

Bulletin de l'Académie Lorraine des Sciences 2001, 40, 4.

PROBLEMATIQUE DE L'AMELIORATION DE LA PRODUCTION D'ACIDE AMINE PAR VOIE MICROBIENNE

IMPROVEMENT IN THE AMINO-ACID MICROBIAL PRODUCTION

Stéphane DELAUNAY¹, Pascale LAPUJADE², Damien LEYVAL¹,
Pierre GERMAIN¹, Jean-Louis GOERGEN², Jean-Marc ENGASSER¹

¹ Laboratoire Bioprocédés Agro-alimentaires, ENSAIA-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, 54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY

² Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS, ENSAIA-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, 54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY

RESUME : La production d'acide aminé par voie microbienne peut être améliorée soit en jouant sur le procédé de culture soit en modifiant le métabolisme du micro-organisme producteur. Ces 2 approches seront illustrées et discutées grâce à deux exemples d'acides aminés produits par *Corynebacterium glutamicum* : l'acide glutamique et la valine.

Mots-clés : *Corynebacterium glutamicum*, glutamate, valine

ABSTRACT : Amino-acid microbial production can be improved by a process modification or by inducing changes in the metabolism of the biocatalyst. These two approaches will be illustrated and discussed using the examples of glutamic acid and valine productions with *Corynebacterium glutamicum*.

Keywords : *Corynebacterium glutamicum*, glutamate, valine

Note présentée à la séance du 13 décembre 2001, acceptée le 20 décembre 2001.

INTRODUCTION

Les acides aminés constituent un groupe de molécules utilisé essentiellement en alimentation tant humaine qu'animale. Ainsi peut-on citer l'acide glutamique qui, en tant qu'exhausteur de goût, est employé comme condiment dans les pays asiatiques ainsi que comme additif entrant dans la composition de nombreux aliments. L'aspartate et la phénylalanine, pour leur part, sont à la base d'un édulcorant : l'aspartame, alors que la lysine et la méthionine sont utilisées comme compléments dans les rations alimentaires de certains animaux.

Il existe plusieurs modes de production des acides aminés. Ces derniers peuvent être obtenus par synthèse chimique, par catalyse enzymatique, par extraction (à partir d'une matière première riche en l'acide aminé recherché) ou encore par culture microbienne. Cette dernière méthode de production s'avère être la plus économique lorsqu'elle peut être employée c'est à dire lorsqu'il existe une souche microbienne hyperproductrice de l'acide aminé désiré. Les bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, ...) ainsi que des souches génétiquement modifiées de l'espèce bactérienne *Escherichia coli* sont à ce titre les micro-organismes les plus souvent utilisés. Parmi les acides aminés produits par l'intermédiaire de micro-organismes, les plus importants, en terme de quantité synthétisée, sont l'acide glutamique, la lysine, la phénylalanine, la thréonine et le tryptophane. Actuellement, environ 1 million de tonnes d'acide glutamique est produit par an. La production d'acides aminés représente donc l'une des applications majeures de la microbiologie à l'échelle industrielle.

L'élaboration des premiers procédés de production d'acides aminés par voie microbienne date de la fin des années 1950. Depuis, de nombreuses améliorations ont été apportées à ces procédés, afin d'obtenir des concentrations finales élevées, des productivités ou des rendements maximaux ou encore des coûts minimaux. Pour arriver à améliorer la production d'un acide aminé par voie microbienne, deux approches peuvent être considérées : modifier soit le procédé, soit le biocatalyseur c'est à dire le micro-organisme utilisé.

L'amélioration du procédé consiste à optimiser la façon dont le micro-organisme peut être mis en œuvre. Cela revient à étudier des paramètres tels que le type de réacteur employé, la composition du milieu de culture, les paramètres physico-chimiques (pH, agitation, ...), le mode de culture (discontinu, semi-continu ou continu) ou encore le profil d'alimentation en substrat. Dans le cas particulier de la production d'acide glutamique, de nombreuses études ont porté sur l'induction de l'excrétion de l'acide aminé dans le milieu de culture. En effet, les souches hyperproductrices appartenant au genre *Corynebacterium*, n'excrètent pas naturellement l'acide glutamique, un stress doit leur être appliqué pour induire le processus d'excrétion. A l'échelle industrielle, les moyens les plus utilisés sont la limitation en biotine (caractéristique commune à l'ensemble des corynébactéries) et l'ajout d'un ou plusieurs tensioactifs. Selon les souches d'autres modes d'induction existent tels que la limitation en acide oléique,

l'ajout de pénicilline, l'augmentation de température... Ce processus se doit bien sûr d'être optimisé selon la souche utilisée.

La seconde voie d'amélioration de la production d'acide aminé par voie microbienne porte sur le biocatalyseur. Elle consiste à identifier avec précision la voie de biosynthèse de l'acide aminé et à modifier le métabolisme du micro-organisme en utilisant le plus souvent des moyens génétiques. Les modifications doivent permettre de favoriser et d'accroître, de façon la plus spécifique possible, la synthèse et l'excrétion de l'acide aminé dans le milieu de culture.

L'objectif du travail présent est d'illustrer les potentialités des deux voies d'amélioration sur deux acides aminés produits par *C. glutamicum* : l'acide glutamique et la valine, et ce, à partir de données bibliographiques et expérimentales. Pour les deux acides aminés, l'amélioration recherchée est simplement l'accroissement de la concentration finale en acide aminé.

MATERIEL ET METHODE

LES SOUCHES

Les souches utilisées au cours de ce travail sont les souches *C. glutamicum* 2262, hyperproductrice d'acide glutamique, qui nous a été fournie par la société ORSAN-AMYLUM et *C. glutamicum* 2262(pMF5), souche présentant une amplification de l'activité enzymatique phosphoénolpyruvate carboxylase (DELAUNAY *et al.*, 1998).

LES MODES DE CULTURE

Pour toutes les cultures qui ont été menées au cours de cette étude, le milieu utilisé est le milieu MCGC dans lequel le citrate a été remplacé par de la déféroxamine. La seule source de carbone présente dans ce milieu de culture est le glucose. Le mode de culture utilisé est un semi-continu de 24 h au cours duquel l'excrétion de l'acide glutamique est induite (DELAUNAY *et al.*, 1999).

Trois méthodes d'induction ont été testées :

- la limitation en biotine. La concentration initiale de cette vitamine est de 20 µg/l. Lors de sa croissance la bactérie consomme ce métabolite et lorsque la concentration en biotine atteint 3 µg/l, l'excrétion de l'acide glutamique débute (TAKINAMI *et al.*, 1966).
- l'ajout de tensioactif (Tween 40). Lorsque la concentration en biomasse atteint 5,6 g/l, 2,5 g/l de Tween 40 sont ajoutés dans le milieu de culture provoquant instantanément le début de l'excrétion de l'acide glutamique.
- l'élévation de la température du milieu de culture. La température du milieu de culture qui initialement est fixée à 33°C, est portée à 39°C lorsque la concentration en biomasse atteint 5,6 g/l. Cela se traduit par une excrétion immédiate d'acide glutamique.

METHODES D'ANALYSE

La concentration en biomasse est obtenue par mesure de la densité optique à 570 nm et par la méthode des poids secs. La concentration extracellulaire en glutamate est déterminée par kit enzymatique (Boehringer Mannheim, Allemagne).

RESULTATS

AMELIORATION DU PROCEDE : EXEMPLE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE

la souche *C. glutamicum* 2262 est capable de produire de l'acide glutamique suite à l'application d'au moins trois types de stress : la limitation en biotine, l'ajout de tensioactif dans le milieu de culture ou encore l'élévation de la température du milieu de culture. Afin d'identifier le mode d'induction le plus approprié pour obtenir la concentration finale en acide glutamique la plus élevée possible, ces trois modes d'induction ont été appliqués à cette souche hyperproductrice (fig. 1).

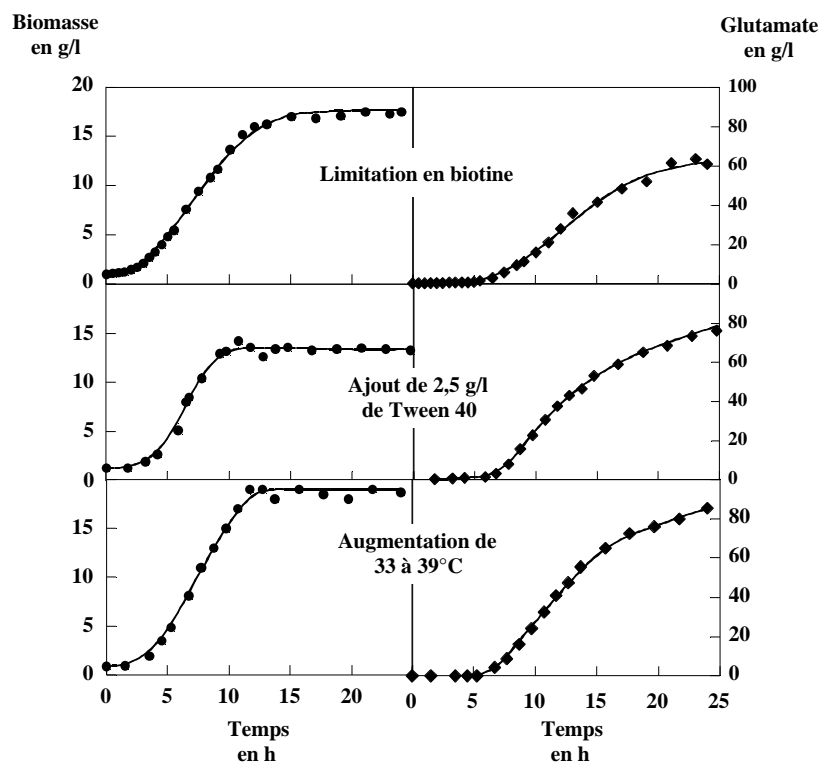


Figure 1 : Evolution des concentrations en biomasse et en glutamate obtenues avec *C. glutamicum* 2262 lors de cultures semi-continues utilisant 3 modes

d'induction de l'excrétion de l'acide glutamique : la limitation en biotine, l'ajout de tensioactif (Tween 40) et l'augmentation de température.

Les concentrations finales en biomasse obtenues sont de 17, 13 et 19 g/l pour, respectivement, la limitation en biotine, l'ajout de Tween 40 et l'augmentation de température. En ce qui concerne la production d'acide glutamique, le procédé le plus performant en terme de concentration finale d'acide aminé s'avère être celui lors duquel l'excrétion est induite par l'élévation de la température du milieu de culture avec 85 g/l. 62 et 78 g/l sont obtenus suite à, respectivement, une limitation en biotine et un ajout de Tween 40.

AMELIORATION DU BIOCATALYSEUR

Exemple de l'acide glutamique

La voie de biosynthèse de l'acide glutamique chez *C. glutamicum* est maintenant bien identifiée. Plusieurs études se sont attachées ces dernières années à l'identification au sein de celle-ci des étapes enzymatiques potentiellement limitantes pour la production d'acide glutamique. Il est notamment apparu que la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPc), enzyme appartenant au groupe des enzymes anapérotyques (enzymes permettant l'approvisionnement du cycle de Krebs en molécules à 4 atomes de carbone) pouvait constituer une étape limitante (KUEHM, 1996). Afin de vérifier cette hypothèse, une souche présentant une activité PEPc accrue a été construite à l'aide d'outils génétiques. La figure suivante présente une comparaison de la production d'acide glutamique, lors du procédé avec élévation de la température du milieu de culture, avec la souche non modifiée, *C. glutamicum* 2262 ainsi qu'en utilisant la souche génétiquement modifiée, *C. glutamicum* 2262(pMF5).

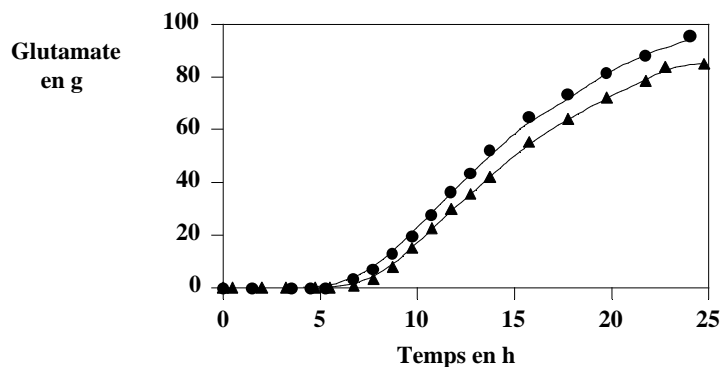


Figure 2 : Evolution de la concentration en glutamate lors de cultures semi-continues avec élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C avec les souches *C. glutamicum* 2262 (●) et *C. glutamicum* 2262(pMF5) (▲)

Aucune différence significative n'est observée entre les 2 souches pour ce qui est de la concentration finale en acide glutamique obtenue. 95 g soit 85 g/l ont été produits en 24 h par *C. glutamicum* 2262 alors que la souche *C. glutamicum* 2262(pMF5) a permis la production de 85 g soit 80 g/l.

Exemple de la valine

Depuis février 2001, nos laboratoires sont associés à un projet pluridisciplinaire réunissant plusieurs équipes européennes (VALPAN project). L'objectif est d'améliorer la production de valine et d'acide pantothénique par la souche *C. glutamicum* ATCC13032. La voie de biosynthèse de ces deux molécules est bien identifiée (Fig. 3). La synthèse de la valine et du pantothénate est en compétition avec celle de l'isoleucine. En effet, 4 enzymes sont communes à la synthèse de ces trois métabolites. Seule l'utilisation d'un -cétobutyrate en lieu et place d'un pyruvate par l'acétohydroxyacide synthétase (IlvBN) conditionne la synthèse d'isoleucine à la place de la valine.

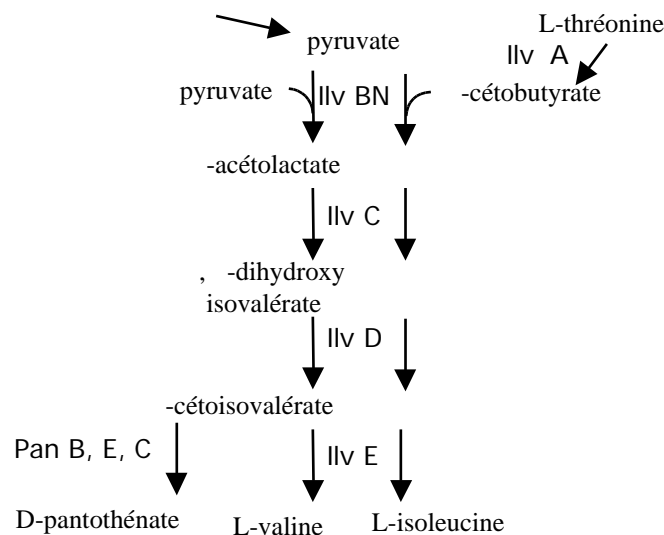


Figure 3 : voie simplifiée de la biosynthèse de la valine chez *C. glutamicum* ATCC13032 (IlvA : thréonine déshydratase ; IlvBN : acétohydroxyacide synthétase ; IlvC : acétohydroxyacide isoméroréductase ; IlvD : dihydroxyacide déshydratase ; IlvE : glutamate ou alanine transaminase ; PanB : cétopantoate hydroxyméthyltransférase ; PanE : cétopantoate réductase ; PanC : pantothénate synthétase).

Des travaux préliminaires ont porté sur la modification génétique du biocatalyseur (SAHM et EGGELING, 1999). Avec chacune des souches construites, des tests de production ont été réalisés (pour l'instant en fiole

d'Erlenmeyer, sans aucune optimisation). Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau suivant.

Modifications apportées	Valine produite (g/l)
aucune	0,1
amplification IlvBN	5,3
amplification IlvBN et IlvD	5,8
amplification IlvBN et IlvD + élimination de IlvA	9,4

Tableau 1 : concentrations finales en valine obtenues après modification génétique de la souche *C. glutamicum* ATCC 13032 (d'après SAHM et EGGELING, 1999)

DISCUSSION

AMELIORATION DU PROCEDE

L'action précise des différents modes d'induction de l'excrétion de l'acide glutamique est encore mal connue. Néanmoins, sur une même souche, la concentration de glutamate obtenue peut varier fortement selon celui qui est employé. En ce qui concerne *C. glutamicum* 2262, une augmentation de 35% de la concentration finale en acide glutamique (de 62 à 85 g/l) peut être obtenue en modifiant simplement la nature du stress appliqué pour obtenir l'excrétion et ce, sans modifier le métabolisme du biocatalyseur.

Des variations sont également mesurées au niveau de la concentration finale en biomasse (fig. 1). Il a précédemment été supposé qu'il était nécessaire de ralentir la croissance afin de favoriser la production de glutamate (DUBREUIL, 1985). Néanmoins, lors des essais menés avec *C. glutamicum* 2262, il est à noter que la plus forte concentration en acide glutamique (85 g/l) est obtenue simultanément à la concentration en biomasse la plus élevée (19 g/l).

AMELIORATION DU BIOCATALYSEUR

Cette voie est aujourd'hui celle qui tend à être prédominante lors de la mise en place de stratégies d'amélioration de productions utilisant des micro-organismes. De nombreux exemples d'accroissements spectaculaires peuvent être relevés dans la littérature. L'amélioration de la production de la valine par *C. glutamicum* ATCC 13032 fait partie de ces derniers. En effet, des modifications génétiques ont permis de multiplier par un facteur 94 la concentration de valine produite chez une souche sauvage (non modifiée génétiquement). A l'inverse, aucune amélioration n'a été observée suite à la modification du métabolisme de la souche *C. glutamicum* 2262, productrice d'acide glutamique. Cette disparité entre les résultats peut trouver son explication dans la différence qui existe au niveau des capacités de production des souches sauvages. Dans le cas de la valine, la souche non modifiée génétiquement n'excrète quasiment pas d'acide aminé (0,1 g/l), par contre dans le cas de l'acide glutamique, la souche sauvage est capable d'en produire 85 g/l. Il semble donc qu'il soit beaucoup plus difficile d'améliorer un biocatalyseur

lorsque celui-ci permet préalablement une forte production. Certaines données de la littérature vont également dans ce sens. Ainsi, chez *C. glutamicum* ATCC 13032, la production d'acide glutamique a pu être multipliée par 7 suite à l'amplification de l'activité pyruvate carboxylase (PETERS-WENDISCH *et al.*, 2001). Mais dans ce cas précis, la souche sauvage ne produisait que 1 g/l d'acide glutamique ce qui est très loin des performances d'une souche hyperproductrice.

Chez une souche hyperproductrice, le métabolisme est déjà « naturellement » orienté vers la synthèse d'un métabolite. Les différentes étapes enzymatiques impliquées dans la voie de biosynthèse de ce dernier se trouvent, pour la plupart, proches de leur activité optimale. Pour espérer une amélioration de la production, il faut donc identifier les quelques étapes limitantes. Aujourd'hui, l'identification de ces dernières reste délicate malgré l'aide apportée par les modèles mathématiques mimant le métabolisme de certaines souches d'intérêt industriel.

CONCLUSIONS

Des améliorations peuvent être apportées à une production d'acide aminé par voie microbienne en modifiant soit le procédé soit le métabolisme de la souche productrice. Cette dernière voie apporte des résultats souvent spectaculaires surtout lorsque la souche utilisée n'est pas un micro-organisme hyperproducteur. Cependant, il ne faut pas chercher à opposer les deux voies d'amélioration précitées et à rechercher la « meilleure ». Ces deux approches sont complémentaires. Le plus souvent, le procédé mettant en œuvre une souche modifiée génétiquement doit être revu afin d'exploiter au maximum les capacités de la nouvelle souche. C'est pour cette raison que les nouveaux projets d'amélioration de production de métabolites tels que « VALPAN project » sont pluridisciplinaires et utilisent des compétences provenant, entre autres, du génie génétique, du génie biochimique et de la bioinformatique.

BIBLIOGRAPHIE

- DELAUNAY S., BAUCHER M.-F., ENGASSER J.-M., GUYONVARCH A. , GOERGEN J.-L., 1998 – Une application du génie métabolique : étude et modification de la micro-usine *Corynebacterium glutamicum*. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, **12**, 62, 75-80.
- DELAUNAY S., GOURDON P., LAPUJADE P., MAILLY E., ORIOL E., ENGASSER J.-M., LINDLEY N. D., GOERGEN J.-L., 1999 – An improved temperature triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enz. Microb. Technol.*, **25**, 762-768.
- DUBREUIL P, 1985 – Cinétiques et modélisation de la fermentation glutamique. Thèse INPL-Nancy.
- KUEHM N., 1996 – Modélisation cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* : croissance et production de glutamate sous stress osmotique. Thèse INPL-Nancy.

- PETERS-WENDISCH P.G., SCHIEL B., WENDISCH V. F., KATSOULIDIS E., MOCKEL B., SAHM H., EIKMANNS B. J., 2001 – Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 295-300.
- SAHM H., EGGELING L, 1999 – D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1973-1979.
- TAKINAMI K., YAMADA Y., OKADA H., 1966 – Biochemical effects of fatty acids and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 674-682.