicidin A</b> ( <i>Bacillus brevis</i> )	Cell wall: forms ion channels that increase the permeability of the bacterial cell membrane
Bacitracin	1945	1948	<b>Bacitracin A</b> ( <i>Bacillus subtilis</i> )	Cell wall synthesis: inhibition of dephosphorylation of C <sub>55</sub> -isoprenyl pyrophosphate
Polymyxins	1950	1959	<b>Colistin</b> ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	Cell wall: cell membrane disruption
Mupirocin	1971	1985	<b>Mupirocin</b> ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	Protein synthesis: isoleucyl t-RNA synthetase
Monobactams			<b>Aztreonam</b>	
	1981	1986	Synthetic molecule based on SQ 26,180 ( <i>Chromobacterium violaceum</i> )	Cell wall synthesis: penicillin-binding proteins
Antibiotics from fungi				
Penicillins			<b>Amoxicillin</b>	
	1929	1943	Semi-synthetic derivative of penicillin ( <i>Penicillium chrysogenum</i> )	Cell wall synthesis: penicillin-binding proteins
Fusidic acid	1958	1962	<b>Fusidic acid</b> ( <i>Fusidium coccineum</i> )	Protein synthesis: elongation factor G
Enniatins <sup>c</sup>	1953	1963	<b>Fusafungine</b> ( <i>Fusarium lateritium</i> )	Cell wall: cell membrane disruption
Cephalosporins			<b>Cefacetrile</b>	
	1948	1964	Semi-synthetic derivative of cephalosporin C ( <i>Acremonium chrysogenum</i> )	Cell wall synthesis: penicillin-binding proteins
Pleuromutilins			<b>Retapamulin</b>	
	1951	2007	Semi-synthetic derivative of pleuromutilin ( <i>Pleurotus mutilus</i> )	Protein synthesis: 50S ribosomal subunit
Synthetic antibiotics				
Arsphenamines <sup>d</sup>	1907	1910	<b>Salvarsan</b>	Not known

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

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

<sup>b</sup> Year reported refers to first report in literature.

<sup>c</sup> The European Medicines Agency recommended the withdrawal of fusafungine from the market in February 2016.

<sup>d</sup> Salvarsan is no longer in clinical use.

<sup>e</sup> Salicylic acids are found in nature, but this was not the source of this class of antibiotic.

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



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

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"> <li>1. Biobleaching in paper and pulp industry</li> <li>2. Fiber solubility in animal feed industry</li> </ol>
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"> <li>1. Contact lens cleaning</li> <li>2. Brightening in detergent industry</li> <li>3. Ripening of cheese in dairy industry</li> </ol>
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"> <li>1. Release of phosphate in animal feed industry</li> </ol>
Dextrinase	Fungi	SSF	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Corn syrup preparation in starch and syrup making</li> </ol>
Invertase	Yeast ( <i>Saccharomyces</i> )	SmF	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Soft center candies and fondants</li> <li>2. High test molasses</li> </ol>
Laccases and peroxidase	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Basidiomycetes</i>	SSF	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Polymerize materials with wood based fibers in paper and pulp industry</li> </ol>
Hemicellulase	Fungi ( <i>A. niger</i> , <i>T. reesei</i> , <i>Penicillium</i> sp.)	SSF and SmF	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coffee concentrates</li> <li>2. Hydrolyzing hemicellulosic biomass to generate glucose for ethanol production in biofuel industry</li> </ol>
Catalase	<i>Aspergillus</i> sp.		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Biopolishing and bleach clean-up in textile industry</li> </ol>

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