



**HAL**  
open science

# Etude des potentialités de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir de graisses de canard par la souche *Pseudomonas putida* KT2440

Nicolas Andin

► **To cite this version:**

Nicolas Andin. Etude des potentialités de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir de graisses de canard par la souche *Pseudomonas putida* KT2440. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Toulouse, 2016. Français. NNT : 2016ISAT0056 . tel-03652648

**HAL Id: tel-03652648**

**<https://theses.hal.science/tel-03652648>**

Submitted on 26 Apr 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Nicolas ANDIN**

le lundi 19 décembre 2016

**Titre :**

Etude des potentialités de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir de graisses de canard par la souche *Pseudomonas putida* KT2440

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED SEVAB : Ingénieries microbienne et enzymatique

**Unité de recherche :**

LISBP - UMR 5504 et 792 CNRS-INRA-INSA de Toulouse

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

M. Jean-Louis URIBELARREA

**Jury :**

Mme. Catherine BEAL	Professeur AgroParisTech, Paris	Rapporteur
M. Pierre FONTANILLE	Maître de conférences PolyTech, Clermont-Ferrand	Rapporteur
M. Stéphane DELAUNAY	Professeur ENSAIA, Nancy	Examineur
Mme. Carole MOLINA-JOUE	Professeur INSA, Toulouse	Examineur
M. Antoine LONGIERAS	Responsable R&D VEGEPLAST SAS, Bazet	Invité
M. Jean-Louis URIBELARREA	Professeur INSA, Toulouse	Directeur de thèse

CONFIDENTIEL

# CONFIDENTIALITE

« © Tous droits réservés. Ce document, dans son contenu et dans sa forme, est strictement confidentiel et il est la propriété de VEGEPLAST SAS. Toute utilisation, reproduction, modification, communication à un tiers ou représentation intégrale ou partielle du présent document qui n'a pas été préalablement expressément autorisée par VEGEPLAST SAS est formellement interdite. Une telle utilisation, reproduction, modification, communication ou représentation non autorisée, par quelque moyen que ce soit, constituerait une atteinte aux droits de VEGEPLAST SAS et une contrefaçon sanctionnée par la loi aux plans pénal et civil ».

“© All rights reserved. The content and form of this document is VEGEPLAST SAS's property and is strictly confidential. It is strictly prohibited to use, copy, modify, disclose or perform this document in full or in part without prior written authorization from VEGEPLAST SAS. Any such unauthorized use, copying, modification, disclosure or performance, in any way or manner whatsoever, shall qualify as a breach of VEGEPLAST SAS's rights and an infringement punishable by criminal and civil law.”

CONFIDENTIEL

---

**NOM :** Andin

**Prénom :** Nicolas

**Intitulé de la thèse :** Etude des potentialités de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir de graisses de canard par la souche *Pseudomonas putida* KT2440

**Année :** 2016

**Nombre de pages :** 186

**Spécialité :** Ingénieries Enzymatique et Microbienne

**Lieu :** INSA Toulouse

---

**Résumé :**

L'étude porte sur l'accumulation de bio-polymères de réserve (PolyHydroxyAlcanoates ou PHA) par la souche *Pseudomonas putida* KT2440, à partir de graisses de canard. Les potentialités de production de cette souche ont tout d'abord été quantifiées sur les substrats simples composant ce composé lipidique, à savoir les acides gras libres et le glycérol. La caractérisation cinétique et stœchiométrique de cultures en mode discontinu alimenté (Fed-batch) sur chacun de ces substrats a été réalisée en induisant la production de PHA couplée à une croissance résiduelle sous apport limitant d'azote. Par cette stratégie, il a été possible, à partir d'acides gras seuls, d'optimiser l'utilisation du carbone et de l'énergie intracellulaire afin d'atteindre un rendement expérimental de carbone global de  $0,7 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ .

L'ensemble des connaissances acquises par cette étude concernant la physiologie de production de PHA via le catabolisme des acides gras et de la voie de leur biosynthèse a permis de mettre en lumière des points de fonctionnements optimaux pour l'accumulation à fort titre de PHA à moyennes chaînes latérales (6 à 14 carbones) à partir d'acides gras et/ou de glycérol :

- A partir d'un mélange mixte acides gras-glycérol dans un rapport carbone d'alimentation de  $0,15 \text{ Cmole}_{\text{Glycérol}} \cdot \text{Cmole}_{\text{AcidesGras}}^{-1}$  représentatif des graisses de canard, des vitesses spécifiques de production de PHA maximales voisines de  $0,1 \text{ Cmole.Cmole}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ont été atteintes pour des taux de croissance résiduels de  $0,15 \text{ h}^{-1}$  alors qu'il semble préférable de maintenir des taux de croissance inférieurs à  $0,05 \text{ h}^{-1}$  pour favoriser l'accumulation intracellulaire de polymères.
- Sur glycérol, l'accumulation intracellulaire des PHA, leur vitesse spécifique de production ainsi que le rendement de conversion peuvent être optimisées concomitamment pour des taux de croissance proches de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ , bien que les performances de production soient moindres que celle observées sur acides gras.

Ces résultats ont permis d'effectuer une étude de faisabilité d'un procédé de production sur graisses de canard. La mise en œuvre, couplant hydrolyse enzymatique du substrat par des lipases commerciales, et synthèse de PHA a conduit à la production de  $53 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse totale contenant  $43,3\% \text{ g.g}^{-1}$  de PHA.

Il a été possible d'établir certaines relations entre les caractéristiques de culture pour la production de PHA et les propriétés physico-chimiques des polymères finaux. Des polymères plus ou moins cristallins sont obtenus en fonction de la voie métabolique empruntée, la voie de néo-synthèse des acides gras à partir de glycérol conduisant à un produit plasturgiquement opérable. Les PHA ayant les taux de monomères insaturés les plus faibles ( $<12\% \text{ mole.mole}^{-1}$ ) et une dispersion faible de longueur de chaîne au sein de leur composition ont le degré de cristallinité le plus important. Ils adoptent l'aspect d'un film élastique très intéressant, après extraction. A l'inverse, les polymères riches en motifs insaturés et au profil plus dispersé en monomères ont l'aspect d'une pâte collante non maniable amorphe limitant son intérêt industriel en l'état.

---

**Mots clés :** *Pseudomonas putida* KT2440 ; Polyhydroxyalcanoates à moyennes chaînes (MCL-PHA) ; Acides Gras ; Fed-batch

CONFIDENTIEL

---

**Last Name :** Andin

**First Name :** Nicolas

**Thesis title :** Polyhydroxyalkanoates (PHA) production potentiality study from duck fats by *Pseudomonas putida* KT2440

**Year :** 2016

**Number of pages :** 186

**Specialty :** Enzymatic and Microbial Engineering

**Place :** INSA Toulouse

---

## Abstract

PolyHydroxyAlkanoates (PHA) production by the strain *Pseudomonas putida* KT2440, from duck fats has been investigated. The first studies were realized on model substrates such as glycerol and fatty acids, composing this lipid compound. The kinetic and stoichiometric characterizations of Fed-Batch mode cultivations on each of these substrates were performed by inducing PHA production coupled to a residual growth monitored by the nitrogen feeding. Through this strategy from fatty acids, it succeeds to optimize the intracellular carbon and energy distribution reaching an overall carbon yield of 0.7 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>.

All acquired knowledges from these studies concerning the PHA production physiology through  $\beta$ -oxidation and *de novo* fatty acids biosynthesis pathways, highlighted many optimal parameters for the accumulation of high titers of medium chain length polyhydroxyalkanoates (MCL-PHA) (6 to 14 carbons) from fatty acids and/or glycerol :

- From a mix of fatty acids-glycerol in a ratio of 0.15 Cmole<sub>Glycerol</sub>.Cmole<sub>FattyAcids</sub><sup>-1</sup> representatives of duck fats, maximal specific PHA production rate equal to 0.1 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> at specific residual growth rate of 0.15 h<sup>-1</sup> were reached while it seems better to maintain specific residual growth rates lower than 0.05 h<sup>-1</sup> to optimize the polymers intracellular accumulation.
- From glycerol, the intracellular PHA accumulation, their specific production rate and the conversion yield could be optimized concomitantly at specific growth rate close to 0.01 h<sup>-1</sup> although the production performances were lower than those observed from fatty acids.

These elements allowed to the establishment of feasibility study of a PHA production process with duck fats as substrate. The implementation, coupling enzymatic hydrolysis by commercial lipases and PHA synthesis led to the production of 53 g.L<sup>-1</sup> of total biomass containing 43.3% g.g<sup>-1</sup> of polymers.

It was possible to establish some relationships between the culture characteristics for the PHA production and the physicochemical properties of the final polymers. More or less crystalline polymers were obtained function of the metabolic pathways used, *de novo* fatty acids biosynthesis pathways from glycerol leading to a practical product. PHA with the lowest unsaturated monomers fraction (<12% mole.mole<sup>-1</sup>) and a weak dispersion of the monomers chain length have the highest degree of crystallinity. They adopt the appearance of a very interesting elastic film after extraction. Conversely, polymers with a high unsaturated monomers fraction and more dispersed monomers profile resemble unmanageable amorphous sticky dough, with a limited industrial interest.

---

**Keywords :** *Pseudomonas putida* KT2440 ; Medium chain length polyhydroxyalkanoates (MCL-PHA) ; Fatty Acids ; Fed-batch

CONFIDENTIEL

## SOMMAIRE

---

<b>NOMENCLATURE .....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>26</b>
<b>ETAT DE L'ART .....</b>	<b>29</b>
<b><u>I- Description et propriétés des Poly-<math>\beta</math>-Hydroxyalcanoates .....</u></b>	<b>29</b>
I.1 Définition et structure .....	29
I.2 Propriétés .....	30
I.2.1 Biodégradabilité.....	30
I.2.2 Propriétés mécaniques.....	31
I.3 Structure des inclusions .....	32
I.4 Applications .....	33
<b><u>II- Procédé général de production de PHA.....</u></b>	<b>34</b>
II.1. Synthèse de la biomasse catalytique et production de PHA en bioréacteurs.....	35
II.1.1 Culture discontinue : Batch.....	35
II.1.2 Culture discontinue alimentée : Fed-batch .....	35
II.1.3 Culture continue : chémostat .....	36
II.2. Récupération des PHA.....	36
<b><u>III- <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 et son métabolisme.....</u></b>	<b>38</b>
III.1 Métabolisme des carbohydrates .....	40
III.2 Métabolisme des acides gras .....	41
III.2.1 Voie de dégradation des acides gras : la $\beta$ -oxydation .....	41
III.2.2 Voie de biosynthèse des acides gras.....	42
III.3 Métabolisme du glycérol.....	42
III.4 Métabolisme central de <i>P. putida</i> KT2440.....	43
III.5 Chaînes respiratoires de <i>P. putida</i> KT2440.....	44
III.6 Métabolisme de production des PHA.....	45
III.6.1 Voies de biosynthèse de PHA chez <i>P. putida</i> KT2440 .....	45
III.6.2 Dégradation des PHA.....	47
III.6.3 Equilibre Biosynthèse-Dégradation des PHA .....	47

III.7 Initiation et régulation de l'accumulation de PHA.....	47
III.7.1 Limitation en oxygène.....	48
III.7.2 Limitation en azote ou phosphore .....	48
III.7.3 Régulation enzymatique des PHA.....	49
III.7.4 Régulation transcriptionnelle.....	49
III.8 Poids moléculaire des PHA et ses facteurs d'influence .....	50
<b><u>Conclusion</u></b> .....	<b>51</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES</b> .....	<b>52</b>
<b><u>I- Réalisation des cultures</u></b> .....	<b>52</b>
I.1 Souche.....	52
I.2 Milieux de culture .....	52
I.2.1 Milieu de culture solide.....	52
I.2.2 Milieu de culture liquide.....	52
I.3 Conditions de culture .....	58
I.3.1 Etapes d'inoculations .....	58
I.3.2 Culture en fermenteur de 20 L.....	58
<b><u>II-Techniques analytiques</u></b> .....	<b>63</b>
II.1 Méthode de suivi et d'analyse des substrats d'une culture .....	63
II.1.1 Dosage des acides gras .....	63
II.1.2 Dosage du glycérol et du glucose par CLHP.....	64
II.1.3 Dosage du glucose .....	64
II.2 Méthode de suivi et d'analyse de la biomasse de la culture .....	65
II.2.1 Biomasse totale.....	65
II.2.2 Détermination de la composition macromoléculaire de la biomasse.....	65
<b><u>III- Traitements des données expérimentales</u></b> .....	<b>67</b>
III.1 Généralités sur les bilans .....	67
III.2 Traitement des gaz.....	68
III.2.1 Bilan pour un composé A présent dans le gaz.....	68
III.2.2 Bilan sur l'azote.....	69
III.2.3 Bilan sur l'oxygène .....	70
III.2.4 Bilan sur le dioxyde de carbone .....	70

III.3 Traitement de la variable « Volume » .....	72
III.4 Calcul des vitesses spécifiques et des rendements .....	73
III.5 Bilans élémentaires.....	74
III.5.1 Bilan Carbone.....	75
III.5.2 Bilan élémentaire généralisé ou bilan redox .....	75
III.5.3 Validation des mesures par l'utilisation des équations bilan élémentaires.....	76
III.6 Lissage des données expérimentales .....	76
<b><u>IV- Modélisation des flux</u></b> .....	<b>76</b>
IV.1 Descripteur anabolique.....	76
IV.2 Descripteur catabolique.....	77
IV.3 Résolution .....	77
<b><u>V- Extraction et caractérisation des produits</u></b> .....	<b>77</b>
V.1 Méthode d'extraction des PHA .....	77
V.2 Caractérisation des PHA par Chromatographie à Perméation de gel .....	79
V.3 Caractérisation des propriétés thermiques des PHA par Analyses Enthalpiques Différentielles .....	79
<b>RESULTATS</b> .....	<b>81</b>
<b>A- Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez <i>P. putida</i> KT2440.....</b>	<b>81</b>
<b><u>Nomenclature</u></b> .....	<b>81</b>
<b><u>Introduction</u></b> .....	<b>83</b>
<b><u>I. Publication: Improving carbon and energy distribution by coupling growth and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from fatty acids by <i>P. putida</i> KT2440.....</u></b>	<b>84</b>
I.1 Abstract .....	84
I.2 Introduction.....	84
I. 3 Materials and methods .....	86
I.3.1 Micro-organism.....	86
I.3.2 Seed cultures .....	86
I.3.3 Bioreactor and operating parameters .....	86
I.3.4 Culture strategy .....	86

I.3.5 Analytical methods .....	87
I.3.6 Chemicals compounds .....	87
I.3.7 Metabolic flux calculation .....	88
I. 4 Results and discussion .....	89
I. 4.1 Theoretical approach.....	89
I. 4.2 Experimental results.....	91
I. 5 Conclusion .....	98
<b><u>II. Synthèse des résultats.....</u></b>	<b>99</b>
<b>B- Etudes des potentialités de production de PHA par <i>P. putida</i> KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras .....</b>	<b>100</b>
<b><u>Introduction .....</u></b>	<b>100</b>
<b><u>I- Conditions opératoires en culture discontinu de type décélérostat et analyses cinétiques .....</u></b>	<b>102</b>
I.1 Description de la stratégie.....	102
I.2 Détermination de la corrélation entre la vitesse spécifique de production de PHA et le taux de croissance à partir de glycérol.....	106
I.2.1 Objectif de la culture B .....	106
I.2.2 Conduite de la culture B.....	106
I.2.3 Analyse des performances finales de la culture B.....	108
I.2.4 Analyse des cinétiques de la culture B.....	110
I.3 Détermination de la corrélation entre la vitesse spécifique de production de PHA et le taux de croissance à partir de glycérol et d'acides gras.....	114
I.3.1 Objectif de la culture C .....	114
I.3.2 Conduite de la culture C.....	115
I.3.3 Analyse des performances finales de la culture C.....	117
I.3.4 Analyse des cinétiques de la culture C.....	118
I.4 Détermination de la corrélation entre la vitesse spécifique de production de PHA et le taux de croissance à partir d'acides gras à 37°C.....	120
I.4.1 Objectif de la culture D .....	120
I.4.2 Conduite de la culture D .....	121
I.4.3 Analyse des performances finales de la culture D .....	123
I.4.4 Analyse des cinétiques de la culture D .....	124
<b><u>II. Discussion.....</u></b>	<b>130</b>
<b><u>III. Synthèse des résultats.....</u></b>	<b>136</b>

<b>C- Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits.....</b>	<b>137</b>
<b><u>Introduction</u> .....</b>	<b>137</b>
<b><u>I- Analyse des paramètres responsables du profil monomérique des PHA produits.....</u></b>	<b>137</b>
I.1 Influence du substrat carboné sur le profil monomérique des PHA produits .....	137
I.2 Influence de la PHA synthase sur le profil de PHA obtenus à partir d'acide gras.....	141
I.2.1 Stratégie de la Culture F.....	141
I.2.2 Effet de l'acide acrylique sur la culture de production de PHA.....	142
<b><u>II- Propriétés des polymères produits</u> .....</b>	<b>147</b>
II.1 Caractérisation des polymères .....	147
II.2 Formulation au cours de l'extraction.....	148
<b><u>III- Discussion</u>.....</b>	<b>150</b>
<b><u>IV- Synthèse des résultats</u>.....</b>	<b>155</b>
<b>D- Production de PHA à partir de graisses de canard : Etude de faisabilité.....</b>	<b>156</b>
<b><u>I. Introduction</u>.....</b>	<b>156</b>
<b><u>II. Hydrolyse enzymatique</u>.....</b>	<b>156</b>
<b><u>III. Couplage de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation : Culture G</u> .....</b>	<b>159</b>
III.1 Stratégie de la culture G .....	159
III.2 Résultats de la culture G.....	160
III.3 Traitement du mout final .....	163
<b><u>IV. Discussion</u> .....</b>	<b>164</b>
<b><u>V. Synthèse des résultats</u>.....</b>	<b>165</b>
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>166</b>
<b>TABLES DES ANNEXES .....</b>	<b>181</b>

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma représentant les caractéristiques des matériaux plastiques .....	27
Figure 2 : Structure générale des PHA (Sang Yup Lee, 1996) .....	29
Figure 3 : Diversité des monomères de MCL-PHA productibles (Zinn et al. 2001).....	30
Figure 4 : Représentation d'une inclusion de PHA (Zinn et al. 2001) .....	32
Figure 5 : Schéma représentant les trois modèles de biogenèse des granules de PHA (Jendrossek, 2009; Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Pötter & Steinbüchel, 2006 ; Stubbe & Tian, 2003).....	33
Figure 6 : Représentation des différents domaines d'applications des PHA (G. Chen, 2010).....	33
Figure 7 : Schéma du procédé général de production de PHA.....	34
Figure 8 : Catabolisme des carbohydrates, glycérol et acides gras par <i>P. putida</i> KT2440 (d'après (Chavarría, Kleijn, Sauer, Pflüger-grau, & Lorenzo, 2012; de Eugenio et al., 2010; Dirusso & Black, 2004; Ebert, Kurth, Grund, Blank, & Schmid, 2011; Escapa et al., 2012; G. N. Huijberts, Eggink, de Waard, Huisman, & Witholt, 1992; Latour & Lemanceau, 1998; I Poblete-Castro et al., 2012; Rehm & Mitsky, 2001; Schulz, 1991).....	39
Figure 9 : Schéma représentant la perméase PTS pour le fructose (Chavarría et al. 2012).....	40
Figure 10 : Schéma de la voie des pentoses phosphates chez <i>P. putida</i> (Ebert et al. 2011).....	43
Figure 11 : Schéma représentant le découplage entre la génération d'ATP et de NADH chez <i>P. putida</i> (Ebert et al. 2011) .....	44
Figure 12 : Schéma représentant la chaîne respiratoire. Source Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Ressource électronique] KEGG PATHWAY, disponible sur <a href="http://www.genome.jp/kegg/pathway.html">http://www.genome.jp/kegg/pathway.html</a> , Oxidative phosphorylation.....	45
Figure 13 : Représentation de l'opéron PHA contenant les gènes codant pour les enzymes et protéines impliquées dans la synthèse des PHA et des inclusions chez <i>P. putida</i> KT2440 (de Eugenio et al. 2010) .....	46
Figure 14 : Schéma représentant le cycle de couplage de la synthèse et de la dégradation des PHA (de Eugenio et al. 2010; Escapa et al. 2012; Ren et al. 2009).....	47
Figure 15 : Influence du rapport C/N sur la concentration en biomasse catalytique et PHA en chemostat à un taux de dilution $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ (G N M Huijberts & Eggink, 1996).....	49
Figure 16: Etapes de propagations.....	58
Figure 17 : Dispositif expérimental : fermenteur de 20 L.....	59

<i>Figure 18 : Schéma général du fermenteur en mode Fed-batch et de son environnement</i> .....	60
<i>Figure 19 : représentation des modes de consigne des pompes péristaltiques disponibles grâce au programme de gestion de l'alimentation du réacteur (Cescut, 2009)</i> .....	62
<i>Figure 20 : Chromatogramme type avec les temps de rétention des acides linoléiques, palmitique, oléiques et stéarique</i> .....	64
<i>Figure 21 : Mesure par CPG des MCL-PHA intracellulaires, principe de la méthanolyse</i> .....	66
<i>Figure 22 : Schéma du réacteur avec l'entrée et la sortie des gaz associées aux variables nécessaires au calcul des bilans gazeux</i> .....	68
<i>Figure 23 : Schéma représentant les différents composants d'un extracteur de Soxhlet</i> .....	78
<i>Figure 24: Medium chain length polyhydroxyalkanoate metabolism in P.putida KT2440 on fatty acids as the carbon source</i> .....	85
<i>Figure 25: Metabolic fluxes distribution in MCL-PHA production: conditions to maximize the production yield</i> .....	90
<i>Figure 26: Metabolic flux distribution to maximize the growth yield (fluxes in <math>\mu\text{mol.gXcat}^{-1}.\text{h}^{-1}</math>)</i> .....	91
<i>Figure 27: Time course of fed-Batch culture of P. putida KT2440 with fatty acids as carbon source at 30°C, pH 6.8</i> .....	92
<i>Figure 28: Effective growth yield determination on the only production phase (B) from the catalytic biomass quantity variation (<math>C_{\text{mole}}</math>) versus substrate minus carbon used as PHA quantity variation (<math>C_{\text{mole}}</math>)</i> .....	94
<i>Figure 29: Estimated acetyl-CoA and reduced cofactor consumption yields for growth necessary to reach effective growth yields</i> .....	96
<i>Figure 30 : Variation de la vitesse spécifique de production de PHA en fonction du niveau de limitation en oxygène chez R.eutropha avec le glucose comme substrat (Gaudin, 1998)</i> .....	100
<i>Figure 31 : Vitesse spécifique de production maximale de PHA en fonction du taux de croissance à partir d'acides gras volatils (Grousseau, 2012)</i> .....	101
<i>Figure 32 : Evolutions de <math>\Phi\text{N}_{\text{theo}}</math> (pointillés gris) et de <math>\Phi\text{N}_{\text{applied}}</math> (ligne continue noire) au cours de la phase de production de cultures en mode Fed-Batch</i> .....	104
<i>Figure 33 : Evolutions de <math>\mu(t)_{\text{theo}}</math> (pointillés gris) et de <math>\mu(t)_{\text{applied}}</math> (ligne continue noire) au cours de la phase de production de cultures en mode Fed-Batch</i> .....	104
<i>Figure 34 : Phase de croissance : suivi de l'évolution de la vitesse de production de <math>\text{CO}_2</math> (courbe grise), du temps de fonctionnement de la pompe affectée à la solution basique de correction du pH (courbe noire), et de la concentration résiduel en glycérol (carrés vides)</i> .....	106

<i>Figure 35 : Evolution de la régulation pH (tirets noirs : base ; courbe noire : acide), du pH (gris clair) et de la concentration résiduelle en glycérol (carrés vides) au cours de la phase de production de la culture B.....</i>	<i>108</i>
<i>Figure 36 : Evolution des variables macroscopiques : concentration en biomasse catalytique (carrés gris), PHA (ronds vides) et le pourcentage d'accumulation (triangles noires) au cours de la culture .....</i>	<i>109</i>
<i>Figure 37 : Evolutions des vitesses spécifiques de consommation du substrat (carrés noirs), de production de PHA (ronds vides) et de croissance (carrés gris) au cours de la culture B.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure 38 : Vitesses spécifiques de production de PHA (ronds vides) et de consommation du substrat (carrés noirs) en fonction du taux d'accroissement de la biomasse catalytique (<math>\mu</math>) lors de la culture B .....</i>	<i>111</i>
<i>Figure 39 : Schémas représentant la répartition du carbone dans la cellule à partir du glycérol en condition de production de PHA (<math>q_{FAS}</math> : la vitesse spécifique de biosynthèse des acides gras directement liée aux activités enzymatiques de l'acétyl-CoA carboxylase et du complexe FAS ; <math>q_{PHA}</math> : la vitesse spécifique de production de PHA dépendante des activités enzymatiques de la R-3-hydroxyacyl-(ACP-CoA) transférase et de la PHA synthase).....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 40 : Schéma des voies métaboliques de génération et d'utilisation de l'acétyl-CoA à partir des substrats glycérol et/ou acides gras .....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 41 : Récapitulatif du pilotage de la culture C en mode Fed-batch à partir des débits <math>Q_{NH3exp}</math> (courbe noire), <math>Q_{Glycérolexp}</math> (courbe gris foncée) et <math>Q_{AGexp}</math> (courbe gris claire) et de l'évolution de la concentration en substrats résiduels dans le milieu réactionnel (ronds gris : glycérol ; carrés vides : acides gras).....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 42 : Evolution de la part de biomasse catalytique synthétisée à partir du glycérol par rapport à la biomasse catalytique totale synthétisée.....</i>	<i>116</i>
<i>Figure 43 : Evolution des variables macroscopiques : concentration en biomasse catalytique (carrés gris), PHA (ronds vides) et le pourcentage d'accumulation (triangles noirs) au cours de la culture C .....</i>	<i>117</i>
<i>Figure 44 : Evolutions des vitesses spécifiques de consommation des substrats totaux (carrés noirs), du glycérol (triangles noirs), des acides gras (triangles blancs), de production de PHA (ronds vides) et de croissance (carrés gris) au cours de la phase de production de la culture C.....</i>	<i>119</i>
<i>Figure 45 : Vitesses spécifiques de production de PHA (ronds vides) et de consommation des substrats totaux (carrés noirs) en fonction du taux d'accroissement expérimental de la biomasse catalytique (<math>\mu</math>) lors de la culture C .....</i>	<i>119</i>
<i>Figure 46 : Suivi de la croissance de <i>P. putida</i> KT2440 à 30°C, 37°C et 40°C sur milieu minéral + glucose.....</i>	<i>121</i>

<i>Figure 47 : Récapitulatif du pilotage de la culture en mode Fed-batch à 37°C à partir des débits QNH3exp (courbe noire) et QAGexp et de l'évolution de la concentration en substrat résiduel dans le milieu réactionnel.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 48 : Evolution des variables macroscopiques : concentration en biomasse catalytique (carrés gris), PHA (ronds vides) et le pourcentage d'accumulation (triangles noirs) au cours de la culture</i>	<i>123</i>
<i>Figure 49 : Evolutions des vitesses spécifiques de consommation du substrat (carrés noirs), de production (ronds vides) et de croissance (carrés gris) au cours de la culture D.....</i>	<i>124</i>
<i>Figure 50 : Evaluation de l'effet de la température sur les cinétiques microbiennes. En haut, les vitesses spécifiques de consommation des acides gras à 30°C (losanges gris) et à 37°C (carrés noirs) en fonction du taux de croissance. En bas, les vitesses spécifiques de production de PHA à 30°C (triangles noirs) et à 37°C (ronds vides).....</i>	<i>125</i>
<i>Figure 51 : Schéma représentant le bilan sur le substrat acide gras dans le système du milieu réactionnel, avec QS le débit de substrat entrant, <math>\tau_{\text{transfert}}(t)</math> la constante temps dépendante caractérisant les phénomènes de transfert, <math>\tau_{\text{biologiques}}(t)</math> la constante temps dépendante caractérisant les phénomènes biologiques, <math>dAGLdt</math> la variation de la concentration en acides gras dans la phase liquide et <math>dAGddt</math> la variation de la concentration en acides gras dissous.....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 52 : Représentation des possibles évolutions relatives des phénomènes biologiques et de transfert en fonction de la température. En haut : cas d'une activation par la température de l'activité biologique. Au milieu : cas d'une altération par la température de l'activité biologique. En bas : cas où l'augmentation de la température n'a pas d'effet sur l'activité biologique. La courbe grise représente l'évolution de la vitesse spécifique maximale de consommation des acides gras de la souche (<math>qAGX</math>) et la noire, la vitesse de transfert des acides gras de la phase liquide à la phase dissoute (<math>qAGD</math>).....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 53 : Vitesses spécifiques de production de PHA (ronds vides) et de consommation du substrat (carrés noirs) en fonction du taux d'accroissement de la biomasse catalytique (<math>\mu</math>) pour la culture D129</i>	<i>129</i>
<i>Figure 54 : Vitesses spécifiques théoriques de production de PHA en fonction du taux d'accroissement de la biomasse catalytique (<math>\mu</math>) lors des cultures B (points noirs), C (tirets gris) et D (tirets noirs)...</i>	<i>130</i>
<i>Figure 55 : Vitesses spécifiques théorique de production de PHA en fonction du taux d'accroissement de la biomasse catalytique (<math>\mu</math>) lors de la culture C (ronds vides), d'après les données de Durner et al. 2000 sur octanoate (triangles gris) et les données de Huijberts et al. 1996 sur acide oléique (carrés noirs).....</i>	<i>131</i>
<i>Figure 56 : Evolution des vitesses spécifiques expérimentales (ronds vides) et théoriques (pointillés noirs) de production de PHA et du pourcentage d'accumulation limite de PHA (courbe noire) en fonction du taux de croissance résiduel pour la culture C.....</i>	<i>134</i>
<i>Figure 57 : Exemples de monomères de PHA pouvant être produits à partir d'acide oléique et linoléique.....</i>	<i>140</i>

<i>Figure 58 : Déviation des intermédiaires cataboliques des acides gras vers la production de PHA.</i>	141
<i>Figure 59 : Evolution de la vitesse de production de dioxyde de carbone (courbe noire) et de la concentration en inhibiteur ramenée à une unité de biomasse catalytique (courbe continue grise) au cours de la phase de croissance de la culture F</i>	143
<i>Figure 60 : Evolution de la vitesse de production de dioxyde de carbone (courbe noire) et de la concentration en inhibiteur ramenée à une unité de biomasse catalytique (courbe grise) au cours de la phase de croissance de la culture F</i>	144
<i>Figure 61 : Evolutions des vitesses spécifiques de consommation du substrat (carrés noirs), de production de PHA (ronds vides), de croissance (carrés gris) et de la concentration en inhibiteur ramenée à une unité de biomasse catalytique (courbe continue grise) au cours de la phase de production de la culture F</i>	144
<i>Figure 62 : Comparaison de la répartition du carbone entre la culture A (sans inhibiteur) et F (avec acide acrylique) lorsque le taux de croissance résiduel est compris entre 0.01 et 0.02 h<sup>-1</sup></i>	145
<i>Figure 63 : Profil monomérique au point final de la culture sur acide gras à 30°C avec (culture F - gris clair) ou sans (culture A - gris foncé) inhibiteur de la β-oxydation</i>	146
<i>Figure 64 : Evolution de l'enthalpie de fusion des polymères en fonction des parts relatives de PHA formés lors des cultures A et B</i>	149
<i>Figure 65 : Evolution de l'avancement de production de PHA en fonction du taux de croissance pour les cultures B (carrés gris) et C (losanges noirs)</i>	153
<i>Figure 66 : Suivi du pourcentage d'acides gras libres par rapport à la quantité d'acides gras totaux présents dans les graisses (carrés gris) au cours de l'hydrolyse enzymatique (résultats du CRITT Bio-Industrie)</i>	157
<i>Figure 67 : Photo de l'hydrolysats des graisses de canard à température ambiante</i>	157
<i>Figure 68 : Diagramme de phases du mélange acide oléique (OA) – acide palmitique (PA) construit à partir de résultats de DSC. S<sub>PA</sub> : Acide palmitique à l'état solide ; S<sub>OA(α)</sub> et S<sub>OA(γ)</sub> : Acide oléique solide sous les formes polymorphiques α et γ (Inoue et al. 2004)</i>	158
<i>Figure 69 : Evolution des concentrations résiduelles en glycérol (ronds gris) et acides gras (carrés gris), de la concentration en lipase multiplié par 10 (courbe grise) dans le milieu réactionnel, de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> (courbe noire) au cours de la culture</i>	160
<i>Figure 70 : Evolution des concentrations en biomasse catalytique (losanges gris), PHA (ronds vides), graisses accumulées (carrés noirs) et du pourcentage d'accumulation en PHA (triangles gris) au cours de la culture</i>	161
<i>Figure 71 : Vitesse spécifique de production de PHA à partir de graisses de canard au cours de la culture G</i>	162

*Figure 72 : Profils monomériques au point final de la culture C (colonnes blanches) et de la culture G (colonnes noires)..... 163*

CONFIDENTIEL

## TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Représentation des capacités de production en 2007 dans le monde et les capacités prédictives faites à l'époque pour les années 2010 et 2020 (Shen et al. 2009).....</i>	<i>34</i>
<i>Tableau 2 : Production de MCL-PHA par P. putida à partir de différents substrats en mode Fed-batch .....</i>	<i>35</i>
<i>Tableau 3 : Production de MCL-PHA par P. putida à partir de différents substrats en mode chémostat .....</i>	<i>36</i>
<i>Tableau 4 : Exemple de méthodes d'extraction par solvants (Jacquel et al., 2008; Kunasundari, 2011) .....</i>	<i>37</i>
<i>Tableau 5 : Motifs de 3-HA synthétisés par P. putida et les substrats nécessaires à leur obtention... ..</i>	<i>45</i>
<i>Tableau 6 : Composition du milieu riche LB solide.....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 7 : Composition du milieu riche LB liquide .....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 8: Composition en sels du milieu minéral initial pour atteindre 10 g.L<sup>-1</sup> de biomasse catalytique .....</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 9: Composition en sels du milieu minéral initial pour atteindre 3 g.L<sup>-1</sup> de biomasse catalytique .....</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 10 : Composition du milieu minéral en oligo-éléments.....</i>	<i>56</i>
<i>Tableau 11 : Composition de la solution saline.....</i>	<i>56</i>
<i>Tableau 12 : Composition lipidique des graisses de canard.....</i>	<i>57</i>
<i>Tableau 13 : Composition en acides gras lipidique des graisses de canard .....</i>	<i>57</i>
<i>Tableau 14 : Paramètres liés au fermenteur disponibles en ligne .....</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 15 : Paramètres liés aux balances disponibles en lignes .....</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 16 : Paramètres liés aux gaz disponibles en ligne .....</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 17: Comparison of PHA production with P. putida KT2440 from fatty acid in fed-Batch culture.....</i>	<i>92</i>
<i>Tableau 18: Kinetics parameters during the different steps of the Fed-Batch culture .....</i>	<i>92</i>
<i>Tableau 19: Anabolic demand of carbon and reduced cofactors at the experimental growth yield and effective growth yield.....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 20: Experimental carbon and cofactor distribution when growth and production occurs simultaneously.....</i>	<i>98</i>
<i>Tableau 21 : Coefficient respiratoire en fonction du substrat consommé en phase de croissance et de production .....</i>	<i>105</i>

<i>Tableau 22 : Récapitulatif des rendements carbonés expérimentaux obtenus lors de la culture B et les rendements énergétiques correspondant déterminés à l'aide du descripteur métabolique .....</i>	<i>109</i>
<i>Tableau 23 : Composition monomérique des PHA finaux produits lors de la culture B.....</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 24 : Estimations des flux d'acétyl-CoA et de lipides membranaires en fonction de <math>\mu</math>.....</i>	<i>113</i>
<i>Tableau 25 : Récapitulatif des rendements carbonés expérimentaux obtenus lors de la culture B et les rendements énergétiques correspondant déterminés à l'aide du descripteur métabolique .....</i>	<i>117</i>
<i>Tableau 26 : Composition monomérique des PHA finaux produits lors de la culture C.....</i>	<i>118</i>
<i>Tableau 27 : Comparaison des vitesses spécifiques de production de PHA à partir d'acides gras à 30°C entre la culture C en mode Fed-batch et la culture en mode chémostat de Huijberts et al. 1996 .....</i>	<i>120</i>
<i>Tableau 28 : Récapitulatif des rendements expérimentaux obtenus lors de la culture D.....</i>	<i>124</i>
<i>Tableau 29 : Composition monomérique des PHA finaux produits lors de la culture D.....</i>	<i>124</i>
<i>Tableau 30 : Récapitulatif des rendements expérimentaux obtenus lors des trois cultures.....</i>	<i>132</i>
<i>Tableau 31 : Récapitulatif des profils monomériques des polymères obtenus dans les cultures B, C et D.....</i>	<i>135</i>
<i>Tableau 32 : Récapitulatif des profils monomériques obtenus à partir de la voie de biosynthèse des acides gras.....</i>	<i>138</i>
<i>Tableau 33 : Récapitulatif des profils monomériques obtenus à partir du catabolisme des acides gras .....</i>	<i>139</i>
<i>Tableau 34 : Caractéristiques thermoplastiques et de composition de MCL-PHA produits au cours des différentes cultures de la thèse.....</i>	<i>147</i>
<i>Tableau 35 : Récapitulatif des formulations de MCL-PHA effectuées et compositions monomériques des produits finaux .....</i>	<i>148</i>
<i>Tableau 36 : Caractéristiques thermoplastiques des PHA après formulation.....</i>	<i>148</i>
<i>Tableau 37 : Caractéristiques thermomécaniques et de composition des MCL-PHA produits par des souches du genre Pseudomonas.....</i>	<i>151</i>
<i>Tableau 39 : Références des lipases testées pour l'hydrolyse des graisses de canard.....</i>	<i>156</i>

# NOMENCLATURE

## A

$AG^*$	<i>concentration saturante d'acides gras dissous (Cmole.L<sup>-1</sup>)</i>
$AG^d$	<i>concentration réelle d'acides gras dissous (Cmole.L<sup>-1</sup>)</i>
$AG^L$	<i>concentration réelle d'acides gras dans la phase liquide (Cmole.L<sup>-1</sup>)</i>
$AG_{conso}$	<i>concentration en acides gras consommés (Cmole.L<sup>-1</sup>)</i>
3-HHx	<i>Acide 3-hydroxyhexanoïque</i>
3-HO	<i>Acide 3-hydroxyoctanoïque</i>
3-HD	<i>Acide 3-hydroxydécanoïque</i>
3-HDD	<i>Acide 3-hydroxydodécanoïque</i>
3-HTD	<i>Acide 3-hydroxytétradécanoïque</i>

## C

$CMI$  *Concentration Minimale Inhibitrice (g.L<sup>-1</sup>)*

## D

$D.S$  *coefficient de transfert des acides gras dans l'eau prenant en compte la surface d'échange de ce transfert (h<sup>-1</sup>)*

$D$  *taux de dilution (h<sup>-1</sup>)*

## F

$F_{x_{cat}}^{fin}$  *facteur de multiplication théorique de la biomasse catalytique*

## I

$I_p$  *indice de polydispersité*

## **K**

$k_d$	<i>coefficient qualifiant la vitesse de consommation du substrat selon une cinétique de Monod</i>
$K_s$	<i>constante de dissociation du complexe enzyme-substrat</i>
$k_L a$	<i>coefficient volumique de transfert (<math>h^{-1}</math>)</i>

## **M**

$MM_X$	<i>masse molaire de la biomasse catalytique (<math>g_{X_{cat}} \cdot C_{mole}^{-1}</math>)</i>
$m$	<i>coefficient de maintenance (<math>\mu mole \cdot g_{X_{cat}}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>
$M_w$	<i>masse molaire moyenne en poids (kDa)</i>

## **O**

$OD$	<i>Densité Optique</i>
------	------------------------

## **Q**

$QR$	<i>quotient respiratoire</i>
$q_{Stot}$	<i>vitesse spécifique de consommation en substrat total (<math>C_{mole} \cdot C_{mole}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>
$q_{PHA}$	<i>vitesse spécifique de production de PHA (<math>C_{mole} \cdot C_{mole}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>
$q_{AG}$	<i>vitesse spécifique de consommation des acides gras (<math>C_{mole} \cdot C_{mole}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>
$q_{Glycérol}$	<i>vitesse spécifique de consommation du glycérol (<math>C_{mole} \cdot C_{mole}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>
$q_{CO_2}$	<i>vitesse spécifique de production de dioxyde de carbone (<math>C_{mole} \cdot C_{mole}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>
$q_{O_2}$	<i>vitesse spécifique de consommation d'oxygène (<math>C_{mole} \cdot C_{mole}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>
$q_{lipides\ membranaire}$	<i>vitesse spécifique de biosynthèse de lipides membranaires depuis la voie de biosynthèse des acides gras (<math>C_{mole} \cdot C_{mole}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>
$q_{FAS}$	<i>vitesse spécifique de biosynthèse des acides gras liée aux activités enzymatiques de l'acétyl-CoA carboxylase et du complexe FAS (<math>C_{mole} \cdot C_{mole}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>
$q_{AcetylCoA}^{exp}$	<i>flux expérimental d'acétyl-CoA synthétisés lors de la production de PHA (<math>\mu mole \cdot g_{X_{cat}}^{-1} \cdot h^{-1}</math>)</i>

$q_{NADH}^{exp}$	flux expérimental de NADH synthétisés lors de la production de PHA ( $\mu\text{mole.g}_{Xcat}^{-1} \cdot h^{-1}$ )
$q_{FADH2}^{exp}$	flux expérimental de FADH <sub>2</sub> synthétisés lors de la production de PHA ( $\mu\text{mole.g}_{Xcat}^{-1} \cdot h^{-1}$ )
$Y_{C,Xcat}$	rendement de croissance à partir d'acides gras + acétyl-CoA ( $C\text{mole.Cmole}^{-1}$ )
$q_{AcetylCoA}^{exp\ demand}$	flux expérimental d'acétyl-CoA nécessaire à la demande anabolique ( $\mu\text{mole.g}_{Xcat}^{-1} \cdot h^{-1}$ )
$q_{NADH}^{exp\ demand}$	flux expérimental de NADH nécessaire à la demande anabolique ( $\mu\text{mole.g}_{Xcat}^{-1} \cdot h^{-1}$ )
$Q_{NH_3}^{exp}$	débit expérimental d'alimentation en ammoniacque ( $L \cdot h^{-1}$ )
$Q_{Glycérol}^{exp}$	débit expérimental d'alimentation en glycérol ( $L \cdot h^{-1}$ )
$Q_{AG}^{exp}$	débit expérimental d'alimentation en acides gras ( $L \cdot h^{-1}$ )
$Q_{substrat}$	débit d'alimentation en substrat ( $L \cdot h^{-1}$ )

## R

$r_{PHA}$	vitesse de production de PHA ( $C\text{mole.h}^{-1}$ )
$r_{AG}$	vitesse de consommation d'acide gras ( $C\text{mole.h}^{-1}$ )
$r_{CO2}$	vitesse de production de dioxyde de carbone ( $C\text{mole.h}^{-1}$ )
$RRR$	vitesse relative respiratoire

## S

$S_{rés}$	concentration résiduelle en substrat ( $g \cdot L^{-1}$ )
-----------	-----------------------------------------------------------

## T

$t_f$	temps final de la phase de production (h)
$T_{amb}$	température ambiante ( $^{\circ}C$ )
$T_m$	température de fusion ( $^{\circ}C$ )
$T_g$	température de transition vitreuse ( $^{\circ}C$ )

## V

$V_L$	<i>volume du milieu de culture (L)</i>
$V^{init}$	<i>volume initial du milieu de culture (L)</i>
$V_{max}$	<i>vitesse d'hydrolyse maximale</i>

## X

$X_t$	<i>concentration en biomasse totale (<math>g.L^{-1}</math>)</i>
$X_{cat}$	<i>concentration en biomasse catalytique (<math>g.L^{-1}</math>)</i>
$X_{cat}^{init}$	<i>concentration de biomasse catalytique au début de la phase de production (<math>g.L^{-1}</math>)</i>
$X_{cat}^{theo}$	<i>concentration théorique de biomasse catalytique (<math>g.L^{-1}</math>)</i>

## Y

$Y_{ATP,Xcat}^{theo}$	<i>demande anabolique théorique (<math>g_{Xcat}.mol_{ATP}^{-1}</math>)</i>
$Y_{ATP,Xcat}$	<i>rendement énergétique de croissance (<math>g_{Xcat}.mol_{ATP}^{-1}</math>)</i>
$Y_{S,PHA}^{exp}$	<i>rendement expérimental de production de PHA (<math>Cmole.Cmole^{-1}</math>)</i>
$Y_{S,Xcat}^{exp}$	<i>rendement expérimental de croissance (<math>Cmole.Cmole^{-1}</math>)</i>
$Y_{S,Xcat}^{max}$	<i>rendement maximal de croissance (<math>Cmole.Cmole^{-1}</math>)</i>
$Y_{S,Xt}^{exp}$	<i>rendement expérimental de production de biomasse totale (<math>Cmole.Cmole^{-1}</math>)</i>
$Y_{S,Xcat}^{eff}$	<i>rendement effectif de croissance en condition de couplage croissance – production e PHA à partir d'acides gras (<math>Cmole.Cmole^{-1}</math>)</i>
$Y_{AcetylCoA}^{estim}$	<i>rendement de consommation d'acétyl-CoA provenant de la production de PHA pour la croissance, estimée par le descripteur métabolique (<math>\mu mole.g_{Xcat}^{-1}</math>)</i>
$Y_{AcetylCoA}^{max}$	<i>rendement maximale de consommation d'acétyl-CoA provenant de la production de PHA pour la croissance, estimée par le descripteur métabolique (<math>\mu mole.g_{Xcat}^{-1}</math>)</i>
$Y_{NADH}^{estim}$	<i>rendement de consommation de NADH provenant de la production de PHA pour la croissance, estimée par le descripteur métabolique (<math>\mu mole.g_{Xcat}^{-1}</math>)</i>

$Y_{FADH_2}^{estim}$	rendement de consommation de $FADH_2$ provenant de la production de PHA pour la croissance, estimée par le descripteur métabolique ( $\mu\text{mole.g}_{X_{cat}}^{-1}$ )
$Y_{Fatty\ acids}^{estim}$	rendement de consommation des acides gras pour la croissance, estimée par le descripteur métabolique ( $\mu\text{mole.g}_{X_{cat}}^{-1}$ )

## Symboles grecs

$\chi_{PHA}$	Pourcentage d'accumulation intracellulaire en PHA ( $\%g.g^{-1}$ )
$\chi_{PHA}^{lim}$	Pourcentage d'accumulation intracellulaire limite théorique en PHA ( $\%g.g^{-1}$ )
$\mu$	taux de croissance ( $h^{-1}$ )
$\mu^{init}$	taux de croissance initial ( $h^{-1}$ )
$\mu^{fin}$	taux de croissance final ( $h^{-1}$ )
$\mu_{max}^{exp}$	taux de croissance maximal expérimental ( $h^{-1}$ )
$\mu_{(t)}^{theo}$	taux de croissance théorique en fonction du temps ( $h^{-1}$ )
$\mu_{(t)}^{applied}$	taux de croissance appliqué en fonction du temps ( $h^{-1}$ )
$\Phi_{AcetylCoA}^{\beta-ox}$	flux d'acétyl-coenzymeA provenant de la production de PHA ( $\mu\text{mole.g}_{X_{cat}}^{-1}.h^{-1}$ )
$\Phi_{ATP}^{\beta-ox}$	flux d'ATP produit par la $\beta$ -oxydation pour la production de PHA ( $\mu\text{mole.g}_{X_{cat}}^{-1}.h^{-1}$ )
$\Phi_{(t)}^S$	flux d'alimentation en substrat carboné ( $C\text{mole.L}^{-1}.h^{-1}$ )
$\Phi_{(t)}^N$	flux d'alimentation en azote ( $C\text{mole.L}^{-1}.h^{-1}$ )
$\Phi_{AG}^{hydrolysé}$	flux d'acides gras libérés par l'hydrolyse ( $g.L^{-1}$ )
$\Phi_{AG}^{assimilé}$	flux d'acide gras pouvant être assimilé par la souche ( $g.L^{-1}$ )
$\varepsilon_N$	coefficient de conversion de l'azote en biomasse catalytique ( $\text{mole.Cmole}^{-1}$ )
$\mathcal{T}_{transfert}(t)$	paramètre caractérisant les phénomènes de transferts en fonction du temps
$\mathcal{T}_{biologique}(t)$	paramètre caractérisant les phénomènes biologiques en fonction du temps
$\Delta H_{fus}$	enthalpie de fusion ( $J.g^{-1}$ )

## INTRODUCTION GENERALE

A la lecture des dernières prévisions établies par l'association industrielle "European Bioplastics" (2016) et l'institut des bioplastiques et bio-composites de l'Université d'Hanovre, le marché des bioplastiques devrait considérablement se développer dans les années à venir. En effet, la production totale de 2 millions de tonnes en 2016 devrait atteindre les 7.8 millions de tonnes en 2019. Cette estimation tient compte de l'évolution croissante de la demande de nombreux domaines d'applications (emballage, appareils électroniques ou automobile ...) en solutions durables sur le marché des matériaux plastiques. La multiplication des potentielles utilisations dans différentes industries lourdes va occasionner dans les années à venir un boom dans ce secteur. Plus de 500 entreprises de transformation des bioplastiques ont émergé, et il devrait y en avoir plus de 5000 aux alentours 2020. Le marché mondial des bioplastiques représentait en 2015 plus de 2.7 milliards \$ et sera supérieur à 5 milliards \$ en 2021. Le taux de croissance annuel moyen du marché des plastiques biodégradables devrait croître de 12% entre 2016 et 2021 d'après le rapport MarketsandMarkets (M&M) de Juin 2016.

Il est tout d'abord primordial de définir ce qu'est une matière plastique, puis bioplastique. En langage courant, un plastique est un mélange contenant une matière de base (un polymère) pouvant être moulé, travaillé, en général à chaud et sous pression, dans le but d'obtenir un semi-produit ou à un objet. Le terme « bioplastique » désigne le caractère renouvelable de la ressource utilisée pour sa production. On parle alors de produit bio-sourcé. Il décrit également la biodégradabilité du produit, à savoir la « capacité intrinsèque à être dégradé par une attaque microbienne, la simplification progressive de sa structure et finalement la conversion en H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> et/ou CH<sub>4</sub> et une nouvelle biomasse » (Bewa, 2005). Un bioplastique peut n'être que biodégradable, sans être bio-sourcé, mais les PHA réunissent ces deux caractéristiques. Ces derniers sont des polymères qui présentent une importante gamme de propriétés thermomécaniques du fait de la grande diversité de monomères qui peuvent les constituer. Les PHA se présentent donc comme de bonnes alternatives à des plastiques d'origines fossiles tels que le PVC (Poly Vinyle Chlorure), les PE (Poly Ethylène) basses et hautes densités ou encore le PP (Poly Propylène) (Figure 1).

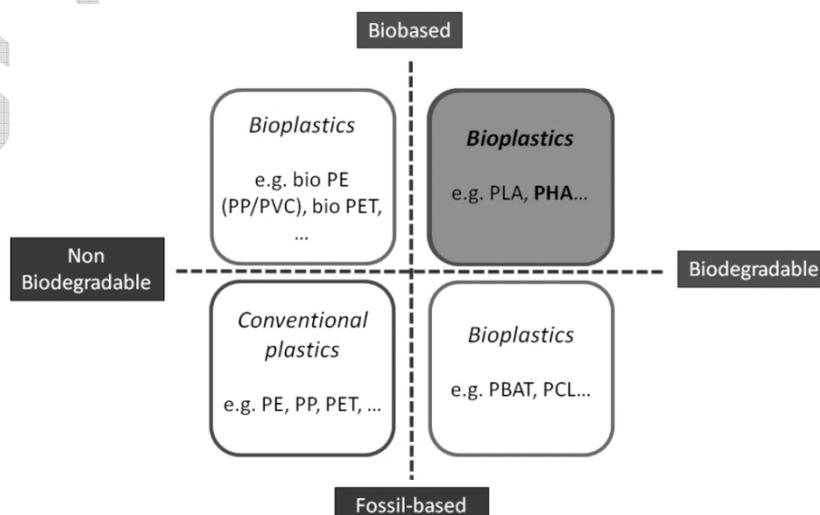


Figure 1 : Schéma représentant les caractéristiques des matériaux plastiques

Aujourd'hui, il existe un nombre important d'acteurs majeurs (Europe, Chine, Etats-Unis, Japon et Brésil) qui s'intéressent de près à la solution PHA d'origine microbienne. Toutefois, les coûts de production de ces matériaux sont encore trop importants pour permettre une utilisation large de ces polymères par l'industrie de la plasturgie et ne peuvent en aucun cas rivaliser avec les plastiques d'origine fossiles cités précédemment. Les capacités de production actuelles de ces acteurs, au niveau mondial, peuvent atteindre quelques milliers de tonnes par an et ne concerne que des PHA à courtes chaînes latérales (PHB, PHB-co-PHV, ...). Il existe également un grand nombre de projets de construction de sites de production pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de tonnes annuels qui ont été annoncés. Aujourd'hui certains n'ont pas encore vu le jour (Telles, Enmat, Bio-on ...) et d'autres ne remplissent pas encore leurs objectifs de production fixés pour permettre de fournir leurs clients en quantités industrielles (Meridian, Metabolix).

L'objectif est de parvenir à utiliser des procédés de production de PHA efficaces permettant de proposer des prix pouvant descendre jusqu'à 1,5 – 2 €/kg. Choi & Lee (1999) semblent penser qu'il est possible d'atteindre cette fourchette rendant ainsi envisageable la mise en concurrence avec les matériaux conventionnels. Les facteurs impactant le plus les prix sont ceux des matières premières imputables de près de 50% du coût de production (Koller et al. 2010) et les étapes d'extraction/purification des polymères. Pour réduire l'impact des coûts des substrats il faut se tourner vers les sources carbonées actuellement non valorisées, coproduits voire déchets de filières agro-sourcées et, en termes de procédés de conversion, viser à l'optimisation des rendements de biosynthèse et des taux d'accumulation intrinsèques jusqu'à dépasser les 60% (g.g<sup>-1</sup>) de PHA (Ramsay et al. 1990).

Le choix de la souche est donc une étape primordiale dans la mise en place d'un procédé de production biotechnologique efficace. Il existe une centaine d'espèces de procaryotes capable de synthétiser et d'accumuler ces polymères. Au sein de ces cellules, les inclusions de PHA servent de réserve de carbone et sont produites lorsque le microorganisme fait face à une limitation nutritionnelle autre que le carbone (N, O, P, S, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn, Co, Cu, Ca, Sn) lors de sa croissance (Koller et al. 2010). Les souches bactériennes les plus utilisées industriellement à ce jour sont *Cupriavidus necator* (anciennement *Ralstonia eutropha* et *Alcaligenes eutrophus*) et *Escherichia coli* recombinante pour la production de PHA à courtes et moyennes chaînes. Toutefois de nombreuses autres souches telles que celles du genre *Pseudomonas* sont également capables de produire et d'accumuler ce type de polymères. Le choix de la souche se détermine également grâce aux rendements de conversion du substrat en PHA, aux vitesses spécifiques de production de la biomasse et de produits (Bruce et al. 1994; Choi & Lee 1999). *E. coli* recombinante est souvent privilégiée pour la synthèse de polymères car la production peut être induite sans limitation nutritionnelle.

Depuis sa création en 2003, la société Végéplast SAS occupe une place singulière dans le domaine de la plasturgie en proposant à la fois la production de granulés de bioplastiques et leurs transformations par injection thermoplastique. Celle-ci souhaite désormais produire elle-même les matrices thermoplastiques indisponibles sur le marché et nécessaire à la poursuite de son développement afin de garder une avance technologique sur ses concurrents. Dans le cadre de cette stratégie, Végéplast SAS souhaite explorer les possibilités d'une faisabilité d'un procédé biotechnologique pour l'obtention de PHA dont les propriétés correspondront aux attentes du marché.

## Introduction générale

Dans cette optique, les objectifs industriels de ce projet seront la production de PHA à moyennes chaînes latérales à un coût pouvant concurrencer les plastiques traditionnels. Pour cela, les substrats envisagés sont notamment les graisses animales dérivées de la transformation agro-alimentaire. Ces substrats carbonés, dont le gisement est important, seront fournis par les coopératives agricoles du grand sud-ouest Vivadour SCA et Ovalie-Innovation SAS déjà partenaires de Végéplast SAS pour la fourniture de céréales.

Dans ce cadre de recherches industriellement applicables, les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour objectifs d'identifier et de quantifier les mécanismes métaboliques majeurs susceptibles de contrôler l'accumulation et la nature des biopolymères à partir de substrats lipidiques. La synthèse du polymère résultera d'une redistribution du carbone induite par une réduction des potentialités de croissance en condition de limitation azotée. Dans un premier temps, les études ont été réalisées sur des substrats simples modèles (acides gras et glycérol) séparément, puis en mélange représentatif de leurs proportions respectives au sein du substrat industriel (graisses de canard). Les cultures en fermenteurs en conditions performantes de production de PHA ont été effectuées selon un mode de cultures de type discontinu alimenté (Fed-Batch) avec des apports contrôlés en carbone et azote. L'ensemble des expérimentations a permis une caractérisation cinétique et stœchiométrique du catabolisme et des voies de synthèses (anabolisme et production) de la souche. Les facteurs influant sur la composition monomérique et les propriétés des PHA finaux obtenus ont également été étudiés. Enfin, une étude de faisabilité du procédé global de production de PHA à partir de graisses de canard a été réalisée.

Cette étude bénéficie de la collaboration et du soutien financier de Végéplast SAS, Ovalie-Innovation SAS et Vivadour SCA, ainsi que du soutien financier de l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) via le dispositif CIFRE.

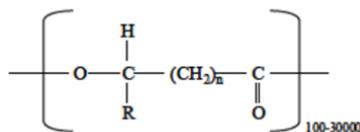
# ETAT DE L'ART

## I- Description et propriétés des Poly-β-Hydroxyalcanoates

### I.1 Définition et structure

Les Poly-β-HydroxyAlcanoates (PHA) forment une famille de polyesters variés, produits par de nombreux micro-organismes. Ils sont synthétisés intracellulairement et stockés comme source de carbone de réserve. Ces zones de stockages se présentent sous forme de granules de polymères pouvant représenter jusqu'à 90% de la masse sèche de certaines bactéries. Leur première apparition dans la littérature scientifique est due à Lemoigne (1926), qui a découvert des granules de PHB (PolyHydroxyButyrate) au sein de *Bacillus megaterium*. Leur observation est désormais possible par microscopie à contraste de phase dû au caractère réfractaire des inclusions (Dawes, 1973).

Ces molécules résultent de l'estérification de monomères de R-3-hydroxy acide gras formant au final un polymère linéaire. Tous les monomères de PHA sont de configuration R car l'enzyme les synthétisant, la PHA synthase, est R-stéréospécifique. La figure ci-dessous répertorie les formules semi-développées de ces polymères. D'après Agnew & Pflieger (2013), il existe au moins 150 monomères différents dont on peut voir quelques exemples dans la Figure 2.



n	R	Polymère	Abréviation
1	H	Poly(3-hydroxypropionate)	P (3-HP)
1	CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxybutyrate)	P (3-HB)
1	CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxyvalérate)	P (3-HV)
1	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxyhexanoate)	P (3-HHx)
1	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxyoctanoate)	P (3-HO)
1	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxydodécanoate)	P (3-HDD)
2	H	Poly(4-hydroxybutyrate)	P (4-HB)
3	H	Poly(5-hydroxyvalérate)	P (5-HV)

Figure 2 : Structure générale des PHA (Sang Yup Lee, 1996)

Cette famille de polymères est sous-divisée en 3 catégories :

- Les PHA à courte chaîne latérale (short chain length : SCL-PHA) composés de monomères ayant de 3 à 5 carbones. On y trouve notamment les poly(3-hydroxybutyrate) (P(3-HB)) et les poly(3-hydroxyvalérate) (P(3-HV)).

- Les PHA à chaîne latérale moyenne (medium chain length : MCL-PHA) possédant un nombre de carbones compris entre 6 et 14.
- Les PHA à longue chaîne latérale (long chain length : LCL-PHA) ayant plus de 14 carbones  
Parmi cette famille, on trouve différentes formes de polymères.

On peut trouver des homopolymères dont la structure est entièrement composée du même motif monomérique. Les copolymères sont des PHA composés de monomères de natures différentes. La répartition des monomères au sein du polymère peut suivre différentes organisations :

- L'organisation aléatoire dans laquelle les monomères sont placés sans ordre particulier
- L'organisation périodique où l'on trouve une alternance de monomère pour donner des motifs du type A-B-A-B-A-B...
- L'organisation en blocs où les monomères de même nature sont regroupés. On observe dans ce cas le motif suivant A-A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-B...

La nature des monomères de PHA produits sont directement dépendant du substrat utilisé et de la nature de la souche microbienne productrice. On peut donc définir trois grandes catégories de substrats pour les souches productrices. Le groupe A concerne les substrats pouvant servir à la fois à la croissance bactérienne et à la production. Le groupe B implique les substrats ne pouvant assurer que la croissance, et enfin le C qui contient les substrats n'induisant que la production. Grâce aux deux derniers groupes, il est possible d'obtenir des monomères de PHA avec des motifs très originaux (contenant des cycles par exemple) (Rai et al. 2011) (Figure 3).

3-Hydroxy acid	3-Hydroxy acid (Unsaturated)	3-Hydroxy acid (branched)	3-Hydroxy acids (Substituted side chain)	Other then 3-Hydroxy acids	Aromatic side groups	Other functional groups
Hexanoic	4-hexenoic	2,6-dimethyl-5-heptenoic	7-fluoroheptanoic	4-hydroxyhexanoic	Dimethylesters of 3,6-epoxy-7-nonenic acid	3-hydroxy-7-oxooctanoate
Heptanoic	5-hexenoic	4-methylhexanoic	9-fluorononanoic	4-hydroxyoctanoic	3-hydroxyphenylhexanoic	3-hydroxy-5-oxohexanoate
Octanoic	6-heptenoic	5-methylhexanoic	6-chlorohexanoic	5-hydroxyheptanoic	3-hydroxyphenylheptanoic	8-acetoxy-3-hydroxyoctanoate
Nonanoic	6-octenoic	4-methyloctanoic	8-chlorooctanoic	5-hydroxyhexanoic	3-hydroxyphenyloctanoic	6-acetoxy-3-hydroxyhexanoate
Decanoic	7-octenoic	5-methyloctanoic	6-bromohexanoic	4-hydroxyhexanoic	3-hydroxy-6-p-methylphenoxyhexanoate	
Undecanoic	8-nonenic	6-methyloctanoic	8-bromooctanoic	2-hydroxydodecanoic		
Dodecanoic	9-decenic	6-methylnonanoic	11-bromoundecanoic			
Tetradecanoic	10-undecenoic	7-methylnonanoic	7-cyanoheptanoic			
	6-dodecenic	8-methylnonanoic	9-cyanononanoic			
	5-tetradecenoic	7-methyldecanoic	12-hydroxydodecanoic			
	5,8-tetradecadienoic		Succinic methylester acid			
	5,8,11-tetradecatrienoic		Adipic acid methylester			
	4-hexadecenoic		Suberic acid methylester			
	4,7-hexadeca-dienoic		Suberic acid ethyl ester			
			Pimelic acid propylester			

Figure 3 : Diversité des monomères de MCL-PHA productibles (Zinn et al. 2001)

## I.2 Propriétés

Les PHA présentent de nombreuses propriétés d'intérêts industriels.

### I.2.1 Biodégradabilité

L'un des intérêts principal des PHA est leur capacité de biodégradation totale dans un délai de trois à neuf mois. Cette dégradation est effectuée par des bactéries et champignons aérobies et anaérobies du sol qui ont la capacité de sécréter des enzymes appelées PHA dépolymérase pour dégrader ces polymères. La vitesse de dégradation est fonction de diverses facteurs tels que les

conditions climatiques (température, environnement,...), la population microbienne présente et la capacité du polymère à être dégradé (Jendrossek & Handrick, 2002). En condition aérobie, les produits de cette biodégradation sont le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ), alors qu'en anaérobie du méthane ( $\text{CH}_4$ ) est également dégagé.

### I.2.2 Propriétés mécaniques

La classe des PolyHydroxyAlcanoates présente un panel assez large de propriétés mécaniques et thermiques, ce qui rend cette famille très intéressante et sans équivalent dans le domaine des bioplastiques. On peut trouver des PHA à structures cristallines ou amorphes, avec des élasticités atteignant parfois jusqu'à un comportement caoutchouteux.

Les propriétés physiques et mécaniques caractérisant des plastiques sont les températures de fusion  $T_m$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), de transition vitreuse  $T_g$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), de cristallisation  $T_c$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), de dégradation  $T_d$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), le Module de Young (GPa), la résistance à la traction (MPa), l'élongation avant rupture (%), la résistance aux chocs Izod ( $\text{J}\cdot\text{m}^{-1}$ ), la masse moléculaire moyenne en nombre  $M_n$  (Da) et la masse moléculaire moyenne en masse  $M_w$  (Da). Ces propriétés thermiques et mécaniques de ces plastiques sont donc directement fonction de la nature des monomères présents et de leur organisation au sein du polymère.

Par exemple, le PolyHydroxyButyrate (PHB) a des propriétés thermoplastiques intéressantes et possède une gamme de températures d'usages assez large (de  $-30$  à  $120^{\circ}\text{C}$ ) (Shen et al. 2009). Cependant, celui-ci a une utilisation relativement limitée du fait de sa fragilité, de sa rigidité et de ses températures de fusion et de dégradation trop proches (respectivement  $179^{\circ}\text{C}$  et environ  $200^{\circ}\text{C}$ ) (Sang Yup Lee, 1996).

Le PHB-co-PHV possède, lui, des propriétés mécaniques plus intéressantes car plus la proportion de monomères de 3-hydroxyvalérate est importante dans le polymère, plus celui-ci est flexible et résistant. Il a donc une meilleure résistance à l'élongation avant rupture que le PHB. De plus, la présence de HV dans le copolymère abaisse la température de fusion du polymère tout en laissant la température de dégradation constante. Cette modification permet d'augmenter l'intervalle de processabilité.

De manière plus générale, les PHA composés de monomères à chaînes moyennes offriront des plastiques plus flexibles et résistants, jusqu'à atteindre parfois des comportements élastiques se rapprochant de ceux des caoutchoucs. Les MCL-PHA ont une très bonne tenue à la température mais se dégradent très vite à température élevée (Rai et al. 2011).

Concernant les copolymères de types blocs (plusieurs monomères similaires consécutifs) qui peuvent être obtenus à partir de procédés de production spécifiques, leurs caractéristiques thermomécaniques sont très différentes des copolymères aléatoires ayant pourtant la même composition monomérique. En effet, du fait de leur répartition en bloc, ce polymère va emprunter les deux températures de transition vitreuse et de fusion des deux groupes monomériques (dans le cas d'un copolymère en bloc contenant deux types de monomères). La conformation bloc permet néanmoins l'augmentation de la limite d'élasticité, du module de Young et de la force de tension (Tripathi et al. 2013).

Certaines propriétés mécaniques ne sont pas seulement dépendantes de la composition monomérique du polymère. Elles peuvent également être impactées par d'autres facteurs. Par

exemple, Le poids moléculaire d'un polymère peut varier en fonction de la souche productrice, de la composition du milieu de culture, des conditions de fermentation et des procédés d'extraction (Rai et al. 2011).

### I.3 Structure des inclusions

Les PHA se retrouvent au sein des cellules sous formes d'inclusions de 0,1 à 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre. On peut compter jusqu'à 20 granules par cellules chez certains microorganismes. Chez la souche *P. putida*, il n'y a généralement qu'une seule granule et exceptionnellement deux ou trois. Les polymères de polyhydroxyalcanoates s'organisent en micro fibrilles (10 à 15 nm de diamètre) puis s'enroulent sur elles-mêmes pour donner des granules sphériques avec un cœur hydrophobe amorphe et mobile contenant un peu d'eau (Ballard, 1987). Elles sont recouvertes d'une simple couche de phospholipides contenant de nombreuses macromolécules telles que des PHA synthases, des PHA dépolymérase, des phasins (protéines structurant les granules) et des protéines régulatrices nommées PhaR (Zinn et al. 2001 ; Jendrossek, 2009) (Figure 4).

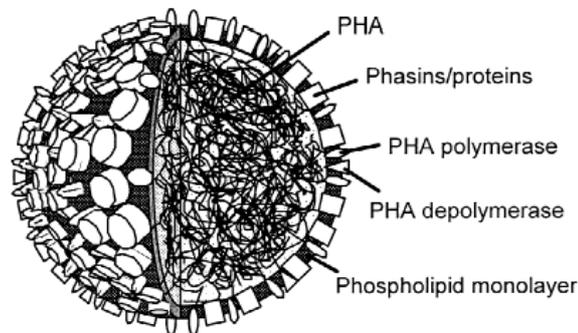


Figure 4 : Représentation d'une inclusion de PHA (Zinn et al. 2001)

La biogenèse de ces granules, appelés « carbosomes », n'est pas encore bien étudiée, toutefois trois modèles ont été proposés (Grage et al. 2009; Jendrossek & Pfeiffer, 2014) et schématisés dans la Figure 5 :

- Le modèle « micelle » qui suggère que les PHA synthases sont solubles et réparties aléatoirement au sein de la cellule. Au cours de la réaction de polymérisation, le polyester convertit le caractère soluble de l'enzyme en caractère amphipatique, ainsi les chaînes hydrophobes des PHA se regroupent et permettent la formation de micelles.
- Le modèle « bourgeonnant » de l'anglais « budding » qui se base sur la présence de la PHA synthase sur la surface interne de la membrane plasmique. La polymérisation aurait lieu dans l'espace intermembranaire jusqu'à la formation d'une inclusion qui s'invagine et se détache de la membrane (Jendrossek, 2009).
- Le modèle « scaffold » explique que les PHA synthases responsables de la synthèse des polymères seraient accrochées à un « échafaudage » qui serait le nucléoïde de la cellule.

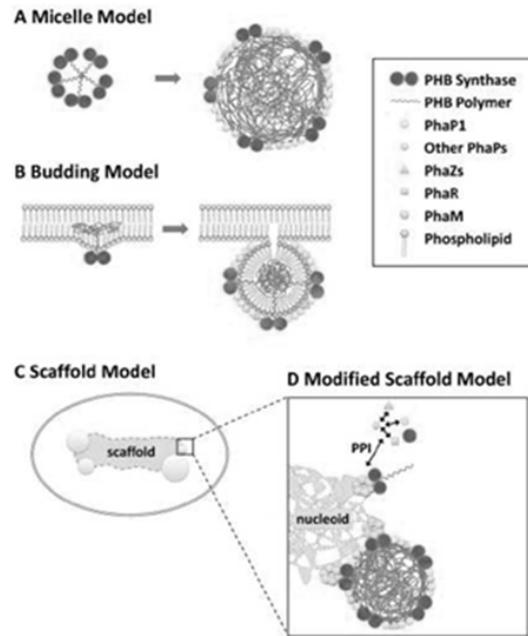


Figure 5 : Schéma représentant les trois modèles de biogenèse des granules de PHA (Jendrossek, 2009; Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Pötter & Steinbüchel, 2006 ; Stubbe & Tian, 2003)

## I.4 Applications

Grâce à leurs propriétés mécaniques, de biocompatibilité (notamment les MCL-PHA) et de biodégradabilité, de nombreuses applications sont envisageables à l'échelle industrielle dans différents secteurs, tels que les emballages, les textiles, les produits jetables, le domaine médical (bio-implants, sutures, vis, plaques pour les os) (Figure 6).

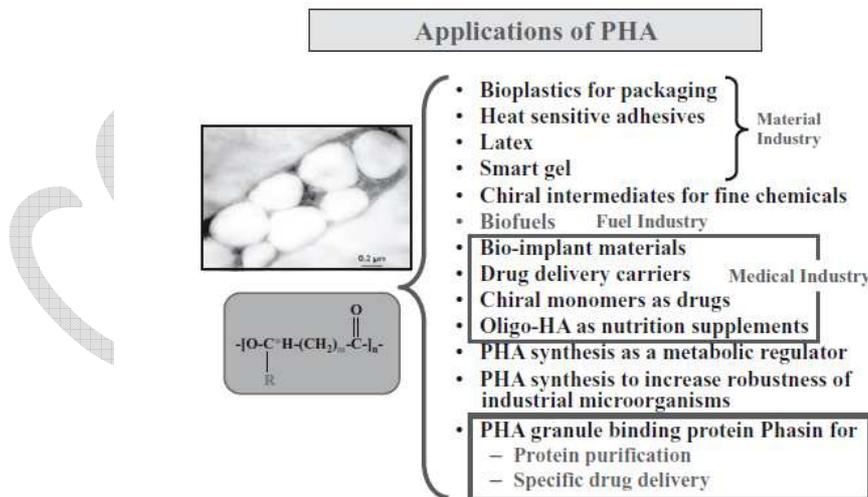


Figure 6 : Représentation des différents domaines d'applications des PHA (G. Chen, 2010)

## II- Procédé général de production de PHA

Malgré l'existence d'un grand nombre de PHA différents, seulement quelques-uns sont d'ores et déjà industrialisés. On trouve parmi eux le PHB, PHB-co-PHV, P3HB-co-P4HB et le PHB-co-PHHx. L'ensemble de la production mondiale est réparti entre quelques marques. On découvre, dans le Tableau 1, les productions en 2007 et les prévisions de production faites pour les années 2010 et 2020 par ces entreprises.

Tableau 1 : Représentation des capacités de production en 2007 dans le monde et les capacités prédictives faites à l'époque pour les années 2010 et 2020 (Shen et al. 2009)

Société	Pays	Nature des PHA	Capacité 2007	Capacité Annoncée (A)	
			tonnes.an <sup>-1</sup>	Ou Espérée (E)	
			2007	2010	2020
Tianan	Chine	P(3HB-co-3HV)	2000	10 000 (A)	50 000 (A)
Telles	USA	PHB copolymers	250	50 000 (A)	500 000 (E)
Kaneka	Japon	P(3HB-co-3HHx)	100	1 000 (A)	50 000 (E)
Green Bio	Chine	P(3HB-co-4HB)	Inconnue	10 000 (A)	N/A
PHB Industrial	Brésil	P(3HB-co-3HV)	50	10 000 (E)	10 000 (E)
Biomer	Allemagne	P(3HB)	Inconnue	N/A	N/A
Mitsubishi Gas chemicals	Japon	P(3HB)	10	N/A	N/A
Meredian	USA	N/A	0	N/A	272 000 (A)
Tepha	USA	N/A	Inconnue	N/A	N/A
Beijing Tianzhu	Chine	P(3HB-co-3HHx)	Pilote	N/A	N/A

Le procédé de production se décompose en plusieurs étapes comme le schématise la Figure 7 ci-après (ce schéma ne prend pas en compte un éventuellement prétraitement du substrat utilisé) :

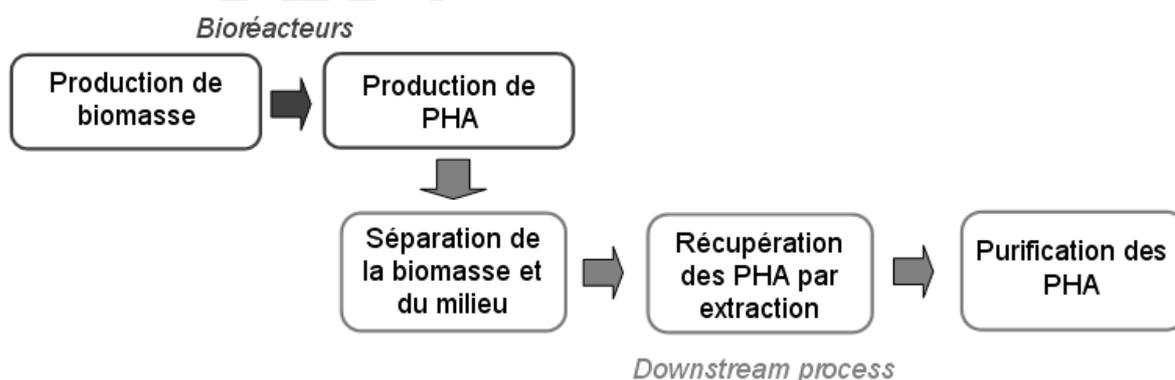


Figure 7 : Schéma du procédé général de production de PHA

La première phase, effectuée dans des bioréacteurs, permet la production de la biomasse jusqu'à l'atteinte de la concentration cellulaire voulue. Ensuite, cette biomasse est mise en condition pour produire les polyhydroxyalcanoates. Les étapes suivantes consistent en la récupération et la purification du produit.

## II.1. Synthèse de la biomasse catalytique et production de PHA en bioréacteurs

La synthèse de PHA est favorisée par des conditions de croissance limitée (Koller et al. 2010). La production de PHA se fait généralement en deux étapes : une première phase de croissance non limitée afin de produire une certaine quantité de biomasse catalytique et une deuxième phase de croissance nutritionnellement limitée (production de PHA). Dans le but de définir la stratégie de culture la plus performante les différents modes de culture ont été étudiés à travers le monde. Le mode de culture le plus adapté dépend à la fois du micro-organisme et du substrat choisi.

### II.1.1 Culture discontinue : Batch

Les concentrations en biomasse catalytique et PHA pouvant être obtenues par le mode de culture Batch sont faibles car limitées par les concentrations élémentaires initiales du milieu minéral initial. Ce type de culture permet toutefois d'obtenir facilement une limitation nutritionnelle nécessaire à la production de PHA, jusqu'à éventuellement atteindre une carence du milieu en cet élément limitant. Ce type de procédé n'est pas envisageable pour des substrats ayant des effets inhibiteurs sur le micro-organisme ou se solubilisant très mal dans un milieu aqueux.

### II.1.2 Culture discontinue alimentée : Fed-batch

En mode Fed-batch, le(s) substrat(s) carboné(s) et les sels peuvent alimenter le bioréacteur au cours de la culture. Par conséquent, il est possible d'atteindre de hautes densités cellulaires et de hautes teneurs en PHA. Les productivités et les rendements peuvent également être élevés. Comme une densité élevée en biomasse est nécessaire pour la production commerciale de PHA, la culture discontinue alimentée est souhaitable (Byrom, 1987). Le Tableau 2 résume quelques performances obtenues dans la littérature avec la souche *Pseudomonas putida* (souche d'intérêt de ces travaux et présentée ultérieurement) par ce mode de culture Fed-batch.

Tableau 2 : Production de MCL-PHA par *P. putida* à partir de différents substrats en mode Fed-batch

Souche	Substrat(s)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	X <sub>tot</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	PHA (g.L <sup>-1</sup> )	%PHA (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>SP</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	r <sub>P</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Références
<i>P. putida</i> KT2442	Acide Octanoïque	0.26	42	9.9	23.6	0.22	0.22	Kellerhals et al. 2000
	Acide Oléique	0.37	90	18	20	0.56	0.57	
	Acides Gras	0.26	73	25	34.2	0.46	0.56	
	Végétaux Acides Gras	0.2	28.5	15.4	54	0.38	0.33	
<i>P. putida</i> BM01	Glucose + Acide Octanoïque	nr	94.8	35.9	65.5	nr	0.92	Kim et al. 1997
	<i>P. putida</i> KT2442	Hydrolysats d'huile de maïs	nr	103	28	27.1	nr	0.61
<i>P. putida</i> KT2440	Acide Oléique	nr	141	72.6	51.4	nr	1.9	S Y Lee et al. 2000

### II.1.3 Culture continue : chémostat

En termes de productivités, les cultures continues de type chémostats peuvent être légèrement plus intéressantes que les cultures en mode Fed-batch si la souche est stable lorsque les conditions de cultures sont en régime permanent (Heijnen et al.1992). S'ils peuvent avoir de nombreux intérêts à l'échelle laboratoire, comme l'étude de phénomènes physiologiques en conditions contrôlées, il est difficile d'envisager une mise en place à l'échelle industrielle en raison des risques de contaminations et d'instabilité de la culture (Muhr et al. 2013). L'avantage des cultures continues est qu'elles nécessitent des réacteurs de petits volumes, des taux de croissance constants et donc une reproductibilité dans la composition des polymères obtenues (Hartmann et al. 2010). Pour optimiser les productivités avec ce type de culture, il est nécessaire d'avoir un réacteur bi-étagé en série, l'un assurant la croissance, l'autre, la production. Le Tableau 3 présente quelques résultats recensés dans la littérature avec la souche *P.putida* en mode chémostat.

Tableau 3 : Production de MCL-PHA par *P. putida* à partir de différents substrats en mode chémostat

Substrat(s)	D (h <sup>-1</sup> )	Q <sub>PHA</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	X <sub>tot</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	%PHA (g.g <sup>-1</sup> )	Références
Acide Octanoïque	0.2	0.58	11.6	23	Preusting et al. 1993
Oléate	0.1	0.67	30	23	Huijberts & Eggink 1996
Acides Octanoïque + Décanoïque	0.1	nr	1.53	52.4	Hartmann et al. 2010

### II.2. Récupération des PHA

Pour chaque étape du DownStream Process (DSP), il existe plusieurs possibilités. Ainsi, La séparation de la biomasse et du milieu peut se faire par sédimentation, filtration ou centrifugation.

Pour la récupération des polymères, le choix du procédé se fera en fonction de la souche productrice, de la pureté recherchée et de la masse moléculaire du polymère final à atteindre (Koller et al. 2011). En effet, il existe plusieurs types d'extraction :

- L'extraction par solvant est l'une des plus anciennes. Elle agit en deux étapes, elle permet de perméabiliser la membrane puis de solubiliser les PHA. Un grand nombre de solvants d'extraction ont été étudié dans la littérature (Tableau 4). Les PHA sont ensuite récupérés par évaporation du solvant dans lequel ils s'étaient solubilisés ou bien par précipitation par ajout d'un alcool comme le méthanol ou l'éthanol. De plus, ces solvants éliminent les endotoxines que l'on peut trouver chez les bactéries gram négatives. Ces techniques d'extractions par solvant permettent d'obtenir un haut degré de pureté en n'altérant que peu le polymère. Les granules de PHA sont, elles, dégradées par cette technique. Les solvants halogénés sont à éviter à l'échelle industrielle dans la mesure où ils présentent un risque pour l'environnement et pour la santé des opérateurs (Jacquel et al. 2008) à moins de mettre en place un recyclage de ces solvants.

Tableau 4 : Exemple de méthodes d'extraction par solvants (Jacquel et al., 2008; Kunasundari, 2011)

Solvants d'extraction	Récupération des PHA	Microorganisme	Pureté	Rendement	Référence
Chloroforme	Précipitation au méthanol	<i>Bacillus cereus</i> SPV	92%	31%	Valappil et al. 2007
	Evaporation	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	95%	96%	Fiorese et al. 2009
	Flottation des débris cellulaires, filtration et évaporation		98%	85%	Ibrahim & Steinbüchel, 2009
Dichlorométhane	Précipitation au méthanol	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 428	98%		Zinn et al. 2003
	Evaporation	<i>Bacillus megaterium</i>			Baptist & Grace 1960
1,2-Propylène carbonate	Précipitation	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	84%	95%	Fiorese et al. 2009
	Evaporation			77%	Heinzle & Lafferty 1980
Ter-Méthyl-Butyl Ether (TBME)	Evaporation	<i>P. putida</i> KT2440		15-17.5%	Wampfler et al. 2010
41 solvants : méthyl-formiate, méthyl-propionate, ...	Précipitation				Mantelatto & Durao 2013
	Evaporation	<i>Bacillus megaterium</i>			Baptist 1962
Acétone	Précipitation au méthanol + éthanol	<i>P. putida</i> ATCC 29347	99%	94%	Elbahloul & Steinbüchel 2009
Acétone	Evaporation	<i>P. putida</i> KT2440		94%	Jiang et al. 2006

- La digestion par agent chimique tel que l'hypochlorite de sodium (Heinrich et al. 2012) consiste en un traitement des cellules, préalablement lyophilisées, qui va éliminer chimiquement le matériel cellulaire entourant les granules de PHA. Ces agents chimiques altèrent le poids moléculaire des PHA. Cet effet négatif peut être atténué en utilisant un mélange hypochlorite de sodium-chloroforme, mais on retrouve la problématique environnementale expliquée précédemment. Ce procédé a pour avantage d'être bon marché.
- Une méthode n'utilisant pas de solvants a également été proposée. Elle consiste à mettre les cellules à une température de 80°C, puis les traiter avec un cocktail enzymatique composé de lysozymes, phospholipases, lécithinases, protéases, alcalases et autres. S'en suit une étape de lavage, de floculation et de séchage pour récupérer les PHA sous forme de poudres. L'option des traitements enzymatiques reste pour le moment bien trop coûteuse en vue d'une utilisation à l'échelle industrielle (Lysozyme 12650-88-3 Prix FOB : US \$ 160-208 / kg et protéase Sunson PRA100 Prix FOB : US \$ 2-9 / kg).

- Une autre méthode enzymatique d'extraction développée par De Koning et al. (1997) comprend tout d'abord une centrifugation, suivie d'un traitement par un cocktail de protéases et de détergents pour solubiliser le mélange, puis, d'une microfiltration.
- Un traitement mécanique par des broyeurs cellulaires peut permettre de casser les cellules et récupérer ainsi les inclusions de PHA qui se trouvaient à l'intérieur. Cette simple étape d'extraction peut permettre d'obtenir un produit final relativement pur. En fonction de l'exigence de pureté fixée, une étape supplémentaire de purification peut être ajoutée. Elle se fera par l'action de peroxyde d'hydrogène ou d'ozone. Le premier permet la décoloration du polymère et l'élimination de certains résidus encore présents tandis que le second désodorise et blanchit le polymère (Horowitz & Brennan 2001).

### **III- *Pseudomonas putida* KT2440 et son métabolisme**

*Pseudomonas putida* appartient à la famille des *Pseudomonas spp* fluorescents saprophytes à oxydase positive, qui est un groupe appartenant au genre *Pseudomonas* sensu stricto (groupe ARN I) (Latour & Lemanceau, 1998). *P. putida* KT2440 est une bactérie Gram négative aérobie qui produit des MCL-PHA. C'est un prototype microbien d'intérêts pour les biotechnologies de par son statut GRAS (Generally Recognized As Safe), sa versatilité métabolique (van Duuren et al. 2013), sa faible demande nutritionnelle, sa résistance aux stress et les nombreuses applications qui peuvent en découler (Escapa et al. 2012). C'est un microorganisme très résistant aux conditions extrêmes tels que des hautes températures, des pH extrêmes, la présence de toxines ou effets inhibiteurs de solvants. Sa croissance très rapide sur des substrats simples ( $\mu_{max}$  sur glucose égal à  $0.65 \text{ h}^{-1}$  (Davis et al. 2015)), son haut rendement de production de biomasse ( $Y_{S, X_{cat}} = 0.62 \text{ g.g}^{-1}$  contre  $0.55 \text{ g.g}^{-1}$  chez la plus part des microorganismes sur acides gras (Eggink, 1996)), ainsi que sa faible demande en maintenance sont autant d'atouts pour son utilisation à l'échelle industrielle (Poblete-Castro et al. 2012). Son génome a été entièrement séquencé et son métabolisme est modélisé (Nelson et al. 2002). La souche sauvage (ATCC 47054) est *rmo* - et *mod* +, c'est-à-dire qu'elle est déficiente en une petite protéine impliquée dans la chaîne respiratoire et possède l'enzyme malique ce qui rendra possible la dégradation de l'acide malique en pyruvate par une voie anaplérotique gluconogénique.

La représentation du métabolisme globale de cette souche est présentée dans le Figure 8.

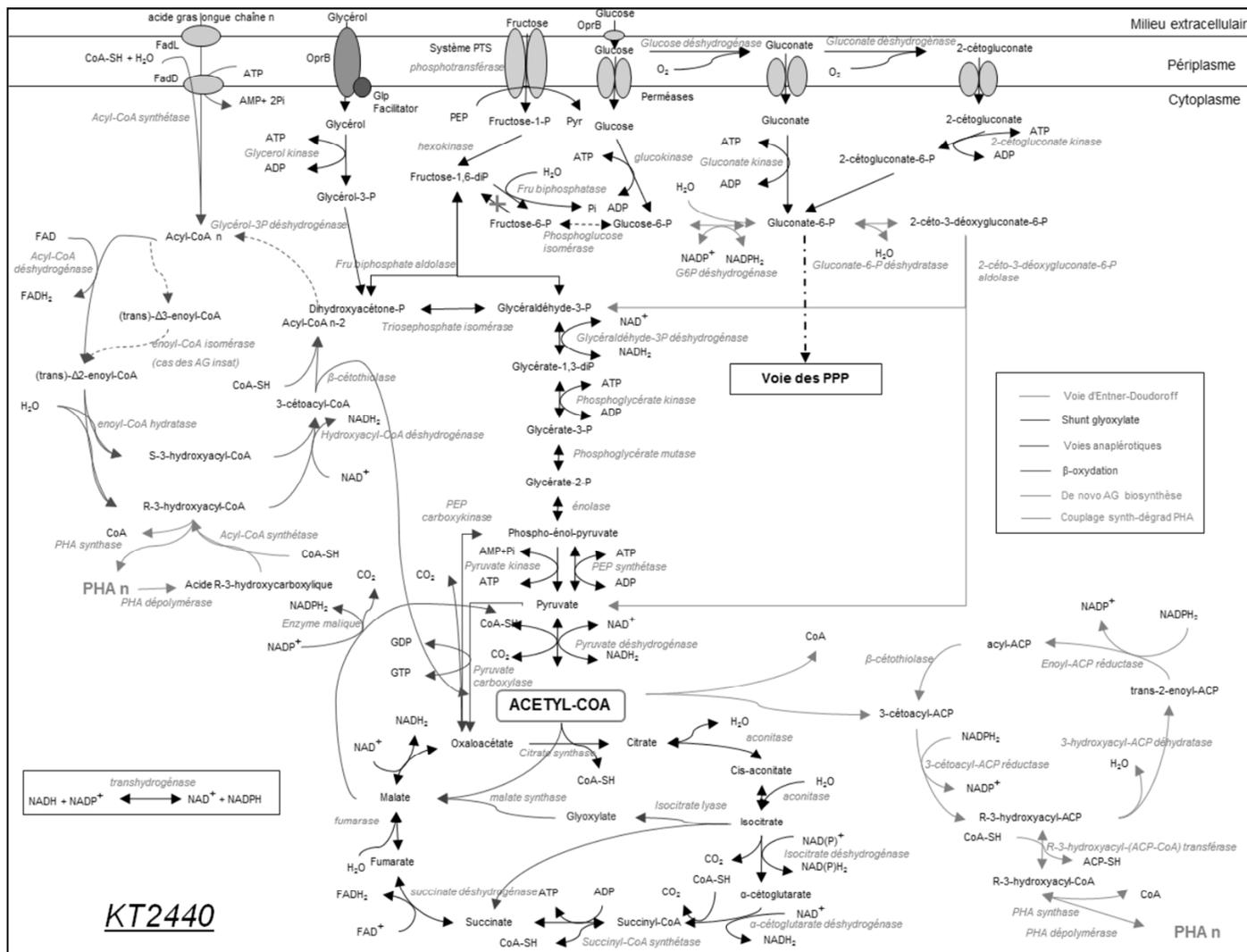


Figure 8 : Catabolisme des carbohydrates, glycérol et acides gras par *P. putida* KT2440 (d'après (Chavarría, Kleijn, Sauer, Pflüger-grau, & Lorenzo, 2012; de Eugenio et al., 2010; Dirusso & Black, 2004; Ebert, Kurth, Grund, Blank, & Schmid, 2011; Escapa et al., 2012; G. N. Huijberts, Eggink, de Waard, Huisman, & Witholt, 1992; Latour & Lemanceau, 1998; I Pobleto-Castro et al., 2012; Rehm & Mitsky, 2001; Schulz, 1991)

### III.1 Métabolisme des carbohydrates

Bien que le substrat d'intérêt de ces travaux de doctorat soit lipidiques, nous nous sommes intéressés aux catabolismes d'autres sources carbonées, tels que les carbohydrates, par cette souche afin d'envisager la potentiel valorisation d'autres co-produits issus de l'agriculture, riches en sucres, pour la production de PHA.

Le glucose n'est pas la source carbonée préférentielle de la famille des *Pseudomonadaceae*. Elle préfère les composés de type intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs. Toutefois, l'assimilation du glucose est possible grâce à différents modes de transport au travers de la membrane plasmique. *P. putida* peut l'intégrer par diffusion facilitée via une porine spécifique appelée OprB selon Poblete-Castro et al. (2012) ou via un transporteur de type ABC selon Chavarría et al. (2012). Dans la première option, le glucose diffuse dans le périplasma où il va être converti partiellement en gluconate puis en 2-cétogluconate par deux réactions d'oxydation successives catalysées par les glucose et gluconate déshydrogénases, deux enzymes membranaires utilisant l'oxygène atmosphérique. Les électrons récupérés lors de ces réactions sont transférés via les cytochromes b et c à la chaîne respiratoire (voir VI.4). Chacun de ces trois composés (glucose, gluconate et 2-cétogluconate) peut ensuite diffuser vers le cytoplasme (Chavarría et al. 2012). Toutefois, la part de glucose à être converti reste faible chez *P. putida* (Fuhrer et al. 2005).

Le fructose, quant à lui, est importé via une perméase « phosphotransferase system » (PTS). En passant à travers ce transporteur, le fructose est phosphorylé en fructose-1-phosphate (F1P). La réaction de phosphorylation est possible grâce à un transfert de phosphate en cascade comme présenté Figure 9 :

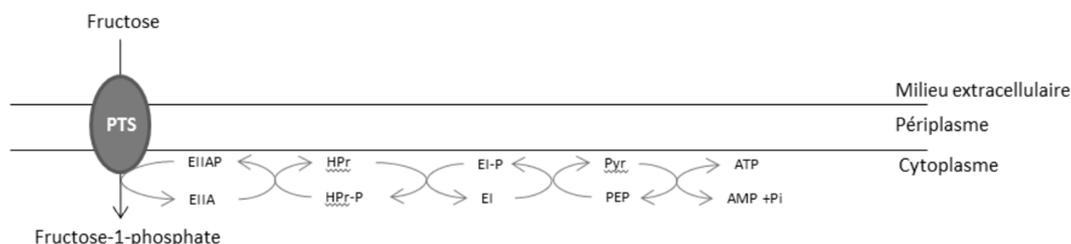


Figure 9 : Schéma représentant la perméase PTS pour le fructose (Chavarría et al. 2012)

Les pentoses, comme le D-xylose ou le L-arabinose, ne sont naturellement pas assimilés chez *P. putida*, tandis que certains autres membres de la famille des *Pseudomonas spp.* fluorescents peuvent assimiler 3 sucres à 5 carbones (xylose, ribose et arabinose).

Une fois incorporés, les voies cataboliques du glucose et du fructose convergent vers la production de phosphoénolpyruvate (PEP) et de pyruvate prêts à entrer dans le cycle tricarboxylique (cycle TCA).

Le glucose est, donc d'abord, phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P), puis transformé en gluconate-6-phosphate par action NADPH-dépendante de la G6P déshydrogénase. Ce dernier composé peut aussi être obtenu à partir du gluconate et du 2-cétogluconate intégrés depuis le périplasma. Le gluconate-6-phosphate est le composé clé pour l'entrée dans la voie d'Entner-Doudoroff. Cette voie débute par la déshydratation de ce composé en 2-céto-3-déoxygluconate-6-

phosphate qui sera alors décomposé en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et en pyruvate par action d'une aldolase.

Le fructose-1-phosphate intracellulaire est de nouveau phosphorylé en Fructose-1,6-diphosphate, puis va ensuite suivre la voie d'Embden-Meyerhoff Parnas (EMP), aussi connue sous le nom de glycolyse. Le glucose, lui, n'est pas capable de suivre cette voie du fait de l'absence de 6-phosphofruktokinase chez ce microorganisme qui permet le passage du Fructose-6-Phosphate (F6P) en Fructose-1,6-diphosphate (F1,6P). De plus, l'activité phosphogluco-isomérase est très faible, ce qui limite l'isomérisation du G6P en F6P (Latour & Lemanceau, 1998).

## III.2 Métabolisme des acides gras

### III.2.1 Voie de dégradation des acides gras : la $\beta$ -oxydation

D'après S. H. Lee et al. (2005), le catabolisme des acides gras commence par une sécrétion par la cellule de lipases qui vont hydrolyser les triglycérides et ainsi libérer les acides gras. Cette sécrétion à travers la membrane externe se fait via la protéine membranaire OprF, qui comporte un motif d'ancrage en son extrémité C-terminal. Toutefois, on trouve des avis divergents dans la littérature. En effet, Pabai et al. (1995) et Silva-Queiroz et al. (2009) suggèrent que *P. putida* KT2440 ne produit pas de lipases contrairement à *Pseudomonas aeruginosa*, alors que Seoung Yong Lee & Rhee, 1994 affirment que l'hydrolyse des triglycérides dans le milieu de culture est performante.

Les acides gras peuvent être transportés au sein de la cellule via deux transporteurs, un présent sur la membrane externe et le second sur la membrane interne. Le transporteur externe FadL permet aux acides gras d'arriver dans le périplasma tandis que FadD va envoyer ces acides gras dans le cytosol en les activant via l'intervention d'un acyl-CoA synthétase peu spécifique qui va transformer les acides gras en acyl-Coenzyme A (Latour & Lemanceau, 1998). Cette réaction nécessite la double hydrolyse d'un ATP en AMP pour chaque activation. Ce système de transport est complété par FadR qui est un régulateur transcriptionnelle qui va inhiber la voie de biosynthèse des acides gras (Dirusso & Black, 2004). L'action de l'acyl-CoA synthétase nécessite des ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et potassium ( $K^+$ ) (Fulco, 1983). Une fois présent au sein de la cellule, les acyl-CoA vont entrer dans la voie de la  $\beta$ -oxydation qui va conduire en leur dégradation jusqu'à atteindre la forme d'acétyl-CoA. Cette voie, cyclique, est composée de 4 réactions enzymatiques successives (Acyl-CoA déshydrogénase, enoyl-CoA hydratase, Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et  $\beta$ -cétotiolase). La chaîne carbonée va perdre deux carbones sous forme d'acétyl-CoA à chaque tour de cycle. Le bilan d'un tour de cette voie est le suivant :



Le produit final de la  $\beta$ -oxydation, l'acétyl-CoA participe ensuite au métabolisme central de la bactérie. Toutefois, avant d'être entièrement dégradés, les intermédiaires R-3-hydroxyacyl-CoA peuvent être pris en charge par la voie de biosynthèse des PHA (voir V.5).

Dans le cas d'acide gras insaturés, les acyl-CoA ayant pénétré dans le cytoplasme subissent des tours de cycles de dégradation jusqu'à atteindre une double liaison en position 3 par rapport à la fonction acide carboxylique (*trans*- $\Delta^3$ -enoyl-CoA). A ce moment, une enoyl-CoA isomérase change la double liaison de position pour la faire passer en position 2 et produire des *trans*- $\Delta^2$ -enoyl-CoA. Ces derniers suivent ensuite la voie normale de la  $\beta$ -oxydation (Schulz, 1991).

### III.2.2 Voie de biosynthèse des acides gras

En condition de croissance, la cellule va fabriquer des acides gras pour le renouvellement ou la croissance des membranes plasmiques. Cette voie débute par la prise en charge de deux acétyl-CoA qui vont se condenser ou d'un acétyl-CoA qui va s'ajouter à un acyl-ACP (molécule carbonée qui a déjà subi plusieurs cycles de la voie de biosynthèse des acides gras). La réaction est catalysée par une  $\beta$ -cétotiolase. L'acétyl-CoA ajouté, va donc libérer son coenzyme A pour allonger la chaîne carbonée, en synthèse, de deux carbones. L'acyl-ACP auquel se sont ajoutés ces deux carbones devient un 3-cétoacyl-ACP. Ce dernier sera ensuite transformé en R-3-hydroxyacyl-ACP via l'action NADPH-dépendante de la 3-cétoacyl-ACP-réductase. Le cycle se poursuit par une déshydratation en 2-*trans*-enoyl-ACP par la 3-hydroxyacyl-ACP- déshydratase et enfin se termine par le retour à une forme acyl-ACP grâce à l'autre enzyme NADPH-dépendante, appelée enoyl-ACP réductase (G. N. Huijberts et al. 2001). L'ensemble de ces réactions est effectué au sein d'un complexe enzymatique appelé FAS, à l'exception de la réaction de condensation qui se fait par action de l'acétyl-CoA carboxylase. Dans ce complexe, les intermédiaires carbonés passent successivement de sites actifs en sites actifs, jusqu'à ce qu'un acide gras destiné à la synthèse de membrane soit finalisé (Fulco, 1983) ou jusqu'à ce qu'il soit pris en charge par la R-3-hydroxyacyl-(ACP-CoA) transférase, puis la PHA synthase pour la synthèse de polymères en condition de croissance limitée par un élément nutritionnel (voir III.6.1).

### III.3 Métabolisme du glycérol

Le catabolisme du glycérol chez la souche *P. putida* est encore peu connu. Toutefois, les informations provenant de *Pseudomonas aeruginosa* peuvent servir de base de connaissance. Le glycérol est également un substrat d'intérêt car il représente une part non négligeable du carbone que l'on peut trouver dans les graisses animales et huiles végétales (environ 15% du carbone présent). Le glycérol pénètre au sein de la cellule via une porine OprB située sur la membrane externe (la même que pour le glucose). Celle-ci est surexprimée en condition de limitation en glycérol (Williams et al. 1994). Une protéine Glp facilite le transport du glycérol à travers cette porine. Il est associé à une protéine kinase (Glycérol kinase, GlpK), qui va convertir le glycérol en glycérol-3-phosphate (Schweizer et al. 1996). Enfin, l'enzyme cytoplasmique GlpD transforme la forme phosphorylée du glycérol en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) grâce à son activité déshydrogénase. Ce DHAP est ensuite catabolisé par la voie d'Entner-Doudoroff. L'opéron *glp* de *Pseudomonas aeruginosa* peut être régulé négativement par le répresseur GlpR (Schweizer & Po 1996).

Plusieurs auteurs relatent le fait qu'en croissance sur glycérol seul, une longue phase de latence est observée, pouvant atteindre une dizaine d'heures (Escapa et al. 2013). L'ajout d'un co-substrat carboné permet de réduire cette latence en induisant l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Miura et al. 2013).

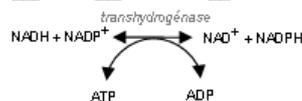
Le glycérol est donc *in fine* transformé en acétyl-CoA. En condition de limitation nutritionnel autre que carbonée, l'acétyl-CoA excédentaire va être orienté vers la voie de biosynthèse des acides gras, rendant ainsi disponibles des précurseurs de monomères de PHA à la PHA synthase (voir III.6.1).

### III.4 Métabolisme central de *P. putida* KT2440

Chez *P. putida*, le métabolisme central est très dépendant du nœud Phosphoénolpyruvate-Pyruvate-Oxaloacétate qui va être le diviseur majeur des flux de carbone vers l'anabolisme, le catabolisme et l'énergie à fournir à la cellule (Chavarría et al. 2012).

De plus, le métabolisme central de cette souche est affecté par la source carbonée initiale. En effet, en croissance sur glucose, l'activité GTP-dépendante de la phosphoénolpyruvate carboxykinase est, par exemple, très faible, alors que sur fructose elle prend une plus grande part dans la synthèse de phosphoénolpyruvate. Dans le cas du glucose, l'activité NADPH-dépendante de l'enzyme malique qui transforme le malate en pyruvate est très active. Ces différences, causées par les sources carbonées, est due à la répartition des catabolismes de ces sucres. Le glucose est quasi exclusivement dégradé via la voie d'Entner-Doudoroff (95%) et légèrement par la voie des pentoses phosphates (5%) tandis que le fructose est dégradé à hauteur de 45% par la voie d'Entner-Doudoroff, 35% via la glycolyse et 20% via la voie des pentoses phosphates (Chavarría et al. 2012).

Le métabolisme central a également pour mission la génération de  $\text{NADPH}_2$  pour la biosynthèse, de  $\text{NADH}_2$  pour l'énergie et de pouvoir réducteur pour agir sur les stress environnementaux et endogènes oxydatifs (Chavarría et al. 2012). La génération des cofacteurs  $\text{NADPH}_2$  peut se faire de quatre façons chez *P. putida*. La première réaction permettant la réduction du  $\text{NADP}^+$  est réalisée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, responsable de la synthèse de gluconate-6-P à partir de glucose-6-P. La seconde voie est la réaction catalysée par l'enzyme malique et la troisième, celle de l'isocitrate déshydrogénase au niveau du cycle de Krebs. La 4<sup>ème</sup> possibilité vient de la présence de l'activité transhydrogénase qui catalyse la réaction suivante :



Le cycle tricarboxylique de *P. putida* ne passe pas par l'activité malate déshydrogénase qui transforme le malate en oxaloacétate d'après Fuhrer et al. 2005. Le malate serait préférentiellement pris en charge par le shunt pyruvate où l'enzyme malique va le convertir en pyruvate, qui deviendra de l'oxaloacétate par action de la pyruvate carboxylase. Chavarría et al. 2012 considère, lui, que l'activité de cette enzyme est dépendante de la source carbonée initiale mais que son activité reste dans tous les cas importante.

Pour produire de la biomasse, certains précurseurs sont indispensables. C'est le cas pour le ribose-5-phosphate et l'erythrose-4-phosphate. Pour les synthétiser, des enzymes de la voie des pentoses phosphate catalysent les réactions suivantes à partir du 6-phosphogluconate et du fructose-6-phosphate (Ebert et al. 2011) (Figure 10).

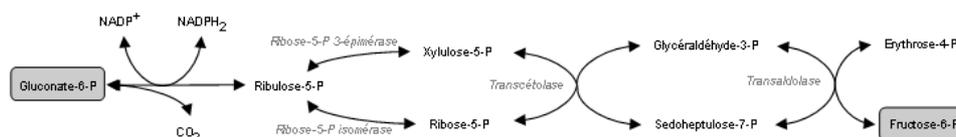


Figure 10 : Schéma de la voie des pentoses phosphates chez *P. putida* (Ebert et al. 2011)

[Ressource électronique : disponible sur <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/1PentosePhosphate/1PentosePhosphate.htm>]

### III.5 Chaînes respiratoires de *P. putida* KT2440

La chaîne respiratoire chez *P. putida* comprend quatre complexes au sein de sa chaîne de transfert :

- Le complexe I transfère les électrons apportés par le NADH vers l'ubiquinone ou la menaquinone, tous deux transporteurs d'électrons. Celui-ci se nomme NADH déshydrogénase.
- Le second, la succinate déshydrogénase transmet les électrons via la réaction d'oxydation du succinate et réduit le FAD en FADH<sub>2</sub>
- Les transporteurs d'électrons précédemment cités transfèrent les électrons au complexe III (Cytochrome C oxydoréductase), puis au complexe IV (Oxydases terminales). Cela va servir à réduire l'oxygène. Il semble exister plusieurs types de complexes IV.

*P. putida* a une haute capacité de régénération du NADH. Elle est également capable de découpler la génération d'ATP et celle de NADH en redirigeant la dégradation du glucose de la voie phosphorylative vers une voie directe oxydative via les glucose et gluconate déshydrogénases. En effet, comme présenté Figure 11, chaque étape d'oxydation périplasmique libère deux électrons qui servent à la réduction de la pyrroloquinoline quinone (PQQ), composant très antioxydant de la chaîne respiratoire de la souche. La pyrroloquinoline quinone va ensuite transférer ces électrons à l'ubiquinone.

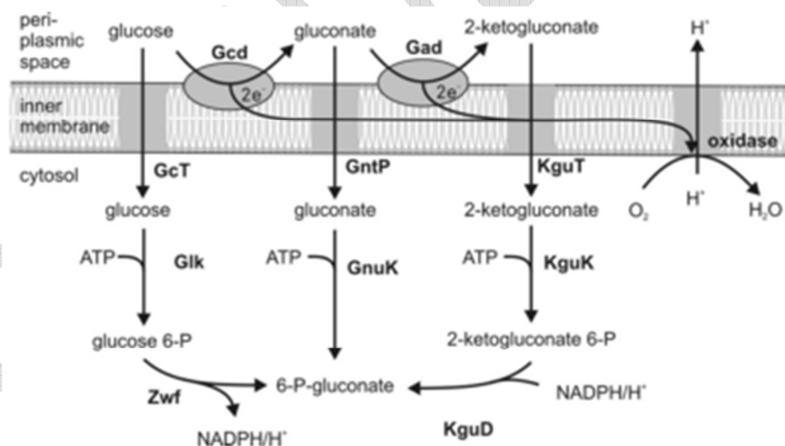


Figure 11 : Schéma représentant le découplage entre la génération d'ATP et de NADH chez *P. putida* (Ebert et al. 2011)

Les différentes réactions de transferts d'électrons entre oxydases jusqu'à l'accepteur final sont couplées à un transfert de protons à travers la membrane. Ce gradient de protons est ensuite utilisé pour diriger la production d'ATP via l'ATP synthase (Ebert et al. 2011). En aérobie, l'accepteur final est toujours l'oxygène atmosphérique (Latour & Lemanceau 1998). Le schéma de cette chaîne respiratoire est présenté sur la Figure 12.

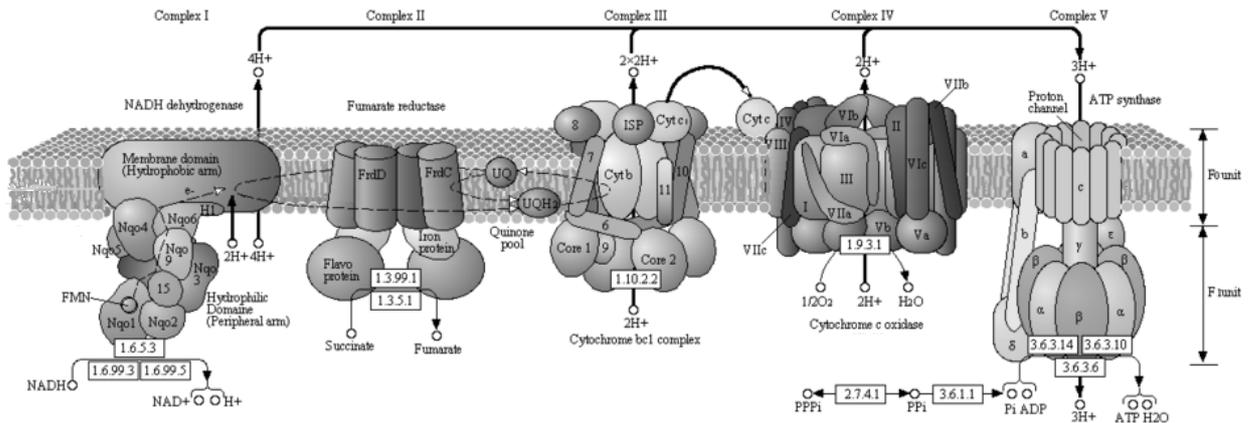


Figure 12 : Schéma représentant la chaîne respiratoire. Source Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Ressource électronique] KEGG PATHWAY, disponible sur <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>, Oxidative phosphorylation

### III.6 Métabolisme de production des PHA

*P. putida* KT2440 a la capacité de biosynthèse de nombreux types de monomères d'hydroxyalcanoates à moyennes chaînes latérales permettant la synthèse de différents hétéro-polymères. La souche sauvage peut, en fonction du substrat qui lui est fourni, produire différents monomères de PHA ayant entre 6 et 14 carbones, comme ceux présentés dans le Tableau 5 ci-dessous :

Tableau 5 : Motifs de 3-HA synthétisés par *P. putida* et les substrats nécessaires à leur obtention

PHA majoritaires	Substrats	Références
3-HO, 3-HD	Glucose	Huijberts et al. 1992
3-HO, 3-HD	Glucose + Fructose	Sanchez et al. 2003
3-HHx, 3-HO, 3-HD	Acide Oléique	S Y Lee et al. 2000
3-HUD, 3-HN	Acide Undécanoïque	Kim et al. 1995
3-HHp, 3-HN	Acide Nonanoïque	Sun et al. 2007a

#### III.6.1 Voies de biosynthèse de PHA chez *P. putida* KT2440

Il existe deux voies de biosynthèse de PHA chez *P. putida*. Dans les deux cas, cette production est liée aux métabolismes des acides gras. Cette biosynthèse est nécessaire à la cellule car elle permet de canaliser l'excès d'énergie pouvant être présent et ainsi maintenir la balance énergétique (Russell, 1995). L'utilisation de la  $\beta$ -oxydation ou de la voie de biosynthèse des acides gras sera déterminée par la source carbonée utilisée pour la production de ces polymères. En cas d'alimentation en substrats carbohydrates, la voie de biosynthèse sera empruntée, tandis que sur substrats de type lipidiques, c'est la voie de dégradation des acides gras qui sera privilégiée. Ces deux voies ont été précédemment décrites (cf. III.2).

La réaction de l'énoyl-CoA hydratase à partir de *trans*- $\Delta^2$ -énoyl-CoA de la  $\beta$ -oxydation permet l'obtention des deux énantiomères R et S-3-hydroxyacyl-coA. La forme R peut être prise en charge par les PHA synthases de *P. putida* quel que soit la longueur de la chaîne acyl.

Dans la voie de biosynthèse des acides gras, l'intermédiaire R-3-hydroacyl-ACP peut être converti en R-3-hydroxyacyl-CoA par une enzyme appelé PhaG, qui est une transacylase. Cela va rendre l'intermédiaire disponible à l'action des PHA synthases. Ces transacylases sont retrouvées dans le cytosol et non dans ou sur les granules de PHA (Hoffmann et al. 2002).

Les protéines impliquées dans la synthèse de PHA chez *P. putida* sont codées par des gènes présents sur un même opéron schématisé dans la Figure 13 ci-dessous:

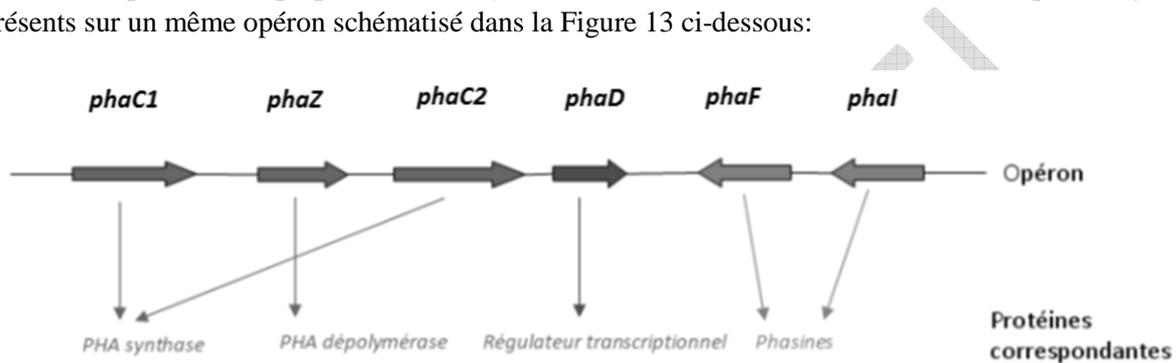


Figure 13 : Représentation de l'opéron PHA contenant les gènes codant pour les enzymes et protéines impliquées dans la synthèse des PHA et des inclusions chez *P. putida* KT2440 (de Eugenio et al. 2010)

Les PHA synthases catalysent la réaction stéréosélective transformant les R-3-hydroxyacyl-CoA en PHA (Haywood, 1989 ; Sudesh et al. 2000). Chez *P. putida*, elles sont codées par les gènes *phaC1* et *phaC2*. Celles-ci peuvent agir sur des substrats comportant des nombres variables de carbones dans leur chaîne carbonée. On retrouve ces enzymes dans les membranes de granules de PHA. La concentration en PHA synthase joue un rôle prépondérant dans le contrôle du poids moléculaire du polymère. Le poids moléculaire du polymère est inversement proportionnel à la concentration en PHA synthase (Sim et al., 1997).

Les gènes *phaF* et *phaI* codent pour les protéines membranaires appelées phasines que l'on retrouve également sur les membranes des inclusions de PHA. PhaF a un rôle de régulateur alors que PhaI a plus un rôle fonctionnel.

Le gène *phaD* code pour un régulateur transcriptionnel putatif (de Eugenio et al. 2010).

### III.6.2 Dégradation des PHA

Au sein de *P. putida*, la dégradation des PHA est une réaction simple catalysée par les PHA dépolymérase codées par le gène *phaZ* (Figure 13). Ces enzymes sont situées sur les membranes des granules de PHA. Elles vont dégrader les PHA et libérer des R-3-hydroxyacyl-CoA. Ces molécules seront alors prises en charges par les voies de dégradation ou de biosynthèse des acides gras en fonction du besoin de la cellule.

### III.6.3 Equilibre Biosynthèse-Dégradation des PHA

La synthèse et la dégradation des PHA opèrent, en réalité, comme un cycle continu chez *P. putida* impliquant la PHA dépolymérase (PhaZ), l'acyl-CoA synthétase (Acs ou FadD) et la PHA synthase (PhaC1 ou PhaC2). Ce cycle, présenté Figure 14, inclus la consommation d'une molécule d'ATP à chaque tour.

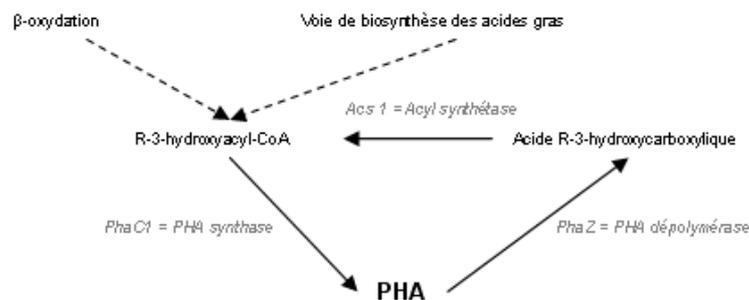


Figure 14 : Schéma représentant le cycle de couplage de la synthèse et de la dégradation des PHA (de Eugenio et al. 2010; Escapa et al. 2012; Ren et al. 2009)

Ce cycle joue un rôle tampon qui équilibre la dissipation d'énergie et la disponibilité des sources carbonées en consommant lui-même de l'énergie pour effectuer une réaction futile. Le surplus d'énergie est donc utilisé via ce cycle pour équilibrer la production de biomasse et la division cellulaire (de Eugenio et al. 2010; Escapa et al. 2012). Les trois enzymes de ce cycle sont localisées sur la membrane des granules de polymères. Chez *P. putida*, deux acyl-CoA synthétases ont été identifiées (FadD1 et FadD2 ou Acs1 et Acs2).

### III.7 Initiation et régulation de l'accumulation de PHA

La régulation de la synthèse des PHA est complexe car elle est exercée à différents niveaux. En premier lieu, on trouve la régulation enzymatique, les inhibitions par les cofacteurs et les influences des disponibilités en métabolites. En second lieu, on retrouve les régulations transcriptionnelles. Ces facteurs de régulations transcriptionnelles peuvent être spécifiques ou globaux (de Eugenio et al. 2010; Kessler & Witholt, 2001). Les systèmes de régulations agissant sur la production de MCL-PHA restent néanmoins assez peu connus.

La production et l'accumulation des PHA au sein de la cellule sont déclenchées quand la croissance rencontre une limitation nutritionnelle (N, O, P, S,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , Mn, Co, Cu, Ca, Sn (Koller et al. 2010)). Chacun de ces éléments joue un rôle physiologique différent, mais une limitation en l'un d'entre eux entraîne une réponse similaire chez la bactérie. Les mécanismes de contrôle

doivent intervenir de manières identiques (Babel et al. 2001). Il existe une autre voie possible pour l'induction de l'accumulation de PHA au sein de la cellule. En effet, lors d'une croissance contrôlée à un taux de croissance inférieur au potentiel anabolique maximal de la souche ( $\mu_{max}$ ) par une alimentation maîtrisée en un élément limitant, un excès en source carbonée va désorganiser l'anabolisme de la bactérie. Celui-ci ne sera pas en mesure de s'adapter rapidement et donc stockera cet excès de carbone sous forme de PHA. C'est d'ailleurs ce principe qui est utilisé dans le « Feast & Famine », technique d'enrichissement dans la sélection de consortium (Muller et al. 1999).

Dans cette étude, des précisions sur les limitations en oxygène, azote et phosphate seront apportées.

### III.7.1 Limitation en oxygène

La limitation oxygène provoque un manque en accepteurs finaux d'électrons pour la chaîne respiratoire. De ce fait, les cofacteurs réduits ne peuvent pas être ré-oxydés. Par conséquent, l'activité de la citrate synthase, qui transforme l'oxaloacétate en citrate via l'addition d'un acétyl-CoA, est inhibée par ces cofacteurs réduits qui s'accumulent ( $NADH_2$  et  $NADPH_2$ ) (Sang Yup Lee, 1996). Sans  $NAD^+$  et  $NADP^+$  disponibles, l'activité du cycle de Krebs est réduite et l'acétyl-CoA s'accumule dans la cellule entraînant une réorientation du flux de carbone intracellulaire (Babel et al., 2001).

### III.7.2 Limitation en azote ou phosphore

Les limitations en azote et phosphore réduisent les potentialités d'utilisation de l'acétyl-CoA et du  $NAD(P)H_2$ . Par exemple, le  $NAD(P)H_2$  ne peut plus être utilisé par les voies anaboliques comme celles permettant la synthèse d'acides aminés. De ce fait, comme dans le cas de la limitation en oxygène, ce composé s'accumule et réduit le cycle de Krebs en inhibant l'activité de la citrate synthase. Par conséquent, l'acétyl-CoA s'accumule également et est donc beaucoup plus disponible pour la synthèse des PHA via la voie de biosynthèse des acides gras (Babel et al., 2001). Cette dernière n'est par ailleurs pas du tout affectée par le ratio C/N d'après Lee (1993).

Une carence en azote a un inconvénient non négligeable par rapport à une simple limitation. En effet, la carence totale entraîne une perte d'activité microbienne importante pour l'accumulation des polymères (Du, 2000). Dans le cas du phosphore, la carence ne bloque pas la synthèse protéique, mais l'accumulation de protéines ne suffit pas à optimiser la production de PHA (Aragão, 1996). La limitation nutritionnelle permet de mettre en place une association croissance et production, de manières simultanées.

Dans le cas de la limitation azote, le rapport C/N joue un rôle clé sur l'accumulation en PHA. A un rapport C/N initial trop élevé, les synthèses en biomasse et en PHA pourraient être inhibées par un effet toxique lié au substrat carboné (G N M Huijberts & Eggink, 1996). A l'inverse un rapport trop faible entrainera une inhibition par excès d'ions ammonium (Annauer et al. 2007). L'influence du rapport C/N sur les concentrations en biomasse et PHA décrite par Huijberts & Eggink (1996) en culture chémostat est présentée sur la Figure 15.

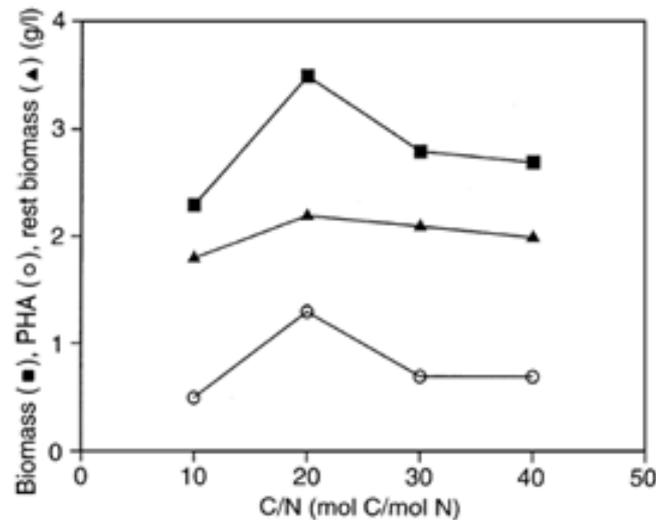


Figure 15 : Influence du rapport C/N sur la concentration en biomasse catalytique et PHA en chemostat à un taux de dilution  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$  (G N M Huijberts & Eggink, 1996)

Le rapport C/N va surtout imposer la distribution du carbone entre synthèse de biomasse catalytique et production de PHA. Celui-ci peut être associé à un rapport  $q_{PHA} / \mu$ . Grousseau (2012) et Aragão (1996) ont montré l'existence d'une corrélation entre  $q_{PHA}$  et  $\mu$  pour la synthèse de PHB-co-HV à partir de *Cupriavidus necator* sur des substrats de types acides organiques volatiles et carbohydrates en limitation phosphore.

### III.7.3 Régulation enzymatique des PHA

En résumé, lorsque le substrat est du glycérol ou des carbohydrates, les conditions indispensables à la synthèse de PHA sont une forte concentration intracellulaire en NAD(P)H<sub>2</sub>, un fort ratio NAD(P)H<sub>2</sub>/NAD(P)<sup>+</sup>, une forte concentration en CoA-SH et en acétyl-CoA. Tous ceux-ci inhibent la dégradation des PHA même s'il y a toujours une petite part de PHA dégradés en permanence (Doi, 1990).

### III.7.4 Régulation transcriptionnelle

Le gène *phaD* code pour un régulateur transcriptionnel putatif (de Eugenio et al. 2010). PhaS est également un régulateur putatif constitué de deux sous-unités : l'une est une protéine histidine kinase et l'autre est un domaine de réponse au régulateur (Madison & Huisman, 1999).

PhaF joue un rôle de régulateur en se liant à l'ADN en absence de substrats nécessaire à la production de PHA, ce qui inhibe la transcription des gènes *pha*. Quand les granules se forment, la liaison à l'ADN est réduite et les gènes *pha* sont exprimés (Valentin et al. 1999).

RpoN est un régulateur négatif de la transcription de *phaF* quand il y a suffisamment d'azote pour que la cellule puisse effectuer sa croissance. C'est un facteur  $\sigma$  dont le gène codant pour sa synthèse est situé en amont des gènes de *phaC1* et *phaF* (Hoffmann & Rehm, 2005).

### **III.8 Poids moléculaire des PHA et ses facteurs d'influence**

Le poids moléculaire des PHA est directement lié à la longueur du polymère et donc au nombre de monomères liés les uns aux autres. Ce paramètre est dépendant de différents facteurs influençant sa valeur. Les concentrations en monomères 3-hydroxyacyl-CoA et en PHA dépolymérase sont déterminantes. En effet, plus la concentration de dépolymérase est importante, plus le poids moléculaire sera faible (Grage et al. 2009). Plus le niveau d'expression des PHA synthases est élevé, plus le nombre de granules dans la cellule est important (Jung et al. 2001) et plus le poids moléculaire est faible.

La concentration en phasines a un impact sur la taille, le nombre, le ratio surface/volume des inclusions (Zinn et al. 2001). Ces protéines, très présentes sur les membranes des inclusions, servent d'interface entre le cytoplasme hydrophile et le centre hydrophobe de l'inclusion de par sa propriété amphiphile.

CONFIDENTIEL

## **Conclusion**

En Europe, les lipides d'origines animales, issus de l'abattage et des industries de transformation, représentent plus de 500 000 t par an. Leur utilisation pour la production de biodiesel par transestérification alcaline est estimée à 50.000 t annuel (Muhr et al. 2013). Cette ressources n'est donc pas totalement valorisée et dispose d'un gisement important. La première motivation de ces travaux de thèse est la production de PHA à moyennes chaînes latérales à partir de ce type de déchets issus du secteur agricole. A l'heure actuelle, peu de procédés de cultures pour la production de ces MCL-PHA existent à l'échelle industrielle.

Le choix d'utiliser la souche *P. putida*, micro-organisme capable d'assimiler un grand nombre de substrats différents, est aussi bien dicté par ses performances présentées dans la littérature, que par son statut de microorganisme modèle. Il en ressort la possibilité d'obtenir une grande variété de motifs de 3-hydroxyalcanoates en fonction du type de substrats utilisés. L'exploitation de cette capacité permet de proposer une large gamme de matières plastiques aux propriétés diverses.

Parmi les lipides d'origines animales, les substrats simples présents sont le glycérol et les acides gras. Ces derniers sont insolubles dans les milieux aqueux et donc nécessitent la mise en œuvre de culture de type Fed-Batch afin d'éviter leur accumulation dans le milieu réactionnel.

En conditions stabilisées, la production de PHA est déclenchée par une limitation nutritionnelle. La plus communément utilisée est la limitation azote, qui est celle choisie dans cette étude. L'influence du degré de limitation sur la physiologie du micro-organisme et sur les cinétiques et rendements de production de PHA sera examinée.

L'étude bibliographique a également permis de présenter un bilan des connaissances du métabolisme hétérotrophe de la souche étudiée. Les catabolismes des substrats acides gras, glycérol et carbohydrates ont été considérés.

L'objet principal de l'étude est donc l'utilisation de graisses de canard par *P. putida*. Dans ces conditions, il est important de déterminer le potentiel de production à partir des substrats simples les constituant :

- au niveau stœchiométrique (rendements)
- au niveau cinétique (vitesses spécifiques maximales, productivité)
- au niveau des capacités d'accumulation maximale (taux massique de PHA dans les cellules)

Il est également nécessaire de comprendre l'impact de la nature du substrat sur la physiologie du microorganisme, sur la composition monomérique et les propriétés du polymère produit.

Dans la partie A, une caractérisation stœchiométrique de la souche sera réalisée, via l'utilisation d'un descripteur métabolique, lorsque la production de PHA et une croissance résiduelle sont effectuées en simultanée à partir d'acides gras.

Dans la partie B, une analyse cinétique et stœchiométrique de la souche à partir de différents substrats simples présents dans les graisses de canard est menée.

La partie C va décrire les paramètres pouvant influencer sur la composition monomérique et les propriétés plasturgiques du polymère final.

Enfin, la partie D présentera l'étude de faisabilité du procédé général de production de PHA à partir de graisses de canard.

# MATERIELS & METHODES

## I- Réalisation des cultures

### I.1 Souche

Le microorganisme utilisé est une souche *P. putida* KT2440 (ATCC 47054<sup>TM</sup>).

### I.2 Milieux de culture

#### I.2.1 Milieu de culture solide

La composition du milieu riche solide est décrite dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Composition du milieu riche LB solide

Composé	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )
Tryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	5
Agar Type A	20

#### I.2.2 Milieu de culture liquide

##### I.2.2.1 Milieu riche liquide

La composition nutritive du milieu liquide est identique à celle du milieu solide (voir Tableau 7)

Tableau 7 : Composition du milieu riche LB liquide

Composé	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )
Tryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	5

##### I.2.2.2 Milieu Minéral

Les éléments qui composent les milieux de culture peuvent être classés en trois catégories :

- les éléments constitutifs qui sont essentiels pour la production de biomasse. Il s'agit du carbone, de l'oxygène, de l'hydrogène, de l'azote, du soufre et du phosphore ;
- les éléments catalytiques qui interviennent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques. On y trouve le fer, le cuivre, le magnésium, le manganèse ou encore le cobalt, etc.) ;

## Matériels & Méthodes

- les autres éléments, qui permettent de maintenir l'homéostasie cellulaire (le sodium, le potassium, etc.).

Les cultures Fed-batch de cette thèse sont divisées en deux étapes :

- Une phase de croissance pure pour atteindre rapidement une valeur de concentration de biomasse catalytique jusqu'à épuisement de l'azote initial du milieu minéral.
- Une phase de production associée à une croissance nutritionnellement limitée pouvant atteindre les 100 g.L<sup>-1</sup> de biomasse totale.

Il est impossible d'amener initialement l'ensemble des sels nécessaire à l'atteinte de cette concentration cible en biomasse. De ce fait, le milieu minéral initial sera complété au cours de la culture par une alimentation en solution saline. La concentration en biomasse catalytique obtenue en fin de phase de croissance sera déterminée par la concentration initiale de l'élément limitant sélectionnée.

L'azote, comme le phosphore (Aragao, 1996), peuvent être choisis comme élément limitant inducteur de la biosynthèse de PHA avec le maintien de vitesses spécifiques de production de polyhydroxyalcanoates élevées. Or, comme le développe E.Grousseau (2012), le taux de phosphore intrinsèque de la biomasse catalytique ( $P_{int}/X_{cat}$ ) n'est pas un critère discriminant suffisant pour contrôler précisément la distribution du carbone entre la synthèse de biomasse catalytique et la production de PHA. En effet, cette croissance cellulaire est également dépendante de la disponibilité en carbone. Or, le carbone peut être utilisé par les voies de l'anabolisme et catabolisme énergétique mais aussi pour la synthèse des PHA selon des dynamiques dictées par cette teneur intracellulaire en phosphore. L'équation 1 décrit le bilan élémentaire du phosphore au sein de la cellule.

$$\frac{dP}{dt} = \varphi_P^X - \mu(P) \cdot P \quad \text{Équation 1}$$

Avec,  $\frac{dP}{dt}$  : le flux d'accumulation intracellulaire en phosphore

$\varphi_P^X$  : le flux net d'échange du phosphore par la cellule

$\mu(P)$  : le taux de croissance dépendant de la concentration intracellulaire en phosphore

Dans le cas du phosphore, le flux d'accumulation  $\frac{dP}{dt}$  est variable. Ne connaissant pas la relation pouvant décrire le taux de croissance  $\mu$  en fonction de la concentration intracellulaire en phosphore, il est très compliqué de contrôler  $\mu$ . De plus, ce ratio  $P_{int}/X_{cat}$  variant, il est impossible d'assurer un flux de carbone lié à la croissance du flux de phosphore. Tous ces phénomènes rendent la définition d'un point de fonctionnement optimal lié à un degré de limitation en phosphore très complexe. C'est pourquoi l'azote est choisi comme l'élément limitant pour l'intégralité de ces travaux de thèses. Comme le montre l'équation 2 ci-dessous :

$$\frac{dN}{dt} = \varphi_N^X - \mu(N) \cdot N \quad \text{Équation 2}$$

Avec,  $\frac{dN}{dt}$  : le flux d'accumulation intracellulaire en azote

## Matériels & Méthodes

$\varphi_N^X$  : le flux net d'échange de l'azote par la cellule

$\mu(N)$  : le taux de croissance dépendant de la concentration intracellulaire en azote

Le flux d'accumulation  $\frac{dN}{dt}$  étant quasi nul, la teneur en azote intracellulaire est quasi constante. De ce fait, le taux de croissance est directement contrôlé par le flux d'azote alimentant le milieu réactionnel. La concentration en azote dans le milieu minéral initial est donc adaptée en fonction des stratégies de culture définies.

Le dimensionnement du milieu minéral a été réalisé via l'utilisation d'un logiciel Excel mis au point par Jean-Louis Uribe Larrea au LISBP. Le but est de mettre au point un milieu de culture ne présentant pas de limitations nutritionnelles permettant d'atteindre une concentration de biomasse visée pour des caractéristiques optimales à la croissance du microorganisme et des variables environnementales fixées, telles que le pH, la pression osmotique et le pouvoir tampon.

Il s'agit, ensuite, d'établir un modèle de rendements élémentaires respectant les spécificités nutritionnelles de *P. putida* KT2440. Tous ces calculs répondent à l'objectif de concentration en biomasse préalablement fixé.

C'est au travers de données cinétiques de croissance sur milieu minéral issues de la bibliographie que l'on peut identifier les rendements élémentaires. Dans le cas où ces informations sont indisponibles pour la souche d'intérêt (*P. putida* KT2440), les données d'organismes appartenant au même genre pourront être utilisées en substitution, car elles seront relativement proches (ici données collectées sur *Pseudomonas oleovorans* (Preusting et al., 1993)).

A partir de la composition élémentaire établi pour obtenir ces concentrations à chaque fin de phase et afin d'éviter un excès d'un élément par rapport aux autres, les facteurs d'excès de chaque élément par rapport à l'élément limitant sont calculés et doivent être légèrement supérieurs à 1 sauf pour l'élément limitant (égal à 1). Ces facteurs se calculent selon l'équation 3 suivante :

$$F_{E/C} = \frac{Y_{E/C} \cdot C_E}{Y_{E\ limit/C} \cdot C_{E\ limit}} \quad \text{Équation 3}$$

Avec  $F_{E/C}$  le facteur d'excès d'un élément E par rapport au carbone, E un élément entrant dans la composition du milieu, E limit l'élément limitant du milieu,  $C_E$  la concentration en un élément et  $C_{E\ limit}$  la concentration en l'élément limitant,  $Y_{E/C}$  et  $Y_{E\ limit/C}$  les rendements élémentaires (Egli & Fiechter, 1981).

La sélection des sels pour la conception du milieu minéral tient compte de la faisabilité de dissolution de ces sels. L'alimentation en solution saline complémentaire est asservie au flux élémentaire de carbone durant la phase de croissance pure, puis au flux d'azote durant la production de PHA. En respectant les contraintes prises en compte par le logiciel, en minimisant les facteurs d'excès, et avec une limitation par l'azote, on obtient la composition de milieu initial suivant pour atteindre l'objectif de concentration de 10 g.L<sup>-1</sup> (Tableau 8) ou de 3 g.L<sup>-1</sup> (Tableau 9) :

## Matériels & Méthodes

Tableau 8: Composition en sels du milieu minéral initial pour atteindre 10 g.L<sup>-1</sup> de biomasse catalytique

Composé	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	1.00
NH <sub>4</sub> Cl	0.50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.00
Acide citrique, H <sub>2</sub> O	1.09

Tableau 9: Composition en sels du milieu minéral initial pour atteindre 3 g.L<sup>-1</sup> de biomasse catalytique

Composé	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.240
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	1.000
NH <sub>4</sub> Cl	0.500
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,200
Acide citrique, H <sub>2</sub> O	1.090

L'apport en carbone lié à la présence de citrate comme chélatant, dans le milieu minéral initial sera négligé.

Le pH du milieu minéral est ajusté à pH 6.0 par ajout de quelques gouttes d'acide orthophosphorique avant la stérilisation du milieu à l'autoclave 20 minutes à 121°C.

Les oligo-éléments sont préparés en solutions stock concentrées 1000 fois plus que la concentration finale désirée, dans de l'eau osmosée, et sont ensuite filtrées sur des filtres Sartolon polyamide 0.2 µm (Sartorius Stedim biotech, Aubagne, France). 1 mL des solutions de CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O ; FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O ; ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O ; MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O ; CoCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O ; CuCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O et EDTA et 2 mL des solutions de MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O et d'AlCl<sub>3</sub>, 6 H<sub>2</sub>O sont ajoutés par litre de milieu minéral stérile. Les concentrations finales de chaque oligo-élément dans le milieu minéral sont détaillées dans le Tableau 10.

## Matériels & Méthodes

Tableau 10 : Composition du milieu minéral en oligo-éléments

Composé	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	700.00
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	14.00
FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	40.00
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	2.00
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	10.00
CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	4.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	2.00
CuCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	1.00
AlCl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	1.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.00
EDTA	10.00

Une fois l'ajout des oligo-éléments effectués, le pH est réajusté à 6.8 par ajout de KOH 5 M préalablement stérilisé.

Dans le but d'atteindre le second objectif de concentration en biomasse au terme de la phase de production où l'apport en azote est limitant, une solution saline d'alimentation, dont l'apport sera asservi sur celui de l'alimentation azote avec un rapport de  $Q_{sels} = 1/10 Q_{NH_3}$ , permettra d'apporter certains éléments en complément. La composition de cette solution d'alimentation est présentée Tableau 11:

Tableau 11 : Composition de la solution saline

Composé	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	79,813
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,078
CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,019
CuCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,032
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	64,454
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,730
FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0.658

5 mL d'une solution stock de FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O concentrée 1000 fois plus que la concentration finale désirée est ajouté à la solution d'alimentation saline après autoclave. Le pH de cette solution stock a été ajusté à pH 1.0 lors de sa préparation afin de faciliter la solubilité de l'ion ferreux dans l'eau osmosée. La concentration finale en FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O dans cette solution est de 658 mg.L<sup>-1</sup>.

Durant la phase de production en limitation azote, une solution d'ammoniaque alimente le réacteur selon les consignes décidées. En fonction de la stratégie de la culture, cette solution sera plus ou moins concentrée. La solution d'ammoniaque commerciale 30.2% (VWR Chemicals, Fontenay-sous-bois, France) est utilisée soit sans dilution, soit diluée au demi atteignant une concentration avoisinant les 8.8 M, en fonction des stratégies de culture.

## Matériels & Méthodes

Au cours de ces travaux de thèse, différents substrats carbonés ont été utilisés.

Les étapes de précultures et certaines cultures ont nécessité l'utilisation de glucose comme substrat carboné. Le composé utilisé est du dextrose monohydrate (Roquette, France). Afin de limiter l'augmentation du volume réactionnel par ajout de la solution de substrat carboné, les solutions de glucose sont réalisées à chaud pour atteindre une concentration autour de  $700 \text{ g.L}^{-1}$ . Une fois stérilisé par passage à l'autoclave (20 minutes à  $121^\circ\text{C}$ ), la masse volumique des solutions d'alimentation est mesurée grâce à un densimètre DE40 (Metler, Toledo, USA). La détermination de cette masse volumique est basée sur la mesure d'une oscillation mécanique d'un tube en « U » en verre sur lequel est fixé un aimant. Ce tube est la cellule de mesure de l'appareil. Il a un volume interne défini et constant pour une température donnée. L'appareil est calibré avec de l'air et de l'eau à la température de travail préalablement définie.

La solution d'acide gras, utilisée comme substrat carboné pour certaines cultures, (VWR Chemicals, Fontenay-sous-bois, France) a la composition en acides gras suivante : Acide oléique 77%, Acide linoléique 12%, acide palmitique 5% et acide stéarique 3%. Les 3% restant sont d'autres acides gras présents à l'état de traces.

La solution de glycérol, utilisée comme substrat carboné, (VWR Chemicals, Fontenay-sous-bois, France) a une pureté de 98%.

Les graisses de canard, substrat industriel, ont été utilisées. Elles proviennent des abattoirs de la coopérative Vivadour (Gers, France). La composition de ce substrat, fournie par la coopérative, est présentée dans les Tableau 12 & Tableau 13.

Tableau 12 : Composition lipidique des graisses de canard

	Unité	Spécifications	Résultats	Méthodes
Acides gras libres	% (w/w)	< 0.02	0.01	EN 14105
Monoglycérides	% (w/w)	$\leq 0.80$	0.44	EN 14105
Diglycérides	% (w/w)	$\leq 0.20$	0.06	EN 14105
Triglycérides	% (w/w)	$\leq 0.20$	0.01	EN 14105

Tableau 13 : Composition en acides gras lipidique des graisses de canard

Nature de l'ester	Pourcentage massique (%)
C14 : 0 Myristate	0.7
C16 : 0 Palmitate	26.0
C16 : 1 Palmiteate	4.6
C18 : 0 Stéarate	6.3
C18 : 1 Oléate	50.6
C18 : 2 Linoléate	10.9
C18 : 3 Linoléate	0.3
C20 : 0 Eicosanoate	0.1
C20 : 1 Ester gadolénique	0.5

### I.3 Conditions de culture

#### I.3.1 Etapes d'inoculations

Avant d'ensemencer le réacteur d'étude (20 L), un processus de propagation en plusieurs étapes est mené comme présenté dans la Figure 16.

50 à 100  $\mu\text{L}$  issus d'un cryotube sont étalés sur boîtes de Petri et mis en incubation à 30°C pendant 48 h.

A partir d'une colonie, une fiole Erlenmeyer à baffle de 100 mL contenant 10 mL de milieu riche LB est ensemencée. Au terme de 24 h de culture à 30°C sous agitation à 110 r.p.m., les 10 mL sont versés dans une fiole à baffle de 2 L contenant 400 mL de milieu minéral et 8  $\text{g.L}^{-1}$  de glucose.

Cette seconde étape de précultures dure environ 12 h à 30°C et 110 r.p.m., le temps que l'intégralité du glucose soit consommée. La concentration finale en biomasse catalytique est d'environ 4.5  $\text{g.L}^{-1}$ .

Ces deux étapes sont dupliquées afin de pouvoir inoculer le réacteur de 20 L contenant entre 8 et 9 L de milieu minéral avec 800 mL de précultures.

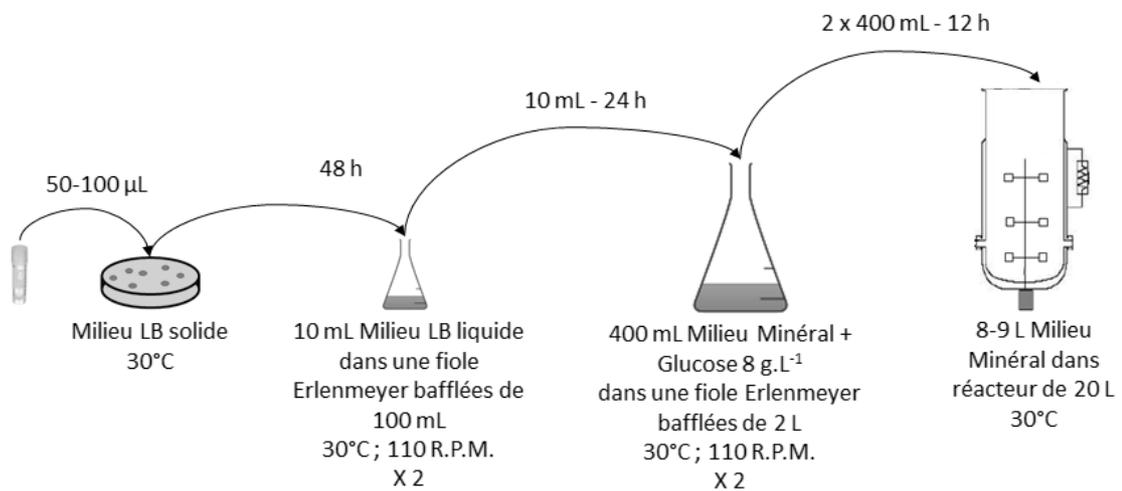


Figure 16: Etapes de propagations

#### I.3.2 Culture en fermenteur de 20 L

##### I.3.2.1 Description générale du fermenteur

La culture en mode Fed-batch est réalisée dans un réacteur (Braun, biostat E, BRAUN DIESSEL, BIOTECH. Melsungen, Allemagne) de 20 litres utiles stérilisable en place (Figure 17).

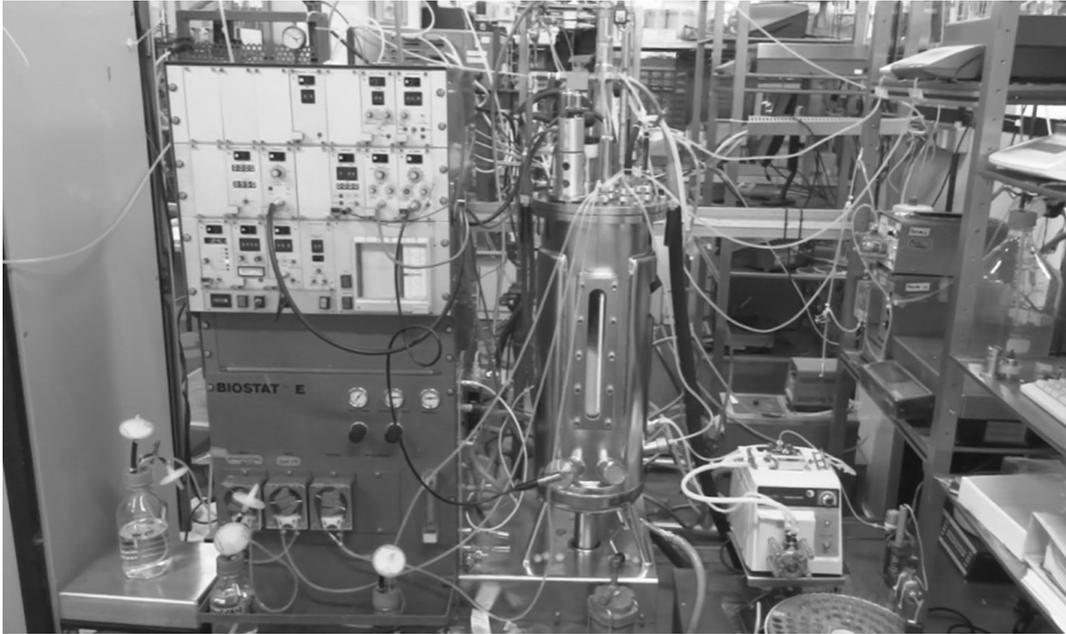


Figure 17 : Dispositif expérimental : fermenteur de 20 L

Le réacteur est connecté à des différents modules de mesures et de régulations, afin d'avoir un suivi en ligne et un contrôle des différents paramètres au cours de la culture (température, pH, pression partielle en oxygène dissous dans le milieu, pression).

La température est régulée par l'intermédiaire d'une double enveloppe dans laquelle circule de l'eau, dont la température est régulée par deux systèmes : un échangeur à plaques et un bain thermostaté. La mesure de température s'effectue par une sonde de température (Biotech International).

La régulation d'une surpression dans le réacteur est possible grâce à la mesure apportée par la sonde du bioréacteur, qui va commander le pourcentage d'ouverture de l'électrovanne présente au niveau de la sortie des gaz de la culture.

Le pH est mesuré par sonde FermProbe F600 (Broadley-James Corporation, Irvine, Etats-Unis). Sa régulation est assurée par deux pompes péristaltiques à débit constant apportant soit une solution de potasse, soit une solution d'acide ortho phosphorique. Une troisième pompe péristaltique permet l'ajout d'un anti-mousses (Struktol J673). Cette régulation est rendu possible par la sonde de niveau de mousse placée sur la platine du fermenteur.

Le réacteur peut être alimenté en substrats par une pompe assurant un apport continu et précis avec des débits n'excédant pas  $0.5 \text{ L.h}^{-1}$  (FE411 - B.Braun Biotech International, Melsungen, Allemagne). Une seconde pompe, à débit asservi, permet l'apport de la solution saline concentrée qui sert de complément au milieu minéral initial (Minipulse 3 - Gilson, Middleton, Etats-Unis). Une troisième pompe permet d'ajouter l'ammoniaque afin de contrôler la croissance résiduelle par l'apport d'azote lors de la phase de production (Minipulse 3 - Gilson, Middleton, Etats-Unis). Une quatrième pompe est également disponible pour apporter un éventuel second substrat carboné, pour les cultures en co-substrats (Minipulse 3 - Gilson, Middleton, Etats-Unis).

Les réservoirs de solutions de substrats carbonés et/ou d'ammoniaque sont placés sur des balances (Seulement deux signaux analogiques de balances peuvent être collecté par culture : culture en co-substrats, les balances sont affectés aux substrats carbonés, tandis qu'en culture sur substrat simple, les

## Matériels & Méthodes

balances sont affectés au substrat carboné et à l'ammoniaque) (modèles CP 2202 S, I 12000 S et IB 16000 S - Sartorius, Aubagne, France). La détermination en ligne de la masse des réservoirs sur la balance permet d'obtenir une estimation des débits massiques de substrats et/ou d'ammoniaque entrants dans le réacteur.

La pression partielle en oxygène dissous ( $pO_2$ ) est mesurée par une sonde INGOLD (Urdorf, Suisse).

Le débit massique de gaz entrant (air) est mesuré par un débitmètre (5850 TR - Brooks Instrument, Hatfield, Etats-Unis).

L'agitation est assurée par trois turbines Rushton régulièrement disposée afin de garantir une homogénéité quasi parfaite malgré l'expansion de volume résultant de la conduite Fed-batch. Une garniture résistante aux PHA a été installée au début de cette thèse sur ce bioréacteur.

Le schéma du système est présenté sur la Figure 18.

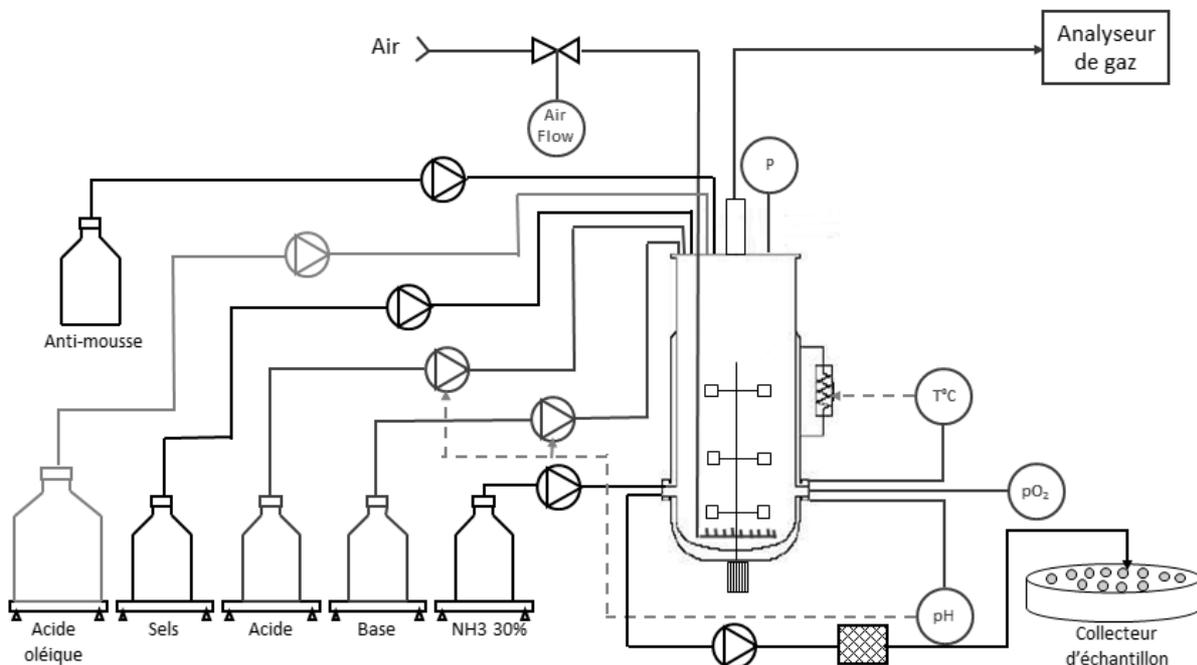


Figure 18 : Schéma général du fermenteur en mode Fed-batch et de son environnement

### 1.3.2.2 Système d'acquisition et de commande

Tous les systèmes de mesure en ligne et actionneurs sont connectés à un ordinateur de type PC par une interface Analogique / Digital – Digital / Analogique et des ports série type RS 232. Le module d'entrée-sortie permet l'acquisition en ligne des données provenant des capteurs (vitesse d'agitation, température, pH, oxygène dissous, pression), des temps de fonctionnement des pompes de liquides régulateurs de pH et d'antimousses ainsi que la commande des pompes d'alimentation en substrat, tandis que la liaison asynchrone reliant les balances à l'ordinateur permet la lecture en ligne de la masse des réservoirs.

L'ordinateur est équipé du logiciel fed2s, écrit en Turbo Pascal et développé au laboratoire, qui permet d'accéder à de nombreux signaux, que ce soit directement à leurs valeurs brutes, ou à leurs dérivées et/ou intégrales, de les filtrer et d'en faire l'acquisition. L'acquisition de ces mesures en ligne

## Matériels & Méthodes

permet également, via les bilans matières, l'estimation des vitesses de consommation de substrat, de production de dioxyde de carbone, du taux de croissance à partir de la production de CO<sub>2</sub>, etc. L'ensemble des paramètres liés au fermenteur, aux balances ou aux gaz, disponibles en lignes, sont détaillés dans les Tableau 14, Tableau 15 & Tableau 16.

Tableau 14 : Paramètres liés au fermenteur disponibles en ligne

Paramètres fermenteur	Unités
Température	°C
pH	
Pression relative	mbar
Agitation	r.p.m.
temps de marche des pompes d'antimousses, acide et base	s
Volume base	mL
Volume acide	mL
Oxygène dissous	%
Débit massique d'aération	nL.h <sup>-1</sup>

Tableau 15 : Paramètres liés aux balances disponibles en lignes

Paramètres balances	Unités
Masse initiale substrat 1	g
Masse actuelle substrat 1	g
Masse substrat ajouté 1	g
Concentration équivalente substrat 1	g.L <sup>-1</sup>
Carbone ajouté S1	mole
Carbone ajouté S1	mol.L <sup>-1</sup>
Masse initiale substrat 2	g
Masse actuelle substrat 2	g
Masse substrat ajouté 2	g
Concentration équivalente substrat 2	g.L <sup>-1</sup>
Carbone ajouté S2	mole
Carbone ajouté S2	mol.L <sup>-1</sup>
Carbone résiduel	mol.L <sup>-1</sup>
Volume fermenteur	L
C résiduel / C ajouté	g.g <sup>-1</sup>

Tableau 16 : Paramètres liés aux gaz disponibles en ligne

Paramètres gaz	Unités
Pourcentage N <sub>2</sub>	%
Pourcentage O <sub>2</sub>	%
Pourcentage CO <sub>2</sub>	%
Vitesse O <sub>2</sub>	mol.h <sup>-1</sup>
Vitesse CO <sub>2</sub>	mol.h <sup>-1</sup>
μ (/CO <sub>2</sub> )	h <sup>-1</sup>
Coefficient respiratoire	
kLa	h <sup>-1</sup>
Intégrale O <sub>2</sub>	mole
Intégrale CO <sub>2</sub>	mole
Vitesse O <sub>2</sub>	mol.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
Vitesse CO <sub>2</sub>	mol.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>

## Matériels & Méthodes

Il est possible d'utiliser différents modes de commande des débits des pompes : constant, linéaire, exponentiel et sigmoïde (Figure 19). Ces programmations de débit sont très utiles lors de conduites particulières de culture de microorganismes.

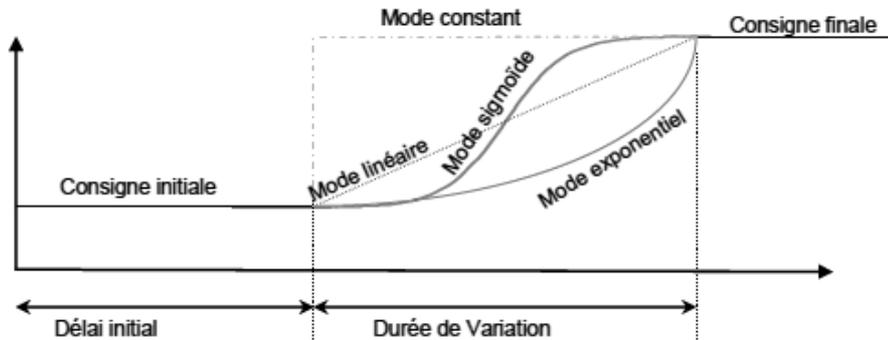


Figure 19 : représentation des modes de consigne des pompes péristaltiques disponibles grâce au programme de gestion de l'alimentation du réacteur (Cescut, 2009)

### 1.3.2.3 Echantillonnage

Des échantillons de surnageant de milieu de culture sont prélevés à intervalles déterminés grâce à un collecteur de fraction (Fraction Collector Frac-100, Pharmacia fine chemicals, USA), qui est relié à un module de filtration tangentielle (Applikon, Pays-Bas) dans lequel se trouve un filtre Sartolon polyamide 0.2  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim biotech, Aubagne, France). Le module de filtration est alimenté en moût de culture par une boucle de recirculation fonctionnant avec une pompe péristaltique (Masterflex 77521-57, Cole-Parmer USA).

### 1.3.2.4 Analyse des gaz de sortie du fermenteur

Durant les cultures Fed-batch dans le bioréacteur Biostat E de 20 L, les débits d'aération en entrée varient de 200 à 700  $\text{NL.h}^{-1}$ . La composition des gaz d'entrée et de sortie est mesurée par un analyseur (URAS 10 E, Hartmann & Braun, Allemagne) couplé à une armoire à gaz (EGAS8, B.Braun Biotech International, Melsungen, Allemagne).

Le principe de détection repose sur la mesure par spectrométrie infra-rouge pour le dioxyde de carbone et par paramagnétisme pour l'oxygène. L'étalonnage de cet analyseur s'effectue en trois étapes :

- Le zéro de l'oxygène et du dioxyde de carbone est calibré avec de l'azote.
- L'oxygène est calibré avec de l'air du réseau
- Le dioxyde de carbone est calibré avec un gaz étalon dont la composition est un mélange contenant 5% de  $\text{CO}_2$  et 20% d' $\text{O}_2$ .

Une fois la calibration de l'analyseur effectuée, ces mesures vont permettre le suivi des compositions en  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$  et  $\text{CO}_2$  de l'air en entrée et sortie du réacteur. De ce fait, il sera possible de déterminer les quantités d' $\text{O}_2$  consommé et de  $\text{CO}_2$  produit par les cellules au cours des cultures.

Cette analyseur a toutefois une limite, il ne permet pas de mesurer le  $\text{CO}_2$  lorsque celui-ci excède 10% de la composition des gaz de sortie du réacteur. De ce fait, un système de dilution est disponible afin de diluer les gaz de sortie du réacteur avec de l'air du réseau permettant à la mesure du  $\text{CO}_2$  de retourner dans la gamme de mesure de l'appareil.

## II-Techniques analytiques

### II.1 Méthode de suivi et d'analyse des substrats d'une culture

#### II.1.1 Dosage des acides gras

Cette méthode a été développée, à partir des travaux de Liu et al., 2014; Zhao et al., 2006, durant la thèse afin de pouvoir quantifier la fraction de substrat résiduel dispersée et dissoute dans le milieu réactionnel. Cette quantification est effectuée par analyses en chromatographie liquide haute performance (CLHP). Le principe de cette méthode de dosage des acides gras libres repose sur les interactions apolaires entre les chaînes carbonées d'acides gras et la phase stationnaire de la colonne.

L'appareil de chromatographie est composé de plusieurs parties :

- un passeur d'échantillons (CTC Analytics, PAL system, HTC PAL),
- une pompe (Ultimate 3000 Pump),
- une pré-colonne (Security Guard Cartridges C8 4 x 3.0mm ID, Phenomenex),
- une colonne de type C8 (Luna 5µm C8(2) 100A ; 150 x 4.6 mm, Phenomenex),
- un détecteur UV a barrette de diodes (Ultimate 3000 Photodiode Array Detector),
- un détecteur à diffusion de la lumière (ELSD, 380-LC, Varian).

Le logiciel d'acquisition et de traitement des données est Chromoleon (Chromatography Management System version 6.80).

L'analyse se fait sur les échantillons prélevés à la seringue lors de la culture et non sur les échantillons provenant du collecteur de fraction, la filtration retenant la fraction lipidique insoluble. L'échantillon à analyser est, quelle que soit la concentration en substrat résiduel, dilué au ½ avec de l'isopropanol (VWR Chemicals, Fontenay-sous-bois, France) afin de solubiliser les acides gras. Le mélange est centrifugé 4 minutes à 13 400 r.p.m. afin de culotter les cellules. Le surnageant peut être analysé par CHLP.

La séparation est effectuée par un gradient de deux éluants (Eau + 0.1% d'acide TriFluoroAcétique (TFA) et Acétonitrile + 0.1% de TFA) dont les proportions respectives évoluent au cours de l'analyse. Le débit total des éluants est égal à 1 mL.min<sup>-1</sup>, la température de la colonne est maintenue à 25°C dans un four et les échantillons dans le passeur sont conservés à température ambiante. Les températures d'évaporation et de nébulisation de l'ELSD sont à 50°C et un débit de gaz vecteur (N<sub>2</sub>) de 2 standard L.min<sup>-1</sup>. Le volume d'échantillon injecté est de 10 µL et l'analyse dure 40 minutes. Durant les 10 premières minutes, l'éluant est composé à 95% d'eau et 5% d'acétonitrile afin d'éluer toutes les protéines pouvant précipiter et colmater le support lorsque l'acétonitrile devient majoritaire dans l'éluant. Les 20 minutes suivantes (70% acétonitrile – 30% eau) servent à la quantification des acides gras résiduels. Enfin, les 10 dernières servent au nettoyage de la colonne et au retour aux conditions initiales.

Les solutions standard sont commandés chez les fournisseurs suivant : Sigma-Aldrich (Acide oléique 99%; acide linoléique 99%; acide stéarique 98.5%) et Supelco (Acide palmitique). Ces composés sont solubilisés dans de l'isopropanol.

La méthode CLHP permet l'obtention de chromatogramme similaire à celui de la Figure 20.

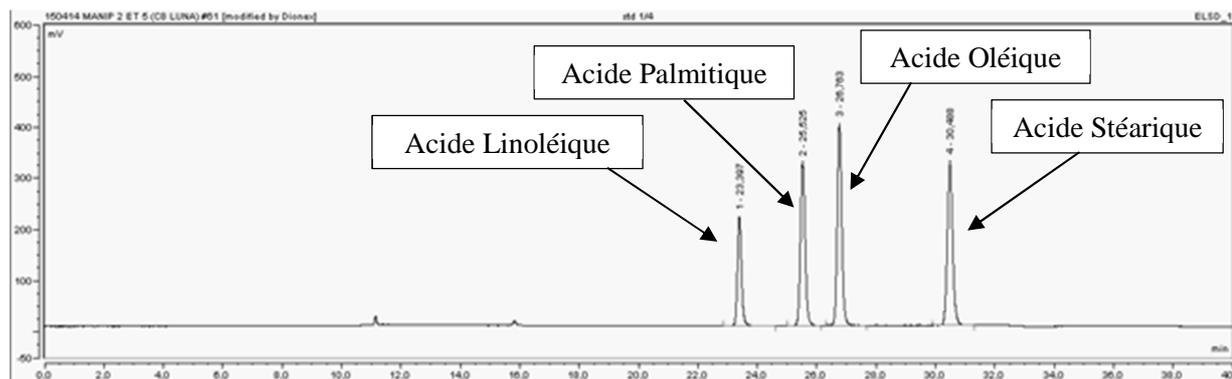


Figure 20 : Chromatogramme type avec les temps de rétention des acides linoléiques, palmitique, oléiques et stéarique

Les solutions standards ont permis d'établir une corrélation linéaire entre le logarithme des aires des pics et les logarithmes des concentrations en chacun des composés. La gamme de linéarité est comprise pour des concentrations de 0.1 à 1 g.L<sup>-1</sup> pour chacun des acides gras. Si des dilutions sont nécessaires, celles-ci doivent être effectuées avec de l'isopropanol. Une nouvelle étape de centrifugation est nécessaire (4 minutes à 13 400 r.p.m.) avant analyse du surnageant.

### II.1.2 Dosage du glycérol et du glucose par CLHP

La détermination des concentrations résiduelles en glycérol et en glucose est effectuée par des analyses en chromatographie liquide haute performance (CLHP).

L'appareil de chromatographie est composé des mêmes organes que dans la partie II.1.1 à l'exception de :

- la pré-colonne (Micro-Guard IG Cation H, Bio-Rad),
- la colonne de type H+ (Aminex HPX-87H 300 x 7.8 mm, Bio-Rad),
- un réfractomètre RI (Shodex RI – 101) à la place du détecteur ELDS.

L'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM est utilisé comme éluant en mode isocratique. Le débit de l'éluant est égal à 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, la température de la colonne est maintenue à 50°C dans un four et les échantillons dans le passeur sont conservés à 4°C. Le volume d'échantillon injecté est de 20 µL et l'analyse dure 30 minutes.

L'éluant ainsi que les solutions de la gamme d'étalonnage sont préparées dans de l'eau ultra-pure (MilliQ, 18.2 Ω.cm, Millipore, Allemagne). Le glycérol et le glucose utilisés pour les solutions standards sont issus des mêmes lots que ceux utilisés comme solutions de substrats pour les cultures.

### II.1.3 Dosage du glucose

Durant les cultures sur substrat glucose, la concentration résiduelle de celui-ci peut être dosée rapidement par un analyseur automatique YSI modèle 2700 Select Biochemistry Analyzer (YELLOW SPRINGS INSTRUMENT® Inc., Yellow Springs, Ohio, USA). Le dosage enzymatique, à la base de cette analyse, se fait via des glucoses oxydases immobilisées sur membrane. Ces enzymes transforment le glucose en acide gluconique libérant de l'eau oxygénée, qui va s'oxyder grâce à une électrode de platine. Le courant résultant de cette réaction est proportionnel à la concentration en

## Matériels & Méthodes

glucose. Avant toute mesure, l'appareil est étalonné à l'aide d'une solution standard de glucose concentrée à 2.5 g.L<sup>-1</sup>. Pour s'assurer de l'exactitude de la mesure de l'appareil, l'échantillon à analyser doit être préalablement centrifugé (13400 g, 4 minutes), afin de culoter toutes les cellules. Le surnageant doit être éventuellement dilué pour que la concentration en glucose mesurée soit comprise dans la gamme de linéarité de l'appareil, à savoir entre 0 et 5 g.L<sup>-1</sup>.

### II.2 Méthode de suivi et d'analyse de la biomasse de la culture

#### II.2.1 Biomasse totale

##### II.2.1.1 Mesure turbidimétrique

La densité cellulaire des prélèvements issus des cultures est estimée par mesure de l'absorbance à 600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Libra S4 de BIOCHROM Ltd., Cambridge, UK), dans une cuve de 0.2 cm de trajet optique. Si besoin, des dilutions sont réalisées pour rester dans une gamme de 0.05 à 0.6 UDO. Ces dilutions sont effectuées avec un mélange eau-isopropanol afin de solubiliser les éventuels acides gras résiduels.

##### II.2.1.2 Mesure gravimétrique

La masse de biomasse contenue dans un volume connu d'échantillon est déterminée par pesée, après centrifugation en tube d'Eppendorf de 1.5 mL, préalablement séché et pesé dans lesquels 1 mL de moût est disposé. Le culot est lavé à l'isopropanol afin de solubiliser les acides gras résiduels présents dans le volume interstitiel. Après une seconde centrifugation, les culots sont séchés à l'étuve sous vide (200 mm Hg, à 60°C) pendant 48 heures. La concentration en masse sèche (MS) est déterminée par différence et s'exprime en g.L<sup>-1</sup>.

#### II.2.2 Détermination de la composition macromoléculaire de la biomasse

##### II.2.2.1 Dosage par CPG des PHA intracellulaires

Cette méthode, inspirée de celle décrite par Grousseau en 2012, a été réajustée durant cette thèse pour le dosage des polyhydroxyalcanoates moyennes chaînes. Les informations extraites des travaux de Huijberts et al., 1994 ont permis d'améliorer cette méthode.

- Principe de la méthode

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont dosés par chromatographie en phase gazeuse suivant la méthode de méthanolyse proposée par Braunege *et al.* 1978 avec les modifications de Brandl *et al.* 1988.

La méthanolyse acide permet de dépolymériser les PHA et d'obtenir des esters d'acides gras qui sont volatils (Figure 21) :

## Matériels & Méthodes

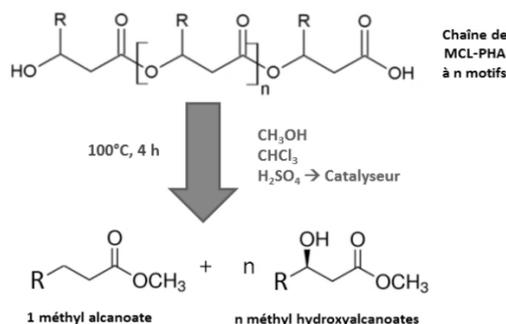


Figure 21 : Mesure par CPG des MCL-PHA intracellulaires, principe de la méthanolyse

Remarque : la réaction d'estérification est équilibrée (non totale) et réversible.

Pour déplacer le méthanol de la phase chloroformique, il suffit d'ajouter de l'eau à la fin de la réaction (extraction liquide-liquide).

- Analyse

Les culots de biomasse, correspondant à un volume de 0.75 mL de moût séchés pour la mesure des poids secs sont transférés dans des tubes (Pyrex svl 15, 15 mL 16x125 mm). Ils sont resuspendus dans 2 mL de méthanol acidifié (15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) contenant de l'acide benzoïque à 0.8 g.L<sup>-1</sup> comme étalon interne. 2 mL de chloroforme sont ensuite ajoutés à la seringue en verre et le mélange est placé dans un bain marie à 100°C pendant 4 heures. Chaque heure, les tubes sont agités (vortex) puis replongés dans le bain-marie.

Après que les tubes se soient refroidis jusqu'à la température ambiante, 1 mL d'eau ultrapure est ajouté dans chaque échantillon. Le mélange est agité pendant 30 secondes. La séparation liquide-liquide par décantation qui s'en suit dure toute une nuit. Une fois la séparation des deux phases effectuée, la phase organique est récupérée à l'aide d'une seringue en verre pour analyse en chromatographie GC-FID. La colonne utilisée est le modèle CP-Wax 58 (FFAP) CB (VARIAN INC., Hansen Way, Palo Alto, USA) de dimensions 30x0.53x1.5 (L (m) x ID (mm) x OD (µm)). La phase stationnaire en polyéthylène glycol est greffée avec des groupements fonctionnels acide nitroterephthalique modifiés. Le chromatographe est le modèle CPG VARIAN 430 (VARIAN INC., Hansen Way, Palo Alto, USA) équipé d'un passeur d'échantillons et d'un détecteur à ionisation de flamme. Le gaz vecteur est l'azote avec un débit de 25 mL.min<sup>-1</sup> et les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250 et 270°C. Le programme de température du four est le suivant : 115°C pendant 7 min ; augmentation 20°C par min jusqu'à 230°C ; 10 min à 230°C.

Les courbes d'étalonnage pour chacun des types de monomères de PHA (acides 3-hydroxyhexanoïque 98% (HHx); 3-hydroxyoctanoïque 98% (HO); 3-hydroxydécanoïque 98% (HD); 3-hydroxydodécanoïque 98% (HDD) et 3-hydroxytétradécanoïque 98% (HTD)) ont été réalisées dans des gammes de 0 à 50 mg par tube. Ces standards, fournis par Larodan Fine Chemicals AB (Limhamnsgårdens allé 9 SE21616 Malmö, Sweden), subissent simultanément le même traitement de méthanolyse que les échantillons à quantifier.

II.2.2.2 Calcul de la biomasse catalytique ( $X_{cat}$ )

Le calcul de la concentration en biomasse catalytique se fait selon l'équation 4 suivante :

$$X_{cat} = MS (g.L^{-1}) - PHA (g.L^{-1}) \quad \text{Équation 4}$$

### III- Traitements des données expérimentales

#### III.1 Généralités sur les bilans

Le bilan de conservation dans le système s'écrit comme suit :

Flux d'accumulation = Flux net de conversion + Flux net d'échange

Donc, pour une densité volumique  $e$  d'une grandeur extensive  $E$  :

$$\frac{d(e.V)}{dt} = r_e \cdot V + \varphi_e \cdot V \quad \text{Équation 5}$$

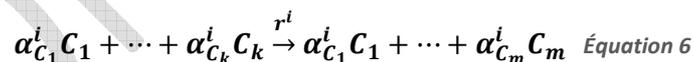
Avec  $r_e$  densité volumique de vitesse nette de réaction de la grandeur  $e$

$\varphi_e$  densité volumique de flux net d'échange de la grandeur  $e$  avec l'extérieur du système

- Bilan molaire

Pour un système réactionnel, dans lequel interviennent  $n$  réactions avec  $m$  composés ( $C_j$ ), le produit entre le vecteur vitesse correspondant à chacune des réactions et la matrice stœchiométrique, construite à partir des différents coefficients stœchiométriques ( $\alpha_{C_j}^i$ ) relatifs à chacune des  $n$  réactions, permet d'obtenir les vitesses nettes de réactions.

Soit l' $i^{\text{ème}}$  réaction s'effectuant à la vitesse  $r^i$



Le système est défini par :

- Le vecteur de concentrations molaires des  $m$  composés  $\vec{C} = (C_1, \dots, C_m)$ ,
- Le vecteur de densités volumiques de flux d'échange  $\vec{\varphi} = (\varphi_1, \dots, \varphi_m)$ ,
- Le vecteur de vitesses nettes de conversion pour les  $m$  composés  $\vec{r}_{net} = (r_{net 1}, \dots, r_{net m})$ ,
- Le vecteur de vitesses de réaction pour chacune des  $n$  réactions  $\vec{r} = (r^1, \dots, r^n)$ ,

- La matrice stœchiométrique  $|M| = \begin{bmatrix} \alpha_{C_1}^1 & \dots & \alpha_{C_k}^1 & \dots & \alpha_{C_m}^1 \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ \alpha_{C_1}^j & \dots & \alpha_{C_k}^j & \dots & \alpha_{C_m}^j \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ \alpha_{C_1}^n & \dots & \alpha_{C_k}^n & \dots & \alpha_{C_m}^n \end{bmatrix}$

## Matériels & Méthodes

Les vitesses nettes de conversion sont obtenues par le produit  $\vec{r}_{net} = \vec{r} \cdot |M|$ . L'équation bilan molaire pour un réacteur homogène s'écrit donc:

$$\frac{d(V \cdot \vec{C})}{dt} = \vec{r} \cdot |M| \cdot V + \vec{\phi} \cdot V \quad \text{Équation 7}$$

### III.2 Traitement des gaz

L'analyse des gaz de sortie du bioréacteur permet d'obtenir certaines informations concernant l'état physiologique de la biomasse. Si l'on considère le système bioréacteur illustré Figure 22, il est possible de déterminer, via cette analyse, les vitesses de consommation d'oxygène ( $r_{O_2}$ ) et de production de dioxyde de carbone ( $r_{CO_2}$ ).

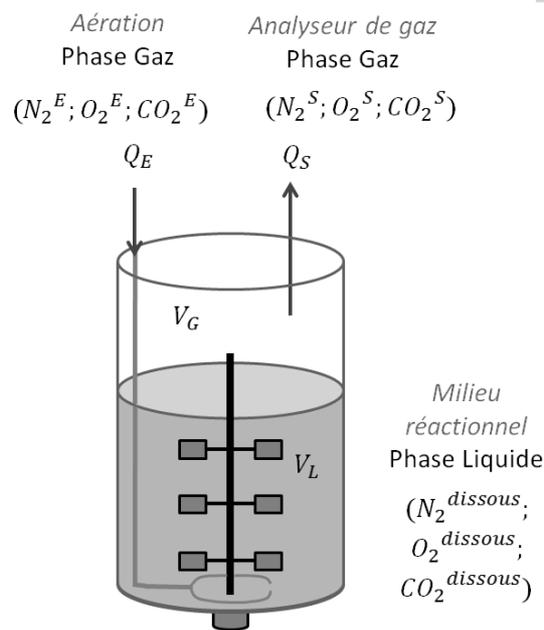


Figure 22 : Schéma du réacteur avec l'entrée et la sortie des gaz associées aux variables nécessaires au calcul des bilans gazeux

#### III.2.1 Bilan pour un composé A présent dans le gaz

L'équation de conservation de la matière pour le 1 présent dans le gaz sur le système bioréacteur s'écrit :

$$\begin{aligned} \text{Accumulation} &= \text{Flux d'échange} + \text{Réaction} \\ &= (\text{Flux d'entrée} - \text{Flux de sortie}) + (\text{Production} - \text{Consommation}) \end{aligned}$$

$$\frac{d(A^{dissous} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(A^{gaz} \cdot V_G)}{dt} = (Q_E \cdot A^E - Q_S \cdot A^S) + r_A \cdot V_L \quad \text{Équation 8}$$

avec  $V_L$  et  $V_G$  les volumes des phases liquides et gaz en L ( $V_G$  correspond à l'addition du ciel gazeux du réacteur et du volume mort jusqu'à l'analyseur de gaz)

$Q_E$  et  $Q_S$  les débits de gaz entrant et sortant du système réacteur en mole.h<sup>-1</sup>

## Matériels & Méthodes

$A^E$  et  $A^S$  les pourcentages du composé A dans les gaz entrant et sortant du réacteur

$r_A$  la vitesse de production/consommation de l'espèce A en mole.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> ( $r_A > 0$  si production et  $r_A < 0$  si consommation)

$A^{dissous}$  et  $A^{gaz}$  les concentrations du composé A dans la phase liquide et dans la phase gaz du réacteur en mole.L<sup>-1</sup>

On peut regrouper le terme d'accumulation dans la phase liquide et le terme de production/consommation afin d'obtenir le terme de flux de transfert global ( $\Phi_A$ ) s'écrivant :

$$\Phi_A = \frac{d(A^{dissous} \cdot V_L)}{dt} + r_A \cdot V_L \quad \text{Équation 9}$$

avec  $\Phi_A$  en mol.h<sup>-1</sup>

Donc,

$$\frac{d(A^{gaz} \cdot V_G)}{dt} = (Q_E \cdot A^E - Q_S \cdot A^S) + \Phi_A \quad \text{Équation 10}$$

### III.2.2 Bilan sur l'azote

L'azote est un gaz inerte qui n'est pas utilisé par *P. putida* KT2440. Il ne subit que le phénomène de transport au travers de la phase liquide. Du fait de sa très faible solubilité dans la phase liquide, le terme  $\frac{d(N_2^{gaz})}{dt}$  peut être négligé dans la suite du calcul. Le flux global de transfert de l'azote peut également être négligé. Partant de ces hypothèses, le bilan sur l'azote permet de déterminer le débit de sortie des gaz  $Q_S$  à partir de la mesure du débit d'entrée des gaz  $Q_E$  dans le réacteur et des compositions en azote à l'entrée  $N_2^E$  et à la sortie  $N_2^S$  du fermenteur.

$$Q_S = \frac{\frac{d(N_2^E \cdot V_G)}{dt} + Q_E \cdot N_2^E}{N_2^S} \quad \text{Équation 11}$$

Avec le débit sortant des gaz  $Q_S$ , il est possible d'écrire les flux globaux de transfert d'oxygène ( $\Phi_{O_2}$ ) et de dioxyde de carbone ( $\Phi_{CO_2}$ ) comme suit :

$$\Phi_{O_2} = \frac{d(O_2^S \cdot V_G)}{dt} - Q_E \cdot O_2^E + Q_S \cdot O_2^S \quad \text{Équation 12}$$

$$\Phi_{CO_2} = \frac{d(CO_2^S \cdot V_G)}{dt} - Q_E \cdot CO_2^E + Q_S \cdot CO_2^S \quad \text{Équation 13}$$

Les vitesses nettes de conversion ( $r_A$ ) peuvent être déduites des équations précédentes :

$$r_A = \frac{\Phi_A + \frac{d(A^{dissous} \cdot V_L)}{dt}}{V_L} \quad \text{Équation 14}$$

Avec  $\Phi_A < 0$  dans le cas d'une consommation du composé A et  $\Phi_A > 0$  pour une production de A.

### III.2.3 Bilan sur l'oxygène

Dans la phase liquide considérée parfaitement mélangée, le bilan peut s'écrire :

$$\frac{d(O_2^{dissous} \cdot V_L)}{dt} = r_{O_2} \cdot V_L - \Phi_{O_2} \quad \text{Équation 15}$$

avec  $O_2^{dissous}$  : la concentration (en mole.L<sup>-1</sup>) en oxygène dissous dans la phase liquide. Celle-ci est déterminée par la mesure de la valeur de la pression partielle en oxygène dissous,  $pO_2$ . La solubilité maximale de l'oxygène ( $C^*$ ) est égale à 7.56 mg.L<sup>-1</sup> à 30°C sous 300 mbars de surpression ( $pO_2 = 100\%$ ). Dans certaines cultures, la surpression pourra atteindre 500 mbars, on considèrera que la valeur de  $C^*$  restera inchangée. Avec la masse molaire de l'oxygène égale à 32 g.mol<sup>-1</sup>, on peut écrire l'équation 16 suivante :

$$O_2^{dissous} = \frac{pO_2}{100} \times \frac{7.56}{32} \quad \text{Équation 16}$$

La vitesse de consommation d'oxygène (en mole.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) peut être déterminée à l'aide de l'équation 15 :

$$r_{O_2} = \frac{\Phi_{O_2} + \frac{d(O_2^{dissous} \cdot V_L)}{dt}}{V_L} \quad \text{Équation 17}$$

Pour la phase gaz interne au bioréacteur, supposée homogène et sans réaction biologique, l'équation s'écrit :

$$\frac{d(O_2^{gaz} \cdot V_g)}{dt} = \Phi_{O_2}^{gaz-liq} \cdot V_g + Q_e O_2^E - Q_s O_2^S \quad \text{Équation 18}$$

Avec  $\Phi_{O_2}^{gaz-liq}$  : la densité volumique de flux de transfert de la phase gazeuse vers la phase liquide

$V_g$  : le volume de la phase gaz (L)

$O_2^{gaz}$  : la pression partielle en oxygène dans le volume gazeux

$O_2^E$  ;  $O_2^S$  : les pressions partielles en oxygène pour les débits entrant et sortant

$\Phi_{O_2}^{gaz-liq} \cdot V_g = -\Phi_{O_2}^{liq} \cdot V_L$  en égalant les flux de transfert gaz-liquide

Le coefficient global de transfert d'oxygène dans la phase liquide,  $k_L a_{O_2}$  (en h<sup>-1</sup>), se calcule par la formule suivante :

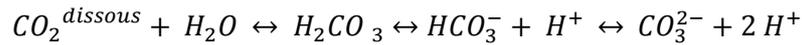
$$k_L a_{O_2} = \left( Q_e O_2^E - Q_s O_2^S - \frac{d(O_2^{gaz})}{dt} \cdot V_g \right) / (V_L \cdot (O_2^* - O_2^{dissous})) \quad \text{Équation 19}$$

avec  $O_2^*$  : la pression partielle en oxygène dissous à la saturation dans le milieu.

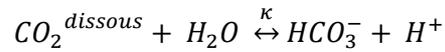
### III.2.4 Bilan sur le dioxyde de carbone

La concentration en dioxyde de carbone dissous n'étant pas mesurée, elle doit donc être calculée. Dans la phase liquide, le dioxyde de carbone se trouve sous différentes formes dont les proportions sont fonctions du pH et de la salinité du milieu minéral. On trouve donc : le dioxyde de carbone ( $CO_2^{dissous}$ ), l'acide carbonique ( $H_2CO_3$ ), les ions hydrogénocarbonate ( $HCO_3^-$ ) et les ions carbonate ( $CO_3^{2-}$ ). L'équilibre entre ces composés peut se détailler ainsi :

## Matériels & Méthodes



L'acide carbonique ( $H_2CO_3$ ) se dissocie quasiment instantanément. Par conséquent, les formes  $H_2CO_3$  et  $CO_3^{2-}$  sont minoritaires et donc négligés pour le reste des calculs. Il reste donc :



avec  $\kappa$  : la constante d'équilibre de cette réaction de dissociation :

$$\kappa = \frac{HCO_3^- \cdot H^+}{CO_2^{dissous}} = 4.71 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$$

L'accumulation des ions hydrogénocarbonate peut minimiser le bilan sur le  $CO_2$  produit. Le calcul de leur concentration peut s'exprimer :

$$HCO_3^- = \frac{\kappa \cdot CO_2^{dissous}}{H^+} = \frac{\kappa \cdot CO_2^{dissous}}{10^{-pH}} \quad \text{Équation 20}$$

Selon la loi de Henry, et en considérant l'équilibre thermodynamique avec la phase gazeuse effluente, la concentration en  $CO_2$  dissous est proportionnelle à la pression partielle en  $CO_2$  ( $pCO_2$ ):

$$CO_2^{dissous} = pCO_2 \cdot H_{CO_2}$$

avec  $H_{CO_2}$  : la constante de Henry pour le  $CO_2$

La quantité totale de  $CO_2$  dans le milieu réactionnel s'écrit finalement :

$$CO_2^{total} = CO_2^{dissous} + HCO_3^- = CO_2^{dissous} + \frac{\kappa \cdot CO_2^{dissous}}{10^{-pH}} = pCO_2 \cdot H_{CO_2} \cdot \left(1 + \frac{\kappa}{10^{-pH}}\right) \quad \text{Équation 21}$$

### III.3 Traitement de la variable « Volume »

Dans le but de pouvoir exploiter les données de cultures en mode Fed-batch, il est nécessaire de travailler en grandeurs massiques ou molaires afin de s'affranchir de l'évolution du volume du milieu réactionnel. En effet, celui-ci subit de nombreuses variations dues aux apports de substrats, de la solution saline, des solutions correctrices de pH, de la solution d'ammoniaque mais aussi du fait des prélèvements pour l'échantillonnage et de l'évaporation due à la température de travail.

Afin d'estimer le volume réactionnel liquide, on utilise les variables suivantes :

$V_0$  : le volume initial

$V_{sels}$  : le volume de solution saline ajouté

$V_{acide}$  : le volume de solution d'acide correctrice de pH ajouté

$V_{base}$  : le volume de solution de base correctrice de pH ajouté

$V_{évap}$  : le volume d'eau évaporée

$V_{prél}$  : le volume prélevé pour l'échantillonnage

$V_{alim}$  : le volume de solution d'alimentation en substrat ajouté

On a donc :

$$V_{ferm} = V_0 + V_{sels} + V_{acide} + V_{base} + V_{alim} - V_{évap} - V_{prél} \quad \text{Équation 22}$$

Pour le volume de substrat ajouté, il faut différencier le volume d'eau, du volume de substrat converti en biomasse catalytique ou en produits.

On note :  $V_{équi} = V'_{H_2O} + V_{X,P}$

avec  $V'_{H_2O} = V_{alim} \cdot (\rho_{alim} - S_{alim})$

et  $V_{X,P} = \alpha \cdot (V_{alim} - V'_{H_2O}) \cdot (1 - Y_{S,CO_2})$

$\rho_{alim}$  : la masse volumique de la solution d'alimentation en substrat ( $\text{kg.L}^{-1}$ )

$S_{alim}$  : la concentration de la solution d'alimentation ( $\text{kg.L}^{-1}$ )

$Y_{S,CO_2}$  : le rendement de conversion du substrat en  $CO_2$  ( $\text{g.g}^{-1}$ )

$\alpha$  : un coefficient correcteur qui permet d'ajuster le volume final mesuré au volume final calculé

L'équation 22 devient donc :

$$V_{ferm} = V_0 + V_{sels} + V_{acide} + V_{base} + V'_{H_2O} + V_{X,P} - V_{évap} - V_{prél} \quad \text{Équation 23}$$

## Matériels & Méthodes

Sur un intervalle de temps noté  $dt$ , la variation de volume s'écrit :

$$d(V_{ferm}) = d(V_{sels}) + d(V_{acide}) + d(V_{base}) + d(V_{équi}) + d(V_{évap}) + d(V_{prél})$$

Équation 24

A chaque temps, le facteur de dilution peut être calculé par l'équation 25 :

$$F_d(t) = 1 + \frac{d(V)}{V_{(t-1)}} \quad \text{Équation 25}$$

Il est désormais possible de calculer le volume théorique de la culture qui correspond au volume de la culture si celle-ci avait été menée selon un mode batch.

$$V_{theo}(t) = V_{theo}(t-1) \cdot F_d(t) \text{ avec } V_{theo}(t=0) = V_0 \quad \text{Équation 26}$$

Les valeurs expérimentales établies avec le volume mesuré peuvent être corrigées par rapport au volume théorique.

### III.4 Calcul des vitesses spécifiques et des rendements

Il est possible de caractériser le comportement du microorganisme en calculant des vitesses et des rendements :

Soit le composé  $B$  de concentration  $b$  comme variable d'état et  $X_{cat}$  la variable biomasse catalytique (en  $\text{Cmole.L}^{-1}$ ). On note  $r_B$  la vitesse de réaction (en  $\text{Cmole.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) et  $q_B$  la vitesse spécifique de réaction (en  $\text{Cmole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

$$q_B = \frac{r_B}{X_{cat}} \quad \text{Équation 27}$$

Si  $B$  est un substrat, on parle de vitesse (spécifique) de consommation. Si  $B$  est un produit, on parle de vitesse (spécifique) de production.

Le taux de croissance (en  $\text{h}^{-1}$ ) se calcule selon l'expression suivante :

$$\mu = \frac{r_X}{X_{cat}} \quad \text{Équation 28}$$

Les vitesses spécifiques de production de  $\text{CO}_2$  et de consommation d' $\text{O}_2$  (en  $\text{mole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) s'écrivent :

$$q_{\text{CO}_2} = \frac{r_{\text{CO}_2}}{X_{cat}} \quad \text{et} \quad q_{\text{O}_2} = \frac{r_{\text{O}_2}}{X_{cat}} \quad \text{Équation 29}$$

On peut en déduire le coefficient respiratoire  $QR$  :

$$QR = \frac{q_{\text{CO}_2}}{q_{\text{O}_2}} = \frac{r_{\text{CO}_2}}{r_{\text{O}_2}} \quad \text{Équation 30}$$

## Matériels & Méthodes

Les rendements de conversion du substrat S de concentration s, en un composé B (si B est un produit), se note  $R_{S,M}$  et se calcule comme suit :

$$R_{S,M} = \frac{\Delta b}{\Delta s} \quad \text{Équation 31}$$

### III.5 Bilans élémentaires

Il est possible d'appliquer la notion de bilan aux éléments constitutifs des composés impliqués dans les réactions biologiques. Seuls le carbone, l'oxygène, l'hydrogène et l'azote sont pris en compte dans les travaux de ce doctorat. Ils représentent 95% des systèmes organiques biologiques. La matrice élémentaire de la Cmole des composés  $C_j$  de formule brute  $CH_{\varepsilon_{C_j}^H} O_{\varepsilon_{C_j}^O} N_{\varepsilon_{C_j}^N}$  s'écrit :

$$|E| = \begin{vmatrix} C & H & O & N \\ 1 & \varepsilon_{C_1}^H & \varepsilon_{C_1}^O & \varepsilon_{C_1}^N \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & \varepsilon_{C_j}^H & \varepsilon_{C_j}^O & \varepsilon_{C_j}^N \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & \varepsilon_{C_m}^H & \varepsilon_{C_m}^O & \varepsilon_{C_m}^N \end{vmatrix}$$

L'équation bilan sur les éléments constitutifs des composés est la suivante :

$$\frac{d(\vec{C} \cdot |E|)}{dt} = \vec{r} \cdot |M| \cdot |E| + \vec{\varphi} \cdot |E| \quad \text{Équation 32}$$

avec,  $\frac{d(\vec{C} \cdot |E|)}{dt}$  : le flux d'accumulation de la densité volumique des éléments k

$\vec{r} \cdot |M| \cdot |E|$  : les vitesses nettes de conversion des éléments ( $\vec{r} \cdot |M| \cdot |E| = \vec{0}$  pour les systèmes biologiques)

$\vec{\varphi} \cdot |E|$  : le flux de densité volumique d'échange avec l'extérieur.

Pour un système fermé :  $\vec{r} \cdot |M| \cdot |E| = \vec{0}$ ,

pour une analyse instantanée, cela donne :  $r_1 \cdot \varepsilon_{C_1}^i + \dots + r_j \cdot \varepsilon_{C_j}^i + \dots + r_m \cdot \varepsilon_{C_m}^i = 0$ ,

en intégrant les vitesses sur un intervalle de temps, on obtient :

$$\int_{t_{initial}}^{t_{final}} \vec{r} \cdot |M| \cdot |E| \cdot dt = [\vec{C} \cdot |E|]_{t_{initial}}^{t_{final}} = \vec{0} \quad \text{Équation 33}$$

Donc, pour chacun des éléments  $C_j$ , il est obtenu l'expression suivante :

$$(C_1^{fin} - C_1^{ini}) \cdot \varepsilon_{C_1}^i + \dots + (C_j^{fin} - C_j^{ini}) \cdot \varepsilon_{C_j}^i + \dots + (C_m^{fin} - C_m^{ini}) \cdot \varepsilon_{C_m}^i = 0 \quad \text{Équation 34}$$

### III.5.1 Bilan Carbone

L'équation bilan du carbone sur les vitesses s'écrit :  $r_1 \cdot \varepsilon_{C_1}^C + \dots + r_j \cdot \varepsilon_{C_j}^C + \dots + r_m \cdot \varepsilon_{C_m}^C = 0$  avec  $\varepsilon_{C_j}^C = 1$  pour les composés organiques et  $\varepsilon_{C_j}^C = 0$  pour les autres. Le bilan carbone s'écrit aussi :

$$\sum_{j=1}^m (C_j^{fin} - C_j^{ini}) = 0 \quad \text{Équation 35}$$

Dans le système biologique considéré dans ces travaux de thèse, on a :

$$r_{substrat} + r_{X_{cat}} + r_{PHA} + r_{CO_2} = 0 \quad \text{Équation 36}$$

### III.5.2 Bilan élémentaire généralisé ou bilan redox

Dans le cas où certaines variables ne seraient pas mesurables, il y a possibilité d'effectuer un bilan élémentaire global sur l'ensemble des éléments. Pour cela, on affecte à chacun des éléments  $k$  un facteur arbitraire  $\lambda_k$ . Si l'on considère le vecteur  $\vec{\lambda} = (\lambda_1, \dots, \lambda_k)$ , le produit entre le vecteur des vitesses nettes de conversion des éléments et la transposé du vecteur  $\vec{\lambda}$  est nul. On a donc  $\vec{r} \cdot |M| \cdot |E| \cdot \vec{\lambda}^T = \vec{0}$ , soit :

$$\lambda_i \cdot r_1 \cdot \varepsilon_{C_1}^i + \dots + \lambda_i \cdot r_j \cdot \varepsilon_{C_j}^i + \dots + \lambda_i \cdot r_m \cdot \varepsilon_{C_m}^i = 0 \quad \text{Équation 37}$$

En sommant sur l'ensemble des éléments  $k$ , il découle l'équation suivante :

$$\sum_{i=1}^k (\lambda_i \cdot r_1 \cdot \varepsilon_{C_1}^i + \dots + \lambda_i \cdot r_m \cdot \varepsilon_{C_m}^i) = 0 \text{ soit } r_1 \cdot \sum_{i=1}^k (\lambda_i \cdot \varepsilon_{C_1}^i) + \dots + r_m \cdot \sum_{i=1}^k (\lambda_i \cdot \varepsilon_{C_m}^i) = 0$$

Équation 38

On appelle coefficient du degré de réduction généralisé associé au composé  $C_j$ , le terme  $\sum_{i=1}^k (\lambda_i \cdot \varepsilon_{C_j}^i)$ . On le nommera par la lettre  $\gamma$ . Le bilan élémentaire généralisé s'écrit donc :

$$\sum_{j=1}^m (r_j \cdot \gamma_j) = 0 \text{ avec } \gamma_j = \sum_{i=1}^k (\lambda_i \cdot \varepsilon_{C_j}^i) \quad \text{Équation 39}$$

Si l'on a un composé non mesuré, il est possible de l'éliminer de l'équation bilan élémentaire généralisé en annulant son degré de réduction généralisé  $\gamma$ . Avec  $k$  éléments dans notre système,  $k - 1$  composés ayant un degré de réduction différent peuvent être éliminés du bilan élémentaire en prenant pour les valeurs de  $\gamma$ , les solutions du système d'équations annulant les degrés de réduction retenus. Dans notre cas, on détermine les valeurs de  $\lambda_C$ ,  $\lambda_H$ ,  $\lambda_O$  et  $\lambda_N$  pour permettre d'éliminer les composés comme l'eau, le  $CO_2$  et la source d'azote  $NH_3$  de l'équation bilan.

$$\gamma_{H_2O} = 2 \cdot \lambda_H + \lambda_O = 0, \quad \gamma_{CO_2} = \lambda_C + 2 \cdot \lambda_O = 0, \quad \gamma_{NH_3} = \lambda_N + 3 \cdot \lambda_H = 0$$

Le système peut être résolu si  $\lambda_C = 4$ ,  $\lambda_H = 1$ ,  $\lambda_O = -2$  et  $\lambda_N = -3$ .

A partir de cette résolution, il est possible de calculer le degré de réduction généralisé  $\gamma$  de chacun des autres composés  $C_j$  de formule brute  $CH_{\varepsilon_{C_j}^H} O_{\varepsilon_{C_j}^O} N_{\varepsilon_{C_j}^N}$  :

$$\gamma_j = \sum_{i=1}^k (\lambda_i \cdot \varepsilon_{C_j}^i) = \lambda_C + \lambda_H \cdot \varepsilon_{C_j}^H + \lambda_O \cdot \varepsilon_{C_j}^O + \lambda_N \cdot \varepsilon_{C_j}^N \quad \text{Équation 40}$$

### III.5.3 Validation des mesures par l'utilisation des équations bilan élémentaires

Pour vérifier si les mesures expérimentales effectuées sont correctes, il suffit de vérifier que les bilans élémentaires soient bouclés, si tous les composés sont dosés. Une fois ces bilans considérés comme bouclés, il est possible d'estimer les valeurs de grandeurs non mesurées ou de ré-estimer des valeurs erronées. Le degré de réduction d'un composé non ou mal mesuré peut être retrouvé comme suit :

$$\gamma = \frac{\Delta_{glob}}{\Delta_c} \text{ avec } \Delta_{glob} = \sum_{j=1}^m (r_i \cdot \gamma_j) \text{ et } \Delta_c = \sum_{j=1}^m (r_i) \quad \text{Équation 41}$$

### III.6 Lissage des données expérimentales

Le lissage des données expérimentales obtenues au cours d'une culture permet de s'affranchir des incertitudes expérimentales (liées aux méthodes, à l'opérateur, ...), d'interpoler et de calculer directement les valeurs dérivées et intégrales pour avoir un accès rapide aux cinétiques et aux rendements expérimentaux. Pour le lissage des données, il est préférable de convertir les mesures brutes en grandeur afin de s'affranchir des variations de volumes ou des incertitudes liées aux dilutions effectuées sur les échantillons lors de leurs dosages. Les résultats sont traités par un logiciel de lissage développé au LISBP. L'interpolation se base sur un calcul polynomial des valeurs expérimentales et permet l'obtention d'une courbe lissée de l'évolution temporelle des variables. Les courbes dérivées décrivent l'évolution de la vitesse nette de consommation ou de production de ces composés.

## IV- Modélisation des flux

Une application pour la résolution d'un réseau métabolique a été développée par Jean-Louis Uribealbarrea. Ce descripteur a été implémenté pour la souche *P. putida* KT2440 selon les voies métaboliques décrites dans l'état de l'art. Il permet l'évaluation des différents rendements limites basés sur la conversion du carbone, des contraintes de génération et régénération des coenzymes et des demandes énergétiques de la cellule. L'ensemble du métabolisme de *P. putida* n'étant pas totalement connu, cet outil permet, via la simulation de différents scénarios, de prédire le comportement métabolique de la souche en fonction des conditions de culture. Les résultats obtenus à l'aide de ce descripteur métabolique sont développés dans la partie résultat.

### IV.1 Descripteur anabolique

Le descripteur anabolique est constitué de l'ensemble des réactions (61 réactions) conduisant à la synthèse des constituants macromoléculaires de la biomasse à partir de 28 intermédiaires métaboliques. En fonction de la composition élémentaire de la biomasse, les fractions massiques des constituants cellulaires et la demande (en carbone, énergie et coenzymes réduits) de ces voies métaboliques peuvent être réajustée. L'ensemble des réactions du réseau anabolique et la composition macromoléculaire de la biomasse de *P. putida* KT2440 sont détaillés dans l'Annexe A.

### IV.2 Descripteur catabolique

Le descripteur catabolique est constitué de l'ensemble des réactions des voies cataboliques des différents substrats étudiés et des voies de biosynthèse des PHA (45 réactions, 42 intermédiaires) décrites dans les Annexes B.

### IV.3 Résolution

Le descripteur total est traité comme un système linéaire qui évalue l'ensemble des flux matières intracellulaires des réactions mises en œuvre. La résolution s'effectue selon différentes conditions :

- Le flux d'accumulation intracellulaire de chaque intermédiaire est nul.
- Sur les variables abiotiques, l'écart entre le flux expérimental et le flux théorique doit être minimisé.
- D'autres contraintes spécifiques peuvent être ajoutées si besoin (un rendement carbone, un rapport entre deux flux, ...)

La démarche générale est la suivante :

- à partir des valeurs expérimentales de rendements correspondant à une phase de croissance seule, le rendement énergétique de production de biomasse  $Y_{ATP,X}$  est évalué. Ce rendement tient compte de l'ensemble des demandes énergétiques difficilement modélisables (transports ionique, maintien des gradients et de l'homéostasie cellulaire).
- à partir de l'hypothèse de la conservation de ce rendement énergétique, il est possible de déterminer les rendements théoriques limites de conversion du carbone en biomasse  $Y_{S,X}$  pour différents substrats (seul ou en mélange).
- il est possible d'obtenir un rendement théorique limite de conversion des substrats en PHA  $Y_{S,PHA}$  qui correspond à la quantité maximale de produit pouvant être obtenue selon les contraintes métaboliques des voies identifiées, les contraintes de l'énergie requise et de la demande en coenzymes.
- à partir de valeurs expérimentales, le modèle peut être corrigé, implémenté, et sert à la compréhension des phénomènes mis en jeu lors des cultures.

## **V- Extraction et caractérisation des produits**

### V.1 Méthode d'extraction des PHA

Avant d'extraire les PHA des cellules lyophilisées du moût final de fermentation, il est nécessaire de nettoyer les cellules. En effet, pour les cultures sur substrats de types acides gras, il est nécessaire de laver les cellules à l'éthanol afin d'éliminer le substrat résiduel. Les cellules sont donc mises en suspensions dans de l'éthanol absolue (VWR Chemicals, Fontenay-sous-bois, France) et sous agitation magnétique durant 2 heures. Au terme de ce lavage, la suspension est centrifugée 10 minutes à 4000 r.p.m., les culots sont alors mis à sécher sous vide à température ambiante.

Une fois secs, l'étape d'extraction des PHA par solvant peut débuter. Le Soxhlet est un appareillage de laboratoire qui se décompose selon la Figure 23:

## Matériels & Méthodes

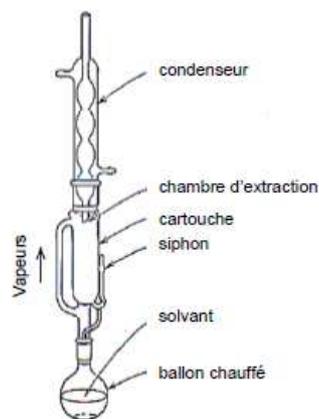


Figure 23 : Schéma représentant les différents composants d'un extracteur de Soxhlet

La méthode d'extraction a été développée durant cette thèse en s'appuyant sur les travaux de (Heinrich et al., 2012; Jiang et al., 2006; Koller et al., 2013; Kunasundari et al., 2011; Manangan & Shawaphun, 2010), ainsi que sur l'expertise de nos partenaires du Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologie Biologique (CRITTBio).

Une masse pesée de cellules lavées et séchées est placée dans la cartouche filtrante en cellulose (Whatman, Maidstone, Royaume-Uni). 100 mL du solvant d'extraction, le chloroforme, sont placés dans le ballon en verre. La température paramétrée pour chauffer le ballon est de 65°C pour atteindre la température d'ébullition du chloroforme.

Le principe de l'extraction repose sur l'entraînement des PHA par le solvant. Les vapeurs de solvant traversant le Soxhlet sont condensées au niveau du réfrigérant, dans lequel circule l'eau du réseau. Une fois revenu à l'état liquide le solvant s'écoule au travers de l'échantillon biologique situé dans la cartouche de cellulose. Ce système de distillation-condensation assure une circulation continue du solvant dans l'échantillon durant 24 heures. Un siphon permet au solvant de retourner dans le ballon afin de pouvoir poursuivre le cycle d'évaporation-condensation.

Au terme des 24 heures d'extraction, le ballon est placé à l'évaporateur rotatif à 65°C afin d'enlever la majeure partie du chloroforme. Le reste non évaporé est placé dans un bécher de 100 mL préalablement séché, à l'étuve sous vide 60°C, et pesé. Ce bécher est placé sous hotte chimique le temps que le solvant s'évapore intégralement. Une fois l'évaporation effectuée, le bécher contenant les PHA est pesé afin d'estimer le rendement d'extraction,  $\eta_{\text{extraction}}$ , selon l'équation suivante :

$$\eta_{\text{extraction}} = \frac{(m_{\text{bécher+PHA}} - m_{\text{bécher vide}})}{m_{\text{cellules}}} \quad \text{Équation 42}$$

avec,  $m_{\text{bécher+PHA}}$  : la masse du bécher contenant le produit sec (en g)

$m_{\text{bécher vide}}$  : la masse du bécher vide et sec (en g)

$m_{\text{cellules}}$  : la masse de cellules pesée et placée dans la cartouche cellulose (en g)

Le rendement d'extraction, calculé en comparant la masse de produit extrait à la masse de PHA contenu dans l'échantillon biologique utilisé pour l'extraction (dosée par chromatographie phase gazeuse), obtenu par cette méthode est de 96% massique. Les profils monomériques des PHA avant et après extraction sont similaires, ce qui certifie que :

## Matériels & Méthodes

- la méthode d'extraction n'est pas sélective de certains types de monomères
- la méthode d'extraction permet la récupération des polymères de toutes tailles.

### V.2 Caractérisation des PHA par Chromatographie à Perméation de gel

Les analyses des masses molaires des polymères produits lors des différentes cultures de la thèse ont été effectuées par le laboratoire RESCOLL (PESSAC, 33).

La méthode de chromatographie à perméation de gel ou d'exclusion stérique (Size Exclusion Gel en anglais - SEC) a été réalisée selon la norme NF T51-505 (2011). Cet appareil est composé comme suit :

- Un système de GPC Agilent 1260 infinity
- Un système 4 colonnes Polymer Laboratories PLGel, 300x7.5 mm, particules de 5  $\mu\text{m}$ , de porosité de 50 à 10<sup>4</sup> Å. L'ensemble est thermostaté à 40°C
- Un détecteur RI
- Un détecteur UV ( $\lambda=254$  nm)

L'éluant TétraHydroFurane (THF), qualité analyse, filtré est utilisé à un débit de 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. L'étalonnage est effectué avec du polystyrène. Les échantillons sont préparés par une dilution dans du THF contenant du toluène, qui est un marqueur de débit, puis filtrés sur filtre PTFE 0,22  $\mu\text{m}$ .

La masse molaire moyenne en poids, notée  $M_w$ , correspond à la moyenne des masses molaires pondérée par la masse de chaînes de chaque longueur.

La masse molaire moyenne en nombre, notée  $M_n$ , correspond à la moyenne des masses molaires pondérée par le nombre de chaînes de chaque longueur.

L'indice de polydispersité, noté  $I_p$ , caractérise la dispersion de la masse molaire des polymères. Dans le cas où tous les polymères sont parfaitement homogènes en taille et constitué d'un seul type de monomère, cet indice sera égal à 1.

$$I_p = \frac{M_w}{M_n}$$

Équation 43

### V.3 Caractérisation des propriétés thermiques des PHA par Analyses Enthalpiques Différentielles

Les analyses enthalpiques différentielles (AED) ou *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) des polymères produits lors des différentes cultures de la thèse ont été effectuées par le laboratoire RESCOLL (PESSAC, 33).

Documents de référence

- ISO 11357-2 (2013) – Mesure de la température de transition vitreuse
- ISO 11357-3 (2013) – Détermination des températures et des enthalpies de réaction

L'appareil utilisé est une DSC à compensation de puissance, DSC Q2000 (TA Instruments), utilisée en mode standard avec des creusets porte-échantillons en aluminium hermétiques. De l'azote de qualité U, selon un débit de 50 mL.min<sup>-1</sup>, a été utilisé comme gaz de balayage.

## Matériels & Méthodes

Le profil de température appliqué est le suivant:

- Isotherme à -80 °C pendant 5 minutes
- Passage de -80 à 80°C selon une rampe de 10°C/min
- Isotherme à 80°C pendant 5 minutes
- Passage de 80 à -80°C selon une rampe de 10°C/min
- Isotherme à -80°C pendant 5 minutes
- Passage de -80 à 150°C selon une rampe de 10°C/min

Les masses des étalons utilisés pour l'étalonnage sont:

- Indium: 3,37 mg
- Mercure: 2,15 mg
- Plomb: 4,59 mg

Le sens exothermique est indiqué sur les thermogrammes ; il est représenté vers le haut.

La température de transition vitreuse, notée  $T_g$ , délimite le passage entre les états secondaires vitreux ( $T < T_g$ ) et caoutchoutique ( $T_g < T$ ). La température de fusion ( $T_m$ ) détermine la température à laquelle les zones cristallines du polymère (s'il y en a) passent à l'état fondu. Ces températures sont déterminées par une analyse en Differential Scanning Calorimetry (DSC). L'aire du pic correspondant à la fusion caractérise l'enthalpie de fusion  $\Delta H_{fus}$  ramenée à une unité de masse de l'échantillon (en  $J.g^{-1}$ ). Celle-ci peut nous informer sur la proportion de zone cristalline dans le polymère.

## RESULTATS

### A- Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

#### Nomenclature

$X_t$	<i>total biomass concentration (g.L<sup>-1</sup>)</i>
$X_{cat}$	<i>catalytic biomass concentration (g.L<sup>-1</sup>)</i>
$S$	<i>substrate concentration (g.L<sup>-1</sup>)</i>
$\%PHA_f$	<i>final intracellular PHA content (g.g<sup>-1</sup>)</i>
$V$	<i>volume of culture medium (L)</i>
$RQ$	<i>respiratory quotient</i>
$\mu$	<i>specific growth rate (h<sup>-1</sup>)</i>
$\mu_{exp}$	<i>experimental specific growth rate (h<sup>-1</sup>)</i>
$q_s$	<i>specific substrate consumption rate (Cmole.Cmole<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</i>
$q_{PHA}$	<i>specific production rate (Cmole.Cmole<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</i>
$\mu_{growth}$	<i>specific growth rate during the growth phase (h<sup>-1</sup>)</i>
$\mu_{prod1}$	<i>specific residual growth rate during the 1<sup>st</sup> step of the production phase (h<sup>-1</sup>)</i>
$\mu_{prod2}$	<i>specific residual growth rate during the 2<sup>nd</sup> step of the production phase (h<sup>-1</sup>)</i>
$\mu_{prod3}$	<i>specific residual growth rate during the 3<sup>rd</sup> step of the production phase (h<sup>-1</sup>)</i>
$\mu_{prod4}$	<i>specific residual growth rate during the 4<sup>th</sup> step of the production phase (h<sup>-1</sup>)</i>
$s$	<i>solubility (mol.kg<sup>-1</sup>)</i>
$t_i$	<i>initial time of the step (h)</i>
$M_{Xcat}$	<i>catalytic biomass molar mass (g<sub>Xcat</sub>.Cmole<sup>-1</sup>)</i>
$Y_{ATP,Xcat}^{theo}$	<i>theoretical anabolic demand (g<sub>Xcat</sub>.mol<sub>ATP</sub><sup>-1</sup>)</i>
$Y_{ATP,Xcat}$	<i>energetic growth yield (g<sub>Xcat</sub>.mol<sub>ATP</sub><sup>-1</sup>)</i>
$Y_{N,Xcat}$	<i>nitrogen conversion yield into catalytic biomass (mole.Cmole<sup>-1</sup>)</i>
$Y_{S,PHA}^{exp}$	<i>experimental PHA production yield from fatty acids (Cmole.Cmole<sup>-1</sup>)</i>

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

$Y_{S,Xcat}^{exp}$	experimental growth yield from fatty acids ( $Cmole.Cmole^{-1}$ )
$Y_{S,Xcat}^{max}$	maximal growth yield from fatty acids ( $Cmole.Cmole^{-1}$ )
$Y_{S,Xt}^{exp}$	experimental overall carbon yield ( $Cmole.Cmole^{-1}$ )
$\Phi_{AcetylCoA}^{\beta-ox}$	flux of acetyl-coenzymeA released by PHA production flux ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}.h^{-1}$ )
$\Phi_{ATP}^{\beta-ox}$	flux of ATP produced by beta-oxidation for PHA production ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}.h^{-1}$ )
$Y_{S,Xcat}^{eff}$	effective growth yield when growth and PHA production are coupled ( $Cmole.Cmole^{-1}$ )
$Y_{AcetylCoA}^{estim}$	acetyl-coenzymeA, coming from PHA production, consumption yield for growth estimated by the metabolic descriptor ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}$ )
$Y_{AcetylCoA}^{max}$	maximal acetyl-coenzymeA, coming from PHA production, consumption yield for growth estimated by the metabolic descriptor ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}$ )
$Y_{NADH}^{estim}$	NADH, coming from PHA production, consumption yield for growth estimated by the metabolic descriptor ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}$ )
$Y_{FADH2}^{estim}$	FADH <sub>2</sub> , coming from PHA production, consumption yield for growth estimated by the metabolic descriptor ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}$ )
$Y_{Fatty\ acids}^{estim}$	fatty acid consumption yield for growth estimated by the metabolic descriptor ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}$ )
$q_{AcetylCoA}^{exp}$	experimental acetyl-coenzymeA flux released by PHA production ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}.h^{-1}$ )
$q_{NADH}^{exp}$	experimental NADH flux released by PHA production ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}.h^{-1}$ )
$q_{FADH2}^{exp}$	experimental FADH <sub>2</sub> flux released by PHA production ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}.h^{-1}$ )
$Y_{C,Xcat}$	total growth yield from both acetyl-coenzymeA and fatty acids ( $Cmole.Cmole^{-1}$ )
$q_{AcetylCoA}^{exp\ demand}$	experimental anabolic demand flux of acetyl-coenzymeA ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}.h^{-1}$ )
$q_{NADH}^{exp\ demand}$	experimental anabolic demand flux of NADH ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}.h^{-1}$ )
$m$	cell maintenance energy flux ( $\mu mole.g_{Xcat}^{-1}.h^{-1}$ )

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

## **Introduction**

Ce chapitre est principalement rédigé sous forme d'un article scientifique actuellement soumis au journal scientifique *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.

L'objectif des travaux de ce doctorat est de déterminer la stratégie de conduite et les conditions optimales de culture pour la production de polyhydroxyalkanoates à moyennes chaînes latérales à partir d'acides gras sur la souche *P. putida* KT2440. Dans ce but, il est important d'établir des expérimentations permettant la compréhension de l'ensemble des phénomènes biologiques, la détermination des cinétiques de production et des rendements optimums.

La culture de type Fed-batch permet, par des apports contrôlés de carbone et d'azote, d'obtenir des titres de produits élevés. Ce type de conduite permet d'induire des changements de métabolisme, par la mise place d'une limitation nutritionnelle, d'étudier les dynamiques de croissance et de production de PHA, mais aussi de déterminer les capacités maximales de la souche. Le mode Fed-batch permet également de bénéficier de l'historique cellulaire des événements vécus par les micro-organismes. De ce fait, lors de la phase de production, il est possible d'approcher des limites de l'accumulation. De plus, comme énoncé précédemment, l'accumulation de PHA est liée à des taux de croissance faibles, par conséquent, son étude via des modes de conduite de type chémostat (procédé continu) engendrerait des temps de stabilisation très long nécessaire au renouvellement du contenu cellulaire.

Dans ce chapitre, l'analyse des données expérimentales issues d'une culture en mode Fed-batch sur acide gras à 30°C, a permis de mettre en lumière un amélioration du rendement carbone global lorsque la croissance et la production de PHA ont lieu simultanément. Afin d'expliquer ce résultat et d'en comprendre les tenants, de nombreuses simulations à partir du descripteur métabolique, présenté dans la partie Matériels et Méthodes, ont été effectuées afin d'évaluer comment le carbone et l'énergie pouvait se répartir dans la cellule en fonction des conditions environnementales de la culture. Au-delà cette compréhension des phénomènes biologiques, ces résultats permettent d'ajouter un argument justifiant de l'intérêt d'utiliser le mode de culture Fed-batch pour la production de PHA à partir d'acides gras.

La culture, présentée dans ce chapitre, sera nommée A dans le reste de ce manuscrit.

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

## **I. Publication: Improving carbon and energy distribution by coupling growth and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from fatty acids by *P. putida* KT2440**

Nicolas Andin <sup>1,2</sup>\*, Antoine Longieras <sup>2</sup>, Thierry Veronese <sup>3</sup>, Frédéric Marcato <sup>4</sup>, Carole Molina-Jouve <sup>1</sup>, Jean-Louis Uribelarrea <sup>1</sup>

<sup>1</sup>LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France

<sup>2</sup>VEGEPLAST SAS, Zone Industrielle Ouest, F-65460 Bazet, France

<sup>3</sup>OVALIE INNOVATIONSAS, ZAC du Mouliot, 2, rue Marguerite Duras, F-32000 Auch, France

<sup>4</sup>VIVADOUR SCA, Rue de la Menoue, F-32400 Riscle, France

\*Corresponding author. Tel. : +33 (0)5 61 55 95 30

E-mail addresses : andin@insa-toulouse.fr (N. Andin), al@vegeplast.com (A. Longieras), thierry.veronese@ovalie-innovation.com (T.Veronese), frederic.marcato@vivadour.com (F.Marcato), carole.jouve@insa-toulouse.fr (C. Molina-Jouve), jean-louis.uribelarrea@insa-toulouse.fr (J.-L. Uribelarrea).

### **I.1 Abstract**

The production of medium chain length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas putida* KT2440 from fatty acids leads to the loss of a large proportion of carbon. We studied the possibility of a shift of potentially available energy and carbon towards monitored residual growth during the production phase. A Fed-Batch culture achieving 125.6 g.L<sup>-1</sup> of total biomass containing 54.4% (g.g<sup>-1</sup>) of medium chain length polyhydroxyalkanoates was carried out leading to an overall experimental carbon yield of 0.7 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>. The analysis of modeling fluxes deduced from experimental data indicated how carbon and reduced cofactors (NADH and FADH<sub>2</sub>) were managed to conclude that part of the carbon and reduced cofactors made available by polymer production were used in anabolic pathways. The strategy which consisted in coupled growth and medium chain length polyhydroxyalkanoate production enhanced the global yields compared to growth followed by a production phase. The understanding of carbon and energy fluxes distribution allowed deducing optimized culture strategy to perform the highest reported in the literature.

### **I.2 Introduction**

Facing environmental challenges to better manage plastic waste and replace petroleum-based compounds, the development of new routes for the bioplastics production from renewable resources is of major interest. The rising demand for bioplastics is linked to the increasing interest in sustainable products for very numerous industrial sectors such as packaging, electronic devices, the car industry.

Polyhydroxyalkanoates are suitable raw materials for the bio-based and biodegradable polymeric materials production. About 150 monomers of hydroxyalkanoic acids have been reported in the literature (Steinbuchel and Valentin, 1995; Agnew and Pflieger, 2013). They are generally divided into two groups according to their structures: the short chain length polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA) are composed by 3 to 5 carbons atoms while the medium chain length polyhydroxyalkanoates (MCL-

**Résultats - Partie A :** Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

PHA) consist of 6–14 carbon atoms. MCL-PHA have a low degree of crystallinity (around 25%) with a low melting point (between 40°C and 60°C) (Abe et al. 2012), low tensile strength and high elongation to yield. Their elastomeric properties are then very interesting.

Polyhydroxyalkanoates have already been produced by microorganisms at the industrial scale. As reported previously, numerous strains are able to synthesize and store PHA when grown with a nutrient imbalance involving for instance nitrogen or phosphorus with adequate carbon supply (Koller et al. 2010). Among them, *P. putida* KT2440 is a well-known versatile and safe strain which is able to accumulate medium chain length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] as intracellular carbon and energy storage compounds in the cytoplasm.

The valorization of low cost substrates from renewable resources such as animal fats or plant oil is an interesting opportunity to design an economic bioprocess for polyhydroxyalkanoates production. Concerning process optimization, volumetric polymer productivity and the final PHA content in the cell are the most important parameters to reduce global production costs. Thus, fed-batch culture is a very suitable mode of culture to achieve high cell density with very high amounts of polymer when the biological and physical dynamics are controlled and well adjusted (Hazenberg, W. & Witholt, B. 1997).

In this work, the biological dynamics of *P. putida* KT2440 were investigated on fatty acids (95% of 18 carbon compounds) to evaluate interactions between growth and PHA production. These polymers are synthesized through the beta-oxidation pathway where R-3-hydroxyacyl-coenzymeA precursors can be polymerized by PHA synthase. This strain generally produces PHA composed of monomers with 6 to 14 carbons. However, most monomers consist of eight and ten carbons. Thereby, MCL-PHA production is accompanied by the release of acetyl-CoA and generation of the reduced coenzyme (B. Witholt and Kessler, 1999; Steinbüchel and Lütke-Eversloh, 2003) (see Figure 24). Throughout this work, the quantification of the carbon and energy pools and their potential use for concomitant residual growth are investigated in order to improve overall carbon and energy yields.

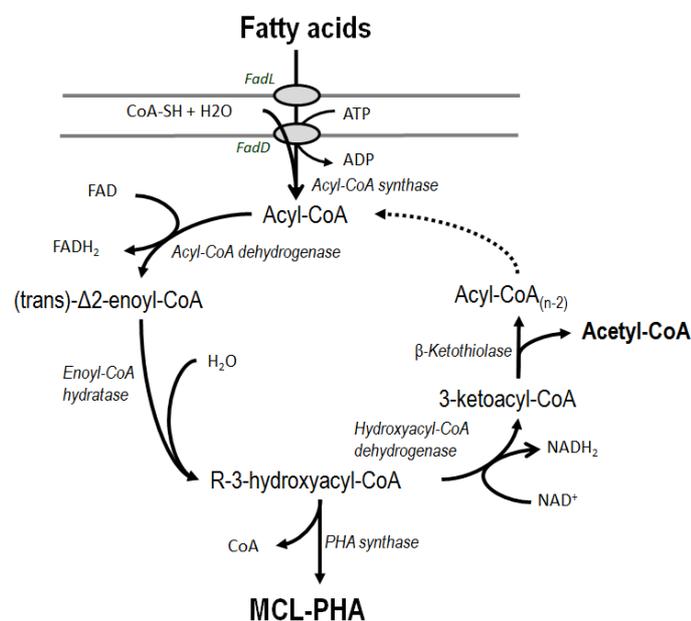


Figure 24: Medium chain length polyhydroxyalkanoate metabolism in *P.putida* KT2440 on fatty acids as the carbon source

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

## I. 3 Materials and methods

### I.3.1 Micro-organism

The strain *P. putida* KT2440 was obtained from ATCC® (47054™). It was stored at -80°C in liquid LB medium (Luria Bertani – Tryptone 10 g.L<sup>-1</sup>; yeast extract 5 g.L<sup>-1</sup>; NaCl 5 g.L<sup>-1</sup>) with 20% glycerol (v/v).

### I.3.2 Seed cultures

One *P. putida* glycerol stock solution was spread on an LB medium Petri dish (LB with addition of agar 20 g.L<sup>-1</sup>). The plate was incubated for 48 h at 30°C. One colony was used to inoculate the first 100 mL Erlenmeyer flask with 10 mL of liquid LB medium. The flask was cultured for 12 h at 30 °C under shaking at 100 rpm. It was transferred into a 2 L Erlenmeyer flask for 12h at 30 °C, pH 6.8 under shaking at 100 rpm, with 400 mL of mineral-salt medium prepared as follows: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.7 g.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.014 g.L<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.04 g.L<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.002 g.L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 0.5 g.L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g.L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.2 g.L<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O 0.005 g.L<sup>-1</sup>, CoCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O 0.004 g.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.002 g.L<sup>-1</sup>, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.001 g.L<sup>-1</sup>, AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.0005g.L<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.002 g.L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup>. The resulting culture was used to inoculate the bioreactor containing 8 L of mineral-salt medium.

### I.3.3 Bioreactor and operating parameters

Fed-Batch cultures were performed in a 20 L bioreactor using the Braun Biostat E fermenting system (Braun, Melsungen, Germany) without oxygen limitation. The temperature was kept at 30°C and the pH at 6.8 by addition of a 10 mol.L<sup>-1</sup> KOH solution. Homemade software enabled the online acquisition and regulation of the monitored parameters of the bioreactor (stirring speed, pH, temperature, relative pressure, partial pressure of dissolved oxygen (pO<sub>2</sub>), base, acid and antifoam (Struktol JG73) additions). The relative pressure in the bioreactor was set at 0.3 bar. The bioreactor was supplied with three sterile feeds (fatty acids, salt and ammonia solution at 8 mol.L<sup>-1</sup>) using peristaltic pumps (Masterflex France, Illkirch) and Gilson (United States, WI, Middleton). The composition of the fatty acid feed was oleic acid 81%, linoleic acid 10%, palmitic acid 4% and stearic acid 2% and 3% traces of other fatty acids (VWR Chemicals). The masses of fatty acids and nitrogen solutions added to the bioreactor were estimated online by weighting the feeding tanks continuously (CPA16001S, Sartorius (Goettingen, Germany)). Outlet gas composition was analyzed by an infrared spectrometry detector for carbon dioxide and a paramagnetic detector for oxygen (Egas 8, Braun, Germany). O<sub>2</sub> consumption rate and CO<sub>2</sub> production rate were calculated from mass balances, taking into account the variation of the gas volume in the reactor, inlet airflow (measured by a mass flowmeter, Brooks, United States, PA, Hatfield), temperature, humidity and pressure. The fatty acid concentration in the bioreactor was evaluated online by homemade software based on carbon mass balance, taking into account online acquisition data.

### I.3.4 Culture strategy

Fed-Batch cultures were performed with two phases linked to different carbon and nitrogen feeding strategies: (A) growth phase without any nutrient limitation, (B) growth and production phase under nitrogen limitation. During growth phase (A), an exponential fatty acid inlet flow was monitored

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

to keep a constant specific growth rate of  $0.2 \text{ h}^{-1}$  lower than the maximum specific growth rate on fatty acids ( $\mu_{\max} = 0.37 \text{ h}^{-1}$ , (Kellerhals et al., 2000)). This exponential growth was maintained until nitrogen depletion occurred when the catalytic biomass (biomass without any intracellular product) concentration reached around  $15 \text{ g}_{\text{Xcat}} \cdot \text{L}^{-1}$ . The second phase (B) corresponded to PHA production under nitrogen limitation. The exponential nitrogen feeding rate monitored the specific growth rate at values near one tenth of the maximal anabolic potential as it allows optimal PHA productivity according to E Grousseau et al., 2013. Thus, 4 steps at  $0.04 \text{ h}^{-1}$  ( $\mu_{\text{prod1}}$ ),  $0.03 \text{ h}^{-1}$  ( $\mu_{\text{prod2}}$ ),  $0.02 \text{ h}^{-1}$  ( $\mu_{\text{prod3}}$ ) and  $0.01 \text{ h}^{-1}$  ( $\mu_{\text{prod4}}$ ) were designed.

The carbon was provided to satisfy the anabolic demand and the PHA production. A slight excess of residual fatty acids was maintained in the medium to ensure maximal production rates for the different specific growth rates investigated in this study.

### I.3.5 Analytical methods

Total biomass concentration ( $X_t$ ) was measured by optical density at 600 nm (OD600nm) using a visible spectrophotometer (Biochrom Libra S4) with a 2 mm absorption cell (Hellma). OD600nm was calibrated against dry cell weight (DCW) measurements. The cells were harvested by centrifugation and then dried in an oven (Heraeus, France) at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  under vacuum (200 mmHg) in the presence of silica gel for 48 h.

The intracellular amount of polymers was determined by gas chromatography after methanol esterification (Brandl, Gross, Lenz, & Fuller, 1988) of the dried biomass used for DCW measurement. The exact amount of biomass used was weighed. The equipment was GC Varian 430 gas chromatograph (Varian Inc., HansenWay, Palo Alto, USA) with nitrogen as carrier gas ( $25 \text{ mL min}^{-1}$ ) and flame ionization detection ( $270^\circ\text{C}$ ). The column was a CP-SIL (CP8735) 5 CB column ( $30\text{m} \times 0.53 \text{ mm} \times 1.5 \text{ }\mu\text{m}$ ). The injection was carried out at  $250^\circ\text{C}$ . The temperature program of the oven was:  $115^\circ\text{C}$  during the initial 7 min then increasing to final temperature of  $230^\circ\text{C}$  at a rate of  $20^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$  and an isotherm of 10 min.

The catalytic biomass concentration ( $X_{\text{cat}}$ ) was estimated by difference between the concentrations of total biomass concentration  $X_t$  and PHA.

Fatty acid concentrations in supernatants were determined by HPLC (Ultimate 3000, Dionex (United States, CA, Sunnyvale) using a Phenomenex Luna C8(2)  $5 \text{ }\mu\text{m}$  column ( $150 \times 4.6 \text{ mm}$ ) with the following conditions: a temperature of  $25^\circ\text{C}$ , with water + 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and acetonitrile + 0.1% TFA as eluents (flow rate of  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) and dual detection, Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) (Varian 380-LC (United States, CA, San Diego) and UV at 280 nm (Dionex (United States, CA, Sunnyvale). Compounds were identified and quantified with reference to standards.

### I.3.6 Chemicals compounds

The standard compounds for the calibration of the residual fatty acid quantification in the supernatants were ordered from Sigma-Aldrich (oleic acid 99%; linoleic acid 99%; stearic acid 98.5%) and Supelco (palmitic acid).

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

The PHA monomer standard compounds (3-hydroxyhexanoic acid 98%; 3-hydroxyoctanoic acid 98%; 3-hydroxydecanoic acid 98%; 3-hydroxydodecanoic acid 98%; 3-hydroxytetradecanoic acid 98%) were provided by Larodan Fine Chemicals AB (Limhamnsgårdens allé 9 SE21616 Malmö, Sweden).

### I.3.7 Metabolic flux calculation

#### I.3.7.1. Metabolic pathways

The metabolic model descriptor used in this study was described previously (E Grousseau et al., 2013).

#### I.3.7.2. Metabolic descriptor structure

Metabolic pathways were obtained from a bibliographic study and available databases such as KEGGS or BIOCYC. It is currently accepted that the metabolic routes from basic precursors to small molecules are common to a wide variety of organisms. Where specific data were not available for *P. putida* (van Duuren et al., 2013), composition data of *Cupriavidus necator* DSM 545 (Grousseau et al. 2013) were used instead.

The metabolic descriptor was composed of two equation systems:

- (1) The first is an anabolic network (61 reactions: Annexe A) leading to the synthesis of different macromolecular components of biomass from 28 intracellular intermediate metabolites. This network was used to calculate the global molar stoichiometry for the production of 1 g of biomass, assuming the biomass formula ( $C_1H_{1.77}O_{0.44}N_{0.21}$ , 3.25% ash,  $M_{X_{cat}} = 25.28 \text{ g}_{X_{cat}}\text{Cmole}^{-1}$ ) and the mass fraction of macromolecular components as follows: proteins 46.87%, RNA 11.08%, DNA 1.97%, phospholipids 6.51%, polysaccharides 3.27%, triglycerides 1.41%, peptidoglycan 24.49%, LPS 2.23%, water 2.17%, ash 3.25%.
- (2) The second is a catabolic network (Annexe B) which describes the use of fatty acid as a carbon source (catabolism through the beta-oxidation pathway), the synthesis of medium-chain-length R-3-hydroxyalkanoic acid monomers and other specificities of *P. putida* KT2440 metabolism and macromolecular composition (Blank, Ionidis, Ebert, Bühler, & Schmid, 2008; Chavarría et al., 2012; Escapa et al., 2012; Latour & Lemanceau, 1998; Schulz, 1991) (45 reactions, 42 intermediate metabolites).

*Catabolism of fatty acid*: fatty acid in un-ionized form penetrates into the cells and is activated by an acyl-CoA synthase ( $r_1$ , Annexe B). It is then either decomposed to acetyl-CoA by a  $\beta$ -ketothiolase to produce biomass, energy and co-factors via the central metabolism or it is incorporated into MCL-PHA ( $r_2$  and  $r_5$ ).

*Central metabolic pathways*: the acetyl-CoA is then directed towards either the tricarboxylic acid cycle (TCA,  $r_6$  to  $r_{13}$ ) or towards the glyoxylate shunt (GXS,  $r_{27}$  to  $r_{28}$ ). There are two paths for bioconversion of C4 to C3 to feed gluconeogenesis: (i) the malic enzyme (EM,  $r_{15}$ ) which decarboxylates malate to pyruvate, (ii) the PEP (phospho-enol-pyruvate) carboxykinase (PCK,  $r_{14}$ ) which catalyzes the decarboxylation of oxaloacetate into PEP. The glycolysis pathway is incomplete in *P. putida* because the key enzyme fructose-1,6-bisphosphatase (FBP) is lacking (Latour &

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

Lemanceau, 1998). However, the Entner-Doudoroff pathway (ED,  $r_{25}$  and  $r_{26}$ ) overcomes this lack of catabolic route.

*Biosynthesis of MCL-PHA from R-3-hydroxyacyl-CoA*: the reaction is performed by a PHA synthase which polymerizes monomers (Haywood, 1989; Sudesh et al., 2000) ( $r_5$ ). The transhydrogenase activity involves the transformation of one mole of NADH into one mole of NADPH consuming one mole of ATP as energy source in order to satisfy the anabolic requirements (Blank et al. 2008; Chavarria et al. 2012) ( $r_{41}$ ).

### 1.3.7.3. Modeling – resolution

The system resolution was described by Grousseau et al. 2013. The theoretical values of the descriptor were confronted to experimental results viewed as valid by checking elementary balances close to 96%.

## I. 4 Results and discussion

### I. 4.1 Theoretical approach

As Grousseau et al. 2013 described, an anabolic demand equivalent to maximum  $Y_{ATP, X_{cat}}^{theo}$  i.e.  $22.62 \text{ g}_{X_{cat}} \cdot \text{mole}_{ATP}^{-1}$ , thanks to the biomass composition assuming no ATP spilling, was used in this work.

The maximal PHA production yield on fatty acids without growth is calculated and is equal to  $0.58 \text{ Cmole} \cdot \text{Cmole}^{-1}$ . This theoretical value is higher than those reported by Eggink, 1996 i.e. about  $0.52 \text{ Cmole} \cdot \text{Cmole}^{-1}$  due to the difference in the fatty acid composition and the PHA monomer profile. Indeed, according to Figure 1, the beta-oxidation pathway does not consume energy to produce the 3-hydroxyalkanoic acid precursors unlike the fatty acids where transportation through the cell membrane is energy consuming. Taking into account the reoxidation of reduced coenzymes, including acetyl-CoA catabolism, the theoretical value of the respiratory quotient is 0.67. Acetyl-CoA, NADH and  $\text{FADH}_2$  production fluxes from the beta-oxidation pathway, are respectively named  $\Phi_{AcetylCoA}^{\beta-ox}$ ,  $\Phi_{NADH}^{\beta-ox}$  and  $\Phi_{FADH2}^{\beta-ox}$ . The acetyl-CoA flux ( $\Phi_{AcetylCoA}^{\beta-ox}$ ) corresponds to 42% of the total carbon flux (see Figure 25) which is then lost as carbon dioxide through the tricarboxylic cycle producing reduced cofactors. The reduced cofactor generation yields through PHA production are 0.99 mole of NADH and 0.73 mole of  $\text{FADH}_2$  per mole of acetyl-CoA. The difference between these two yields is linked to the hydration of the fatty acid double bonds without producing  $\text{FADH}_2$  during a beta-oxidation cycle (Schulz, 1991).

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

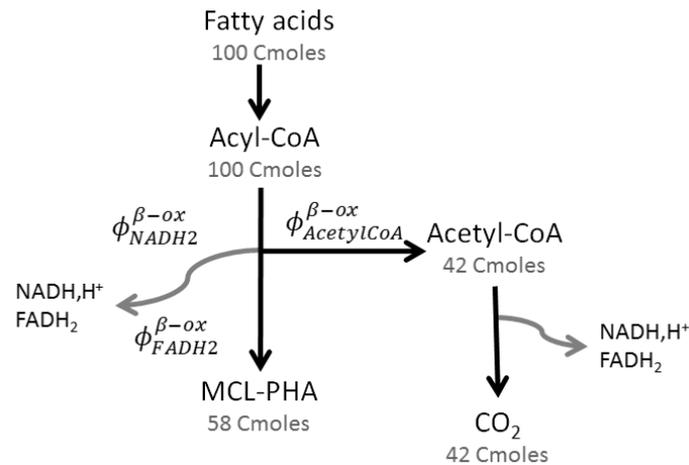


Figure 25: Metabolic fluxes distribution in MCL-PHA production: conditions to maximize the production yield

The objective of the second step of the theoretical approach is to determine the maximum growth yield  $Y_{S,Xcat}^{max}$  when no PHA has been synthesized from fatty acids. Acetyl-CoA synthesized is used as a carbon source for growth and for the regeneration of reduced cofactors (NADH, FADH<sub>2</sub>). The FADH<sub>2</sub> released is transformed into ATP while the NADH is used for NADPH generation (essential for growth) and/or turned into ATP. In this case, the cofactor generation yield is 0.83 moles per mole of acetyl-CoA for each reduced cofactor. To reach maximal growth yield, the descriptor is solved by minimizing fatty acid consumption. Some assumptions are made concerning NADPH generation flux distribution. The neoglucogenesis pathway is minimized. According to our NADPH generation flux distribution hypothesis, the maximal growth yield is 0.716 Cmole.Cmole<sup>-1</sup> while an energy yield for growth of 10.91 g<sub>Xcat</sub>.mole<sub>ATP</sub><sup>-1</sup> is calculated (pentose phosphate pathway 20.3%; tricarboxylic acid cycle 16.1%; malic enzyme 30.9% and transhydrogenase 32.7%). The results of the simulation are presented in Figure 26. The NADPH produced by the pentose phosphate pathway and the tricarboxylic acid cycle correspond to the minimum carbon flux for anabolism. This gap between the maximal  $Y_{ATP,Xcat}^{theo}$  and the energy yield for growth could be explained by Westerhoff's assumption. Applying the principles of non-equilibrium thermodynamics to the study of bacterial growth, Westerhoff et al. in 1982 suggested that energy yields for growth could be around 50% less than their theoretical maximal value and that anabolism and catabolism are not totally coupled.

**Résultats - Partie A :** Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

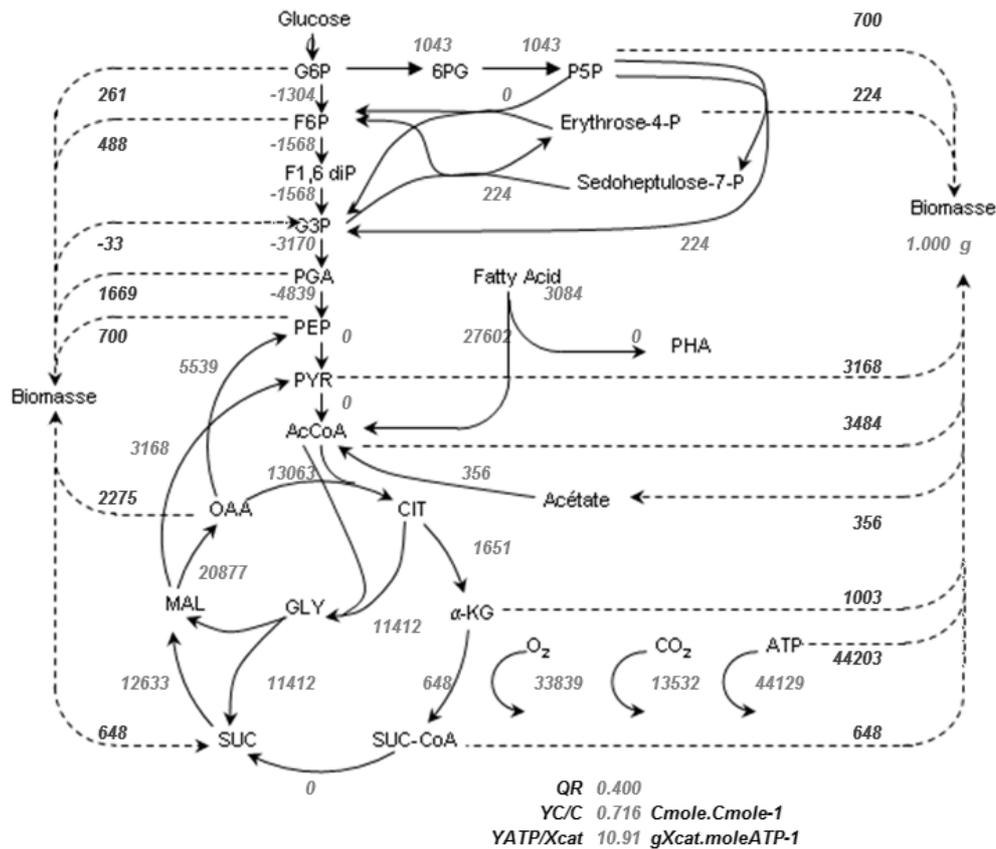


Figure 26: Metabolic flux distribution to maximize the growth yield (fluxes in  $\mu\text{mol.gXcat}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

## I. 4.2 Experimental results

### I.4.2.1. Fed-Batch culture of *P. putida* grown on fatty acids as sole carbon source

To avoid rheological and oxygen transfer problems linked to high residual fatty acid concentration in the broth because of the low substrate solubility in aqueous solution ( $s \approx 10^{-6} \text{ mol.kg}^{-1}$ , Khuwijitjaru, 2004), culture was carried out under carbon-limiting conditions so the fatty acids were consumed as soon as they were brought into the medium. The fatty acids feed could be controlled by an exponential or linear profile according to the biological demand.

As described earlier, two phases were performed during the culture (Figure 27):

(A) was the growth phase controlled by carbon supply without any other nutritional limitation; twenty hours after the beginning of culture, the initial nitrogen from the mineral medium was exhausted and allowed the production of  $4.2 \text{ Cmole}_{\text{Xcat}}$  ( $Y_{\text{N,Xcat}} = 0.21 \pm 0.02 \text{ mole.Cmole}^{-1}$ ).

(B) was the production phase coupled to a residual growth monitored by a limited nitrogen supply. At the end of the culture period, the final total biomass and PHA concentrations reached respectively  $125.6 \text{ g}_{\text{Xt}}.\text{L}^{-1}$  and  $67.7 \text{ g}_{\text{PHA}}.\text{L}^{-1}$ . The final PHA content was 54.4 % ( $\text{g.g}^{-1}$ ). The results reported here are the highest (Tableau 17) in the literature in terms of product accumulation using the same strain and substrate (Lee et al., 2000 and Kellerhals et al., 2000).

**Résultats - Partie A :** Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

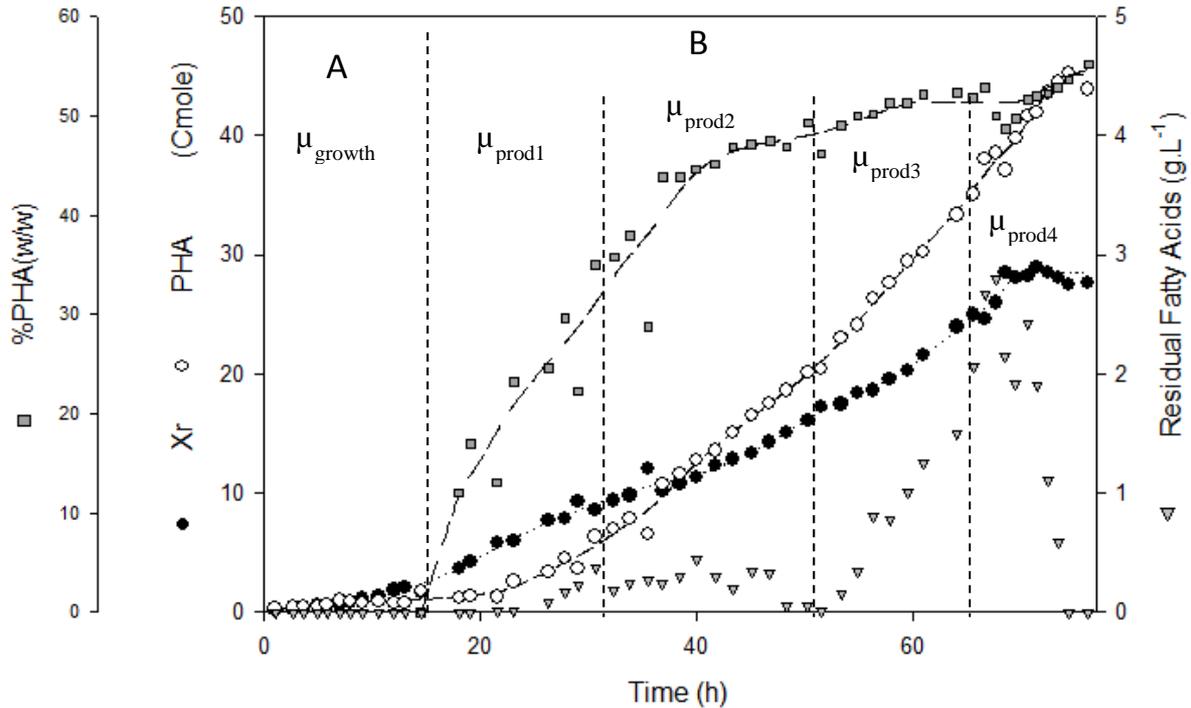


Figure 27: Time course of fed-Batch culture of *P. putida* KT2440 with fatty acids as carbon source at 30°C, pH 6.8

Tableau 17: Comparison of PHA production with *P. putida* KT2440 from fatty acid in fed-Batch culture

Reference	This work	Lee et al. (2000)	Kellerhals et al. (2000)
Carbon source	Oleic acid (80%)	Oleic acid	Oleic acid (90%)
Limitation	N	P	N
DCW (g <sub>XI</sub> .L <sup>-1</sup> )	125.6	141	89.9
PHA (g <sub>PHA</sub> .L <sup>-1</sup> )	67.7	72.6	18
%PHA (g.g <sup>-1</sup> )	54.4	51.4	20

#### 1.4.2.2. Kinetics and yields

The specific growth rate was, as expected, equal to 0.20 h<sup>-1</sup> during the first fed-batch culture phase. The experimental specific residual growth rates are detailed in Tableau 18. Specific production rates were estimated considering a pseudo-steady state at each production step. These values should be close to the optimal values because a slight excess of fatty acids was still detected in the medium.

Tableau 18: Kinetics parameters during the different steps of the Fed-Batch culture

	Growth	t <sub>i</sub> = 20.2 h	t <sub>i</sub> = 33.4 h	t <sub>i</sub> = 49.7 h	t <sub>i</sub> = 67.1 h
	$\mu_{\text{growth}}$	$\mu_{\text{prod1}}$	$\mu_{\text{prod2}}$	$\mu_{\text{prod3}}$	$\mu_{\text{prod4}}$
$\mu_{\text{exp}}$ (h <sup>-1</sup> )	0.2	0.040	0.027	0.019	0.008
q <sub>PHA</sub> (Cmole.Cmole <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	nr	0.039	0.030	0.027	0.017
q <sub>PHA</sub> / $\mu_{\text{exp}}$	nr	0.975	1.111	1.421	2.125
%PHA <sub>f</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	nr	37.3	47.8	52.2	54.4

## Résultats - Partie A : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

The lower the specific growth rate, the lower the specific production rate, but the higher the PHA accumulation for specific growth rates lower than  $0.04 \text{ h}^{-1}$ . This correlation between the specific growth rate and specific PHA production rate has been established by Aragao et al. 1996 and Grousseau et al. 2014 on *Cupriavidus necator* DSM 545. When the specific growth rate was below one tenth of the maximal anabolic potential ( $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$ ), the specific production rate  $q_{\text{PHA}}$  increased and when the specific growth rate was higher than  $0.05 \text{ h}^{-1}$ ,  $q_{\text{PHA}}$  decreased.

During the growth phase (A), the experimental substrate conversion yield into catalytic biomass was  $Y_{S,Xcat}^{exp} 0.66 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  which corresponds to 92.1 % of the maximal growth yield  $Y_{S,Xcat}^{max}$  described in I.4.1. The energy yield for growth  $Y_{ATP,Xcat}$  reached  $10.47 \text{ g}_{Xcat} \cdot \text{mole}_{ATP}^{-1}$  (96% of the maximal energy yield). This difference could be explained by futile cycles, protein and nucleic acid turn-over, and by useful maintenance (e.g. ion transport, cell homeostasis). In this case, the NADPH demand was mainly satisfied by the transhydrogenase activity (69% of the total NADPH demand) while the malic enzyme and the tricarboxylic acid cycle were less stressed than in the theoretical approach (respectively 5.5% and 1.85% of the total NADPH demand). An experimental Respiratory Quotient (RQ) of 0.45 was obtained in accordance with the decrease of the growth yield compared to the maximal value.

During the production phase (B) the experimental substrate conversion yield into PHA reached  $Y_{S,PHA}^{exp} 0.43 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ . The experimental Respiratory Quotient values increased from 0.56 to 0.64 with the carbon redistribution towards the polyhydroxyalkanoates. This is characterized by the ratio  $q_{\text{PHA}}/\mu$  (see Tableau 18).

Surprisingly, the experimental overall carbon (total biomass) yield during phase (B) was  $Y_{S,Xt}^{exp} 0.7 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ ; this value was higher than the experimental growth yield mentioned before and maximal PHA production yield described in I.4.1. It suggests some carbon and/or energy released by polymer production would be recovered to satisfy the anabolic demand.

From the experimental data of phase (B), effective growth yield  $Y_{S,Xcat}^{eff}$  defined as catalytic biomass synthesis from fatty acids, via the acetyl-CoA released by PHA production when growth and production occurs simultaneously could be determined. The aim of this calculation (equation 44) was to highlight if there was any variation compared to the experimental growth yield presented before.

**Résultats - Partie A :** Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

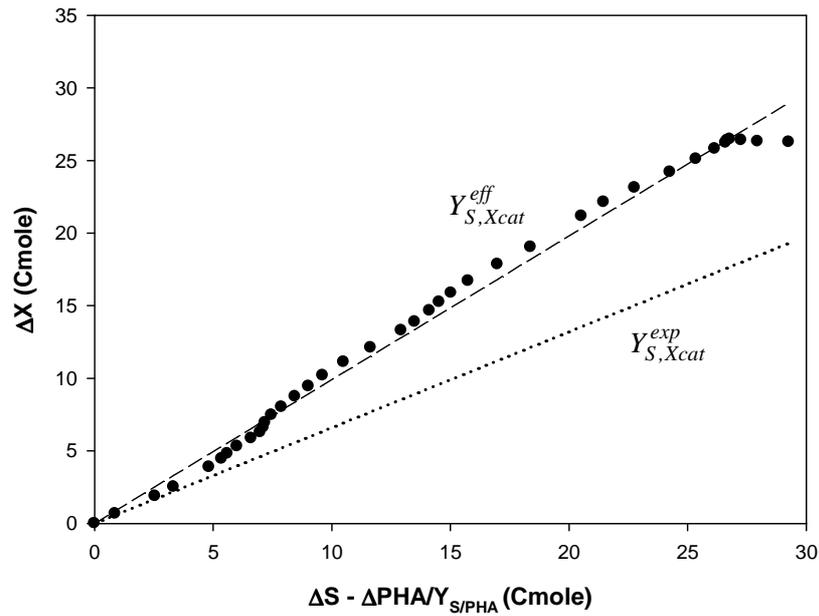


Figure 28: Effective growth yield determination on the only production phase (B) from the catalytic biomass quantity variation (Cmole) versus substrate minus carbon used as PHA quantity variation (Cmole)

$$\int_{t_1}^t (\mu \cdot X_{cat} \cdot V) \cdot dt = Y_{S,Xcat}^{eff} \cdot \left( \int_{t_1}^t (q_S \cdot X_{cat} \cdot V) dt - \frac{\int_{t_1}^t (q_{PHA} \cdot X_{cat} \cdot V) dt}{Y_{S,PHA}^{max}} \right) \quad \text{Équation 44}$$

From equation 45, an effective growth yield of  $0.99 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  is obtained Figure 28. The curve is considered linear, suggesting the yield is independent of the specific growth rate. It is 52% higher than the experimental growth yield. This result confirms that at least part of the carbon and energy released by polymer production is recovered to ensure residual growth. To quantify the recovered part (carbon and/or energy) in our case, the carbon and energy distribution for growth has to be analyzed.

#### 1.4.2.3. Carbon and energy distribution analysis

The resolution of the anabolism descriptor taking into account metabolites released by the production of polyhydroxyalkanoates (acetyl-CoA as additional carbon substrate and reduced coenzymes NADH and FADH<sub>2</sub>) and fatty acids is carried out with some constraints. Firstly the energy yield for growth  $Y_{ATP,Xcat}$  has to be equal to  $10.47 \text{ g}_{Xcat} \cdot \text{mole}_{ATP}^{-1}$  to be in the same conditions as the experimental growth conditions presented before. Secondly, the acetyl-CoA flux is minimized. The metabolic descriptor estimates the quantities of acetyl-CoA, fatty acids and reduced cofactors consumed (respectively  $Y_{AcetylCoA}^{estim}$ ;  $Y_{FattyAcids}^{estim}$ ;  $Y_{NADH}^{estim}$ ;  $Y_{FADH2}^{estim}$ ) to synthesize  $1 \text{ g}_{Xcat}$  targeting different effective growth yield values from 0.716 to  $5 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ . The generation of NADPH could occurred through different pathways but the transhydrogenase activity was maximized in this work in accordance with the results obtained in the experimental conditions.

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

The variations of  $Y_{AcetylCoA}^{estim}$  and  $Y_{FattyAcids}^{estim}$  versus the effective growth yield were calculated with the metabolic descriptor. From the calculations, the acetyl-CoA and fatty acid consumption yields for growth estimated by the descriptor could be expressed as a function of the effective growth yield:

$$Y_{AcetylCoA}^{estim} = Y_{AcetylCoA}^{max} \cdot \left(1 - \frac{Y_{S,Xcat}^{max}}{Y_{S,Xcat}^{eff}}\right) \quad \text{with } Y_{AcetylCoA}^{max} = 32384 \mu\text{mole.g}_{Xcat}^{-1} \quad \text{Équation 45}$$

$Y_{AcetylCoA}^{max}$  is the acetyl-CoA consumption yield for growth when all the acetyl-CoA from the PHA production is recovered for anabolism leading to an effective growth yield tending to infinity.

$$Y_{FattyAcids}^{estim} = \frac{2209.4}{Y_{S,Xcat}^{eff}} \quad (\mu\text{mole.g}_{Xcat}^{-1}) \quad \text{Équation 46}$$

A direct relation between the total growth yield ( $Y_{C,Xcat}$ ) from both acetyl-CoA and fatty acids and the effective growth yield was established:

$$Y_{C,Xcat} = \frac{1}{1.635392 - \frac{0.17255}{Y_{S,Xcat}^{eff}}} \quad (\text{Cmole.Cmole}^{-1}) \quad \text{Équation 47}$$

The total growth yield from both acetyl-CoA and fatty acids decreased while the effective growth yield increased. The higher  $Y_{S,Xcat}^{eff}$  the higher  $Y_{AcetylCoA}^{estim}$  and the lower  $Y_{C,Xcat}$ . To reach a  $Y_{S,Xcat}^{eff}$  of 0.99 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>, the consumption yield for growth of acetyl-CoA released by PHA production corresponds to 30% of the total acetyl-CoA consumption yield for growth (Tableau 19).

Concerning the reduced cofactors,  $Y_{NADH}^{estim}$  was higher than  $Y_{FADH2}^{estim}$  whatever the effective growth yield. At  $Y_{S,Xcat}^{eff}$  of 0.99 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>, it was more than three-fold higher (See Figure 29). The part of NADPH generated by the malic enzyme pathway decreased while the effective growth yield increased in order to minimize acetyl-CoA consumption. The quantities of FADH<sub>2</sub> and NADH consumed released by polymer biosynthesis represented respectively 4.4% and 10.8% of the total demand for these cofactors to satisfy the anabolic demand at the experimental effective growth yield (Tableau 19).

The improvement of the effective growth yield, when growth and production occurred simultaneously, was mainly due to the use of carbon from acetyl-CoA with low involvement of the energy stock, represented by reduced cofactors.

**Résultats - Partie A :** Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

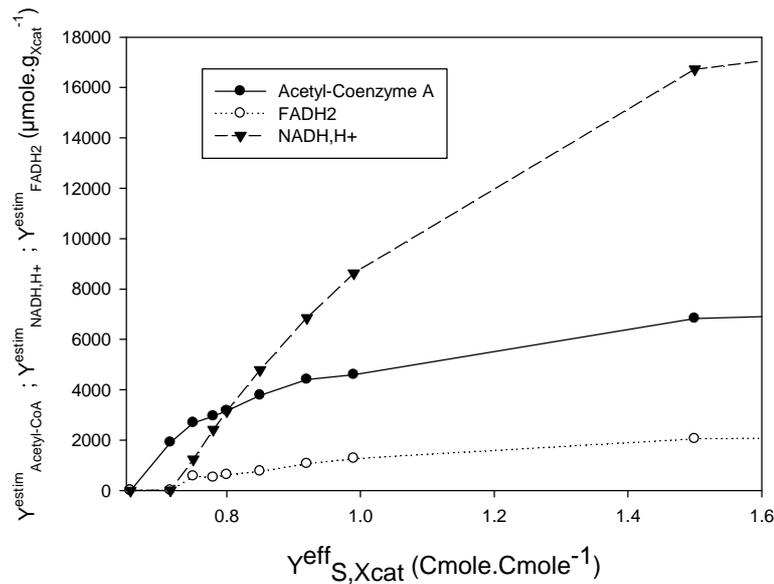


Figure 29: Estimated acetyl-CoA and reduced cofactor consumption yields for growth necessary to reach effective growth yields

Tableau 19: Anabolic demand of carbon and reduced cofactors at the experimental growth yield and effective growth yield

(Cmole.Cmole <sup>-1</sup> )	$Y_{S,Xcat}^{exp} = 0.66$	$Y_{S,Xcat}^{eff} = 0.99$
$Y_{FattyAcids}^{estim}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> )	3368	2231
Equivalent acetyl-CoA (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> )	30147	19976
$Y_{AcetylCoA}^{estim}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> )	0	8631
$Y_{AcetylCoA}^{total}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> )	30147	28607
% of acetyl-CoA from PHA production	0%	30%
$Y_{NADH}^{estim}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> )	0	4596
$Y_{NADH}^{total}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> )	46555	42362
% of NADH from PHA production	0 %	10.8 %
$Y_{FADH2}^{estim}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> )	0	1269
$Y_{FADH2}^{total}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> )	33270	28431
% of FADH <sub>2</sub> from PHA production	0%	4.4 %
Dissipated ATP yield (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> )	44786	44818

## Résultats - Partie A : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

As mentioned above, the reduced cofactors theoretical yields are respectively 0.73 mole of FADH<sub>2</sub> and 0.99 mole of NADH per mole of acetyl-CoA released by PHA production. Therefore, in our experimental conditions ( $Y_{S,Xcat}^{eff} = 0.99 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ ), the yields of FADH<sub>2</sub> and NADH per mole of acetyl-CoA were 0.15 and 0.53 mole.mole<sup>-1</sup> respectively. This means that though PHA production could provide more reduced cofactors, they would not be useful to reach the effective growth yield of 0.99 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>. Indeed some authors have suggested the existence of a futile energy-consuming cycle between polymer synthesis and degradation (De Eugenio et al., 2010 and Escapa et al., 2012). This cycle would consume one mole of ATP per cycle.

FADH<sub>2</sub> can only be converted into ATP thanks to the respiratory chain of cells (1 mole of ATP per mole of FADH<sub>2</sub>) although NADH can be transformed into ATP and/or NADPH. The comparison of the ratio of the NADH flux on the total NADPH demand flux, and on the NADPH flux generated only by the transhydrogenase activity could be helpful to investigate the fate of the reduced cofactor. The NADH flux did not satisfy the total NADPH demand flux (45% of the total demand) and represented only 71% of the total transhydrogenase activity at an effective growth yield close to 1 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>. Even though the fate of NADH from PHA production cannot currently be defined, the proportion of each estimated flux (acetyl-CoA, NADH and FADH<sub>2</sub>) recovered can be determined from experimental data.

### 1.4.2.4. Experimental carbon and energy use

The fluxes of the experimental substrate, the product, carbon dioxide and oxygen (data not shown) and kinetics values (presented in Tableau 18) highlighted the distribution of the carbon and of the reduced cofactors during each production phase thanks to the descriptor. The specific growth rate enabled the experimental anabolic demand (carbon and cofactors needs) to be quantified while the specific production rate determined the fluxes released and consequently potentially available to satisfy this anabolic demand. Assuming that all the ATP produced during the experimental growth phase was used for the catalytic biomass biosynthesis, the dissipated ATP fluxes designated by the descriptor for these simulations correspond to the cell maintenance energy flux (noted  $m$ ). The values for the experimental recovery of the acetyl-CoA, NADH and FADH<sub>2</sub> estimated from the simulations are given in Tableau 20.

The experimental fluxes released by the PHA production were higher than the fluxes necessary to satisfy anabolic demand and part of the pool of carbon and reduced cofactors available was recovered. The higher the kinetics values, the higher the proportion of both carbon and NADH recovered and the lower cell maintenance. Only a minor part of the available pool of carbon and reduced cofactors is valorized. This means that some undefined energy-consuming phenomenon is occurring. The higher the ratio  $q_{PHA}/\mu_{exp}$ , the higher the cell maintenance energy (Tableau 20). So, there seems to be a correlation between PHA biosynthesis and storage, and the cell maintenance energy. This suggests that cells need some energy to store polyhydroxyalkanoates inside granules or to maintain the granules intracellularly.

**Résultats - Partie A** : Optimisation de la répartition du carbone et de l'énergie lors du couplage de la croissance et de la production de PHA moyenne chaîne à partir d'acides gras chez *P. putida* KT2440

Tableau 20: Experimental carbon and cofactor distribution when growth and production occurs simultaneously

$q_{PHA}$ (Cmole.Cmole <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0.039	0.030	0.027	0.017
$q_{AcetylCoA}^{exp}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	574.6	737.1	483.4	378.0
$q_{NADH}^{exp}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	568.8	729.7	478.5	374.2
$q_{FADH2}^{exp}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	419.4	538.1	352.9	275.9
$\mu_{prod}$ (h <sup>-1</sup> )	0.040	0.027	0.019	0.008
$q_{AcetylCoA}^{exp\ demand}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	139.4	94.1	66.2	27.9
$q_{NADH}^{exp\ demand}$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	221.4	149.5	105.2	44.3
<b>%<math>\phi_{AcetylCoA}^{exp}</math> recovered</b>	<b>24.3%</b>	<b>13.1%</b>	<b>13.7%</b>	<b>7.4%</b>
<b>%<math>\phi_{NADH}^{exp}</math> recovered</b>	<b>38.9%</b>	<b>21.0%</b>	<b>22.0%</b>	<b>11.8%</b>
$Y_{ATP,Xcat}$ (g <sub>Xcat</sub> .mole <sup>-1</sup> )	9.08	6.05	4.36	1.81
$q_{PHA}/\mu_{exp}$	0.975	1.111	1.421	2.125
$m$ (μmole.g <sub>Xcat</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	2438.6	3136.8	3457.5	4028.7

Thanks to these results, the overall carbon yield of the whole experiment could still be slightly improved if growth and PHA production occur simultaneously from the beginning of the culture. In contrast, if growth first occurs alone and is then followed by polymer production with no further growth, the overall carbon yield would be lower (between 0.58 and 0.66 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>). So, even though the recovered proportion of carbon and reduced cofactors were small, the coupling of growth and medium chain length PHA production from fatty acids improved.

## I. 5 Conclusion

A modeling approach validated by experimental data describes carbon and energy flux distribution in the strain *P. putida* KT2440 when growth and PHA production occur simultaneously from fatty acids. Under these conditions, part of the carbon and reduced cofactors released by the polymer production are recovered to satisfy the anabolic demand imposed by the residual specific growth rate. This phenomenon induces optimization of carbon and energy fluxes to reach an overall experimental carbon yield of 0.7 Cmole.Cmole<sup>-1</sup> which is the highest value in the literature. This work highlights the relevance of fed-batch culture coupling growth and PHA production when substrates are catabolized through beta-oxidation compared to a culture where growth and production occur separately.

## II. Synthèse des résultats

- Cette étude a permis l'analyse stœchiométrique de la culture de *P. putida* KT2440, sur substrat acide gras, en culture Fed-batch avec une alimentation limitante en azote.
- L'analyse cinétique sur les 4 phases de production à des taux de croissance résiduels compris entre 0.01 et 0.04 h<sup>-1</sup> semble supposer d'une corrélation entre la vitesse spécifique de production de PHA et le taux de croissance.
- Un rendement carbone global de 0.7 Cmole.Cmole<sup>-1</sup> peut être atteint lorsque la croissance et la production de PHA ont lieu simultanément à partir de substrats acides gras.
- L'amélioration du rendement carbone global est due à la réutilisation d'une partie du carbone et de l'énergie libérée par la production de PHA pour satisfaire la demande anabolique résiduelle.
- La part du carbone et de l'énergie, provenant de la production des PHA, utilisée pour l'anabolisme ne représente qu'une faible part du carbone et de l'énergie libérée pourtant disponible.
- Cette part réutilisée est dépendante du degré de limitation en azote et donc des cinétiques de production et de croissance résiduelle (varie de 7.4 à 24.3% pour le carbone, de 11.8 à 38.9% pour l'énergie lorsque  $\mu$  passe de 0.017 et 0.039 h<sup>-1</sup>).
- Plus le rapport  $q_{\text{PHA}}/\mu_{\text{exp}}$  augmente, plus l'énergie dissipée est grande ( $m$  varie de 2439 à 4029  $\mu\text{mole.g}_{\text{Xcat}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  lorsque  $\mu$  passe de 0.039 et 0.017 h<sup>-1</sup>). La production de PHA engendre donc une augmentation du besoin en énergie.
- La conduite de culture en mode Fed-batch en couplant croissance et production est donc la meilleure stratégie si l'on veut optimiser les rendements carbone et énergétique.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

## B- Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

### Introduction

On a vu lors de l'analyse de la culture en mode Fed-batch sur acides gras à 30°C, présentée dans la partie A des résultats, qu'il semble exister une corrélation entre la vitesse spécifique maximale de production de PHA ( $q_{PHA}^{max}$ ) et de croissance ( $\mu$ ) d'après les 4 couples de valeurs expérimentales déterminées. Cette tendance s'inclue-t-elle dans une corrélation plus générale entre  $q_{PHA}^{max}$  et  $\mu$  ? En effet, l'existence d'une telle corrélation a déjà été mentionnée dans des travaux développés précédemment au laboratoire sur la production de PHA en condition de limitation nutritionnelle. En 1998, P. Gaudin a, lors de ces travaux de doctorat, établi une relation entre la vitesse relative de respiration (RRR), directement fonction du taux de croissance relatif ( $\mu/\mu_{max}$ ), et la vitesse spécifique maximale de production de PHA chez *Ralstonia eutropha* à partir de glucose en condition de limitation d'oxygène (Figure 30).

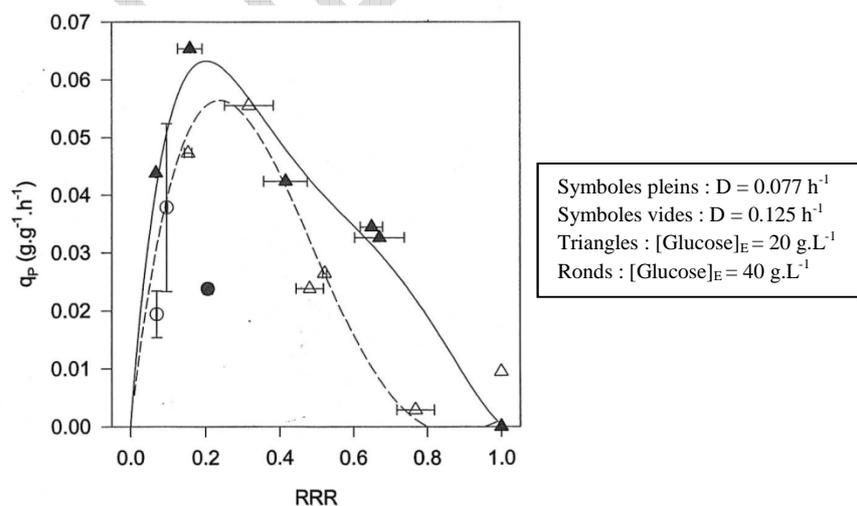


Figure 30 : Variation de la vitesse spécifique de production de PHA en fonction du niveau de limitation en oxygène chez *R. eutropha* avec le glucose comme substrat (Gaudin, 1998)

Plus récemment, E. Grousseau (2012) a déterminé une corrélation similaire pour la production de PHA courtes chaînes à partir d'acides gras volatils tels que l'acide butyrique, acétique et propionique en condition de limitation phosphore (Figure 31).

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

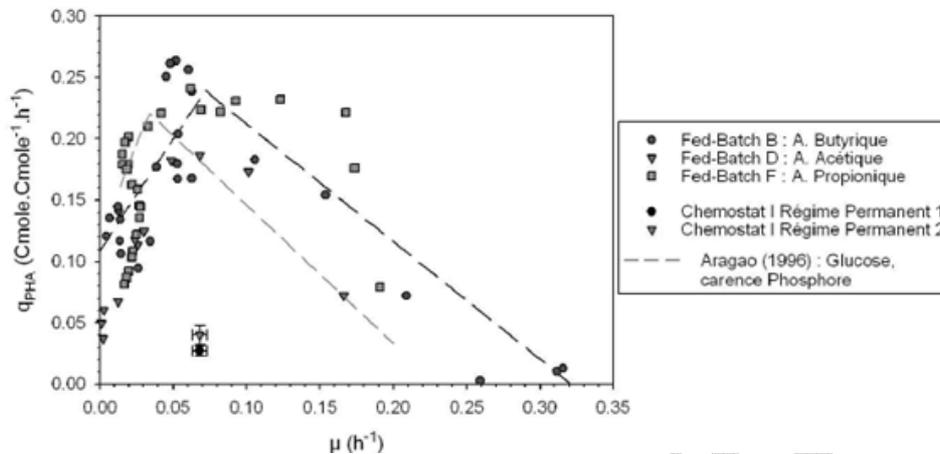


Figure 31 : Vitesse spécifique de production maximale de PHA en fonction du taux de croissance à partir d'acides gras volatils (Grousseau, 2012)

On constate, à partir des Figure 30 et Figure 31 que les vitesses spécifiques de production de PHA sont maximales lorsque le degré de limitation correspond au vingtième du potentiel anabolique maximal, c'est-à-dire, lorsque le rapport  $\mu/\mu_{max}$  avoisine 0.2 (RRR pour Gaudin 1998,  $0.06 \text{ h}^{-1}$  sur  $\mu_{max} = 0.3 \text{ h}^{-1}$  pour Grousseau 2012). Ce résultat semble indépendant de la source carbonée.

La détermination de cette corrélation est un élément clé pour le développement d'un procédé de production de composés intracellulaires tels que les polyhydroxyalcanoates car elle permet de mettre en lumière des points de fonctionnement nécessaires à l'optimisation du procédé en fonction des objectifs préalablement fixés (vitesse spécifique de production, accumulation, ...).

On sait que les vitesses spécifiques de production et de croissance sont liées à la vitesse spécifique d'accumulation du substrat ( $q_S$ ) par la souche selon l'équation 48 suivante :

$$q_S(t) = \frac{\mu}{Y_{X_{cat-S}}^{theo}} + \frac{q_{PHA}}{Y_{PHA,S}^{theo}} + m \quad \text{Équation 48}$$

Ainsi, pour atteindre une valeur de vitesse spécifique maximale de production de PHA ( $q_{PHA}^{max}$ ), il faut que  $q_S$  soit non limitant. Le taux de croissance  $\mu$  est contrôlé par le degré de limitation en azote imposé lors des cultures.

Ce chapitre va permettre, via des analyses cinétiques et stœchiométriques, d'évaluer les points de fonctionnement optimum nécessaire à la conception d'un procédé de production de PHA robuste avec la souche *P. putida* KT2440 à partir des différents substrats simples présents dans la composition des huiles végétales et graisses animales (glycérol et/ou acides gras).

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

## **I- Conditions opératoires en culture discontinu de type décélérostat et analyses cinétiques**

### **I.1 Description de la stratégie**

La stratégie de la culture choisie a pour but la détermination de la vitesse spécifique maximale de production de PHA pour différents taux de croissance, contrôlés par un apport limitant d'azote. Le mode de culture idéal pour ce genre d'étude reste le mode chémostat qui présente l'avantage de s'affranchir de l'historique de la cellule et de permettre de stabiliser le micro-organisme dans un métabolisme défini. Toutefois, l'accumulation de PHA nécessite le maintien d'un taux de division cellulaire faible, de ce fait, le mode de culture continu engendrerait des temps de stabilisation excessivement long avant que le renouvellement cellulaire ne soit effectif. Par conséquent, une stratégie de culture en mode Fed-batch a été dimensionnée afin d'estimer le plus justement possible la corrélation  $q_{PHA}^{max} = f(\mu)$ .

Les cultures ont été réalisées en deux phases distinctes :

- Une phase de croissance non limitée en azote afin d'atteindre une concentration en biomasse catalytique de l'ordre de  $3 \text{ g.L}^{-1}$  à laquelle correspond la carence du milieu minéral initial en élément azote, dont la composition est présentée dans le Matériels & Méthodes. C'est l'évolution exponentielle du débit d'alimentation en substrat carboné qui va imposer le taux de croissance durant cette phase.
- Une phase de production de PHA avec un apport limitant d'azote qui permet d'obtenir une variation linéaire décroissante du taux de croissance résiduelle entre  $0.15$  et  $0.01 \text{ h}^{-1}$ . L'apport de carbone, durant cette phase, devra permettre de satisfaire à la fois la demande anabolique imposée par le flux d'azote apporté et le potentiel maximal de production de bio-polymères de la souche. En fin de culture, un plateau à  $\mu$  constant est maintenu.

Dans le but de faciliter la mise en œuvre de cette culture, une stratégie basée sur le calcul prédisant les flux d'alimentations en azote et en carbone, nécessaire à la croissance et la production maximale de PHA, à chaque instant de la culture, a été élaborée.

Le but est, donc, d'établir une variation linéaire décroissante du taux de croissance  $\mu_{(t)}^{theo}$  au cours de la phase de production (équation 50).

$$\mu_{(t)}^{theo} = \mu_{init} - \frac{(\mu_{fin} - \mu_{init})}{t_{fin}} \cdot t \quad \text{Équation 49}$$

Pour cela, il est nécessaire de prendre en compte l'évolution théorique du flux d'alimentation en solution azotée ( $\Phi_{(t)}^N$ ) au cours du temps.

$$\Phi_{(t)}^N = X_{cat}^{init} \cdot V^{init} \cdot \frac{\varepsilon_N}{MM_X} \cdot \left( \frac{\mu_{fin} - \mu_{init}}{t_{fin}} \cdot t + \mu_{init} \right) \cdot \exp \left( t \cdot \left( \frac{\mu_{fin} - \mu_{init}}{2 \cdot t_{fin}} \cdot t + \mu_{init} \right) \right) \quad \text{Équation 50}$$

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

Avec,  $X_{cat}^{init}$  : la concentration de biomasse catalytique au début de la phase de production ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $V^{init}$  : le volume réactionnel au début de la phase de production (L)  
 $\varepsilon_N$  : le coefficient de conversion de l'azote en biomasse catalytique ( $\text{mole.Cmole}^{-1}$ )  
 $MM_X$  : la masse molaire de la biomasse catalytique ( $\text{g.Cmole}^{-1}$ )  
 $\mu_{init}$  et  $\mu_{fin}$  : les taux de croissance initiaux et finaux visés ( $\text{h}^{-1}$ )  
 $t_{fin}$  : la durée de la phase de production (h)

Ce calcul prend en compte de l'évolution théorique de la concentration en biomasse catalytique ( $X_{cat}^{theo}$ ) au cours de la culture avec comme contraintes imposées, une concentration initiale en cellules de  $3 \text{ g.L}^{-1}$  (concentration obtenue en fin de phase de croissance) et une concentration finale en biomasse totale à atteindre (ici nous avons choisi de viser une valeur de  $120 \text{ g.L}^{-1}$  pour s'assurer de ne pas être limité par le transfert d'oxygène dans le bioréacteur).

L'évolution théorique du flux d'alimentation en solution azotée ( $\Phi_{(t)}^N$ ) au cours du temps prend en compte l'évolution du facteur de multiplication théorique de la biomasse catalytique ( $F_{X_{cat}}^{fin}$ ) défini par l'équation 52.

$$F_{X_{cat}}^{fin} = \int (d\acute{e}c.c. \cdot t + \mu_{init}) \cdot \exp^{t \cdot (\frac{d\acute{e}c.c.}{2} \cdot t + \mu_{init})} \cdot dt \text{ avec } d\acute{e}c.c. = \frac{\mu_{fin} - \mu_{init}}{t_{fin}} \quad \text{Équation 51}$$

Soit :

$$F_{X_{cat}}^{fin} = \exp^{(\frac{d\acute{e}c.c.}{2} \cdot t^2 + \mu_{init} \cdot t_{fin})} + \frac{\pi^{0.5} \cdot \mu_{init}}{(-2 \cdot d\acute{e}c.c.)^{0.5}} \cdot \exp^{(\frac{\mu_{init}^2}{2 \cdot d\acute{e}c.c.})} \cdot \text{erf}(\frac{(-2 \cdot d\acute{e}c.c.)^{0.5}}{2} \cdot t_{fin} - \frac{\mu_{init}}{(-2 \cdot d\acute{e}c.c.)^{0.5}}) \quad \text{Équation 52}$$

La durée de décélération notée  $t_{fin}$  est fortement dépendante du facteur de multiplication et du taux de croissance initial que l'on désire appliquer et par conséquent de la concentration en biomasse totale au début de la phase de production.

L'allure de la courbe  $\Phi^{N\ theo} = f(t)$  (Figure 32) obtenue, permettant le pilotage de la culture durant la phase de production, étant difficilement applicables par des consignes de pompes, la linéarisation du profil du flux d'alimentation théorique en azote déterminé permet de faciliter la conduite de la culture. La Figure 32 présente également l'évolution du flux d'alimentation en azote consignée ( $\Phi^{N\ applied}$ ) au cours de la phase de production.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

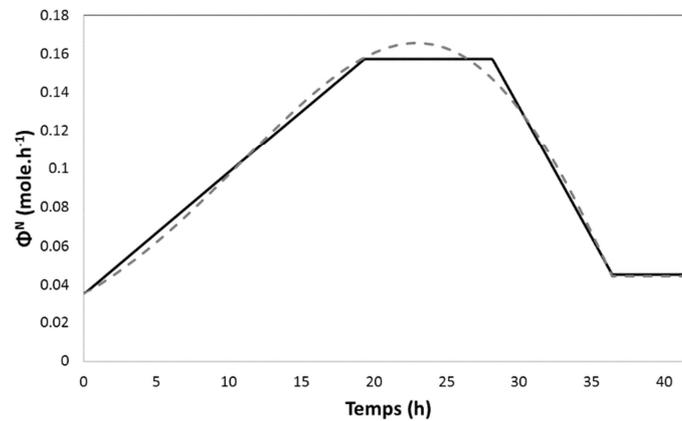


Figure 32 : Evolutions de  $\Phi^{N\ theo}$  (pointillés gris) et de  $\Phi^{N\ applied}$  (ligne continue noire) au cours de la phase de production de cultures en mode Fed-Batch

A partir de l'évolution du flux d'alimentation en azote ( $\Phi^{N\ applied}$ ) à appliquer au cours de la phase de production il est possible d'estimer l'évolution du taux de croissance en fonction du temps  $\mu_{(t)}^{applied}$  (Equation 54).

$$\mu_{(t)}^{applied} = \frac{\Phi_{(t)}^{N\ applied}}{X_{cat}(t-dt)} \cdot \exp^{-\mu_{(t-dt)}^{applied} \cdot t} \cdot \frac{MM_X}{\epsilon_N} \quad \text{Équation 53}$$

La Figure 33 détaille l'évolution de  $\mu_{(t)}^{theo}$  et de  $\mu_{(t)}^{applied}$  résultant des consignes de  $\Phi_{(t)}^{N\ applied}$ . On observe que l'évolution de  $\mu_{(t)}^{applied}$  n'est pas tout à fait linéaire mais son allure approche tout de même la droite décroissante visée.

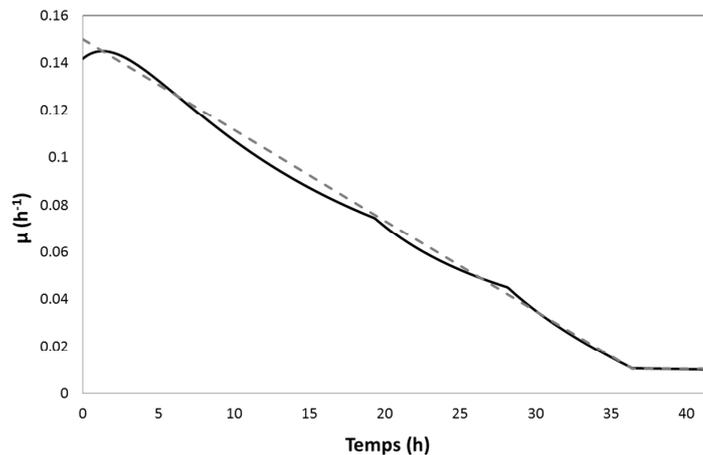


Figure 33 : Evolutions de  $\mu_{(t)}^{theo}$  (pointillés gris) et de  $\mu_{(t)}^{applied}$  (ligne continue noire) au cours de la phase de production de cultures en mode Fed-Batch

Le flux d'alimentation en substrat carboné ( $\Phi_{(t)}^S$ ) doit satisfaire à la fois la demande anabolique ( $\mu_{(t)}^{applied}$ ) et le potentiel maximal de production de PHA ( $q_{PHA}^{max}$ ) à chaque instant de la phase de production (Equation 55).

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

$$\Phi_S^S = \frac{\mu^{\text{applied}} \cdot X_{\text{cat}}(t) \cdot V(t)}{Y_{\text{cat},S}^{\text{theo}}} + \frac{q_{\text{PHA}}^{\text{max}} \cdot X_{\text{cat}}(t) \cdot V(t)}{Y_{\text{PHA},S}^{\text{theo}}} \quad \text{Équation 54}$$

Toutefois, l'équation 55 nécessite, pour sa résolution, la connaissance des valeurs de  $q_{\text{PHA}}^{\text{max}}$  de la souche pour chacun des taux de croissance  $\mu$ . Ces valeurs étant précisément ce que nous cherchons à déterminer par cette étude, la corrélation  $q_{\text{PHA}}^{\text{max}} = f(\mu)$  provenant des travaux de thèses d'E. Grousseau (2012) sur *Cupriavidus necator* pour la production de PHA à partir d'acide gras volatils a été utilisée afin de nous aider à déterminer le profil de départ de l'alimentation en carbone. Par la suite, les débits consignés sont ajustés en fonction des réponses apportés par les différents indicateurs de suivi de culture présentés ci-après. Un léger excès de substrat ( $S_{\text{rés}} < 2-3 \text{ g.L}^{-1}$ ) est maintenu dans le milieu réactionnel afin de s'assurer l'atteinte de la vitesse spécifique maximale d'assimilation du substrat  $q_S^{\text{max}}$ , à chaque instant, et par extension la vitesse spécifique maximale de production de PHA  $q_{\text{PHA}}^{\text{max}}$  si seuls les phénomènes biologiques sont pris en compte.

Indicateurs permettant d'ajuster la conduite :

- Une remontée de la valeur de la  $pO_2$ , sans action de l'agitation, de l'aération ou de la régulation de pression dans le réacteur, indique une limitation nutritionnelle dans le milieu
- La mesure des gaz de sorties et le calcul du coefficient respiratoire (QR) peuvent donner des indications sur la répartition du carbone consommé entre croissance et production de PHA (voir Tableau 21).

Tableau 21 : Coefficient respiratoire en fonction du substrat consommé en phase de croissance et de production

QR	Glycérol	Acide gras
<b>Phase de croissance</b>	0.70-0.75	0.45-0.50
<b>Phase de production</b>	0.80-0.85	0.60-0.65

- Le calcul en ligne du rapport  $C_{\text{accumulé}}/C_{\text{ajouté}}$  permet de connaître approximativement le rendement carbone de la culture. Ayant établi dans la partie A des résultats qu'un rendement de carbone global de  $0.7 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  peut être atteint à partir d'acides gras lorsque la croissance et la production sont couplés, cet indicateur calculé nous donne une information immédiate sur la tendance du substrat à s'accumuler ( $C_{\text{accumulé}}/C_{\text{ajouté}} > 0.7 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ ) ou s'épuiser ( $C_{\text{accumulé}}/C_{\text{ajouté}} < 0.7 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ ) dans le milieu réactionnel lorsque les substrats principaux sont des acides gras.
- Pour les cultures sur acide gras, lors de la phase de production en limitation azote, le suivi du pH et du temps de marche des pompes d'acide et de base renseignent également sur l'accumulation du substrat acide gras (la pompe de base tourne) ou sur la consommation du substrat excédentaire (la pompe d'acide tourne).
- Le dosage hors ligne de la concentration en substrat résiduel permet, en cas d'excès ou de limitation, d'ajuster le débit d'alimentation en substrat (voir II.1 du Matériels & Méthodes).

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

## I.2 Détermination de la corrélation entre la vitesse spécifique de production de PHA et le taux de croissance à partir de glycérol

La culture, présentée dans cette partie, sera nommée B dans le reste de ce manuscrit.

### I.2.1 Objectif de la culture B

En vue d'une utilisation de substrats bruts tels que les graisses animales, il est important d'étudier le catabolisme de tous les substrats carbonés simples présents dans leurs compositions. Ces sources carbonées étant largement composées de mono-, di- ou triglycérides, le glycérol est une molécule relativement présente. Par conséquent, cette culture a pour objectif l'évaluation des potentialités de croissance et de production de PHA à partir de glycérol au travers de la voie de biosynthèse des acides gras (voir III.2.2 de l'état de l'art).

### I.2.2 Conduite de la culture B

D'après la littérature, la souche *P. putida* KT2440 aurait des difficultés à initier sa croissance à partir de glycérol seul, ce qui engendrerait une longue phase de latence. Pour réduire cette latence, Escapa et al. 2013 et Miura et al. 2013 expliquent qu'il est utile d'ajouter un co-substrat carboné. Ce dernier permettrait l'induction de l'activité de la glyceraldéhyde-3-Phosphate déshydrogénase, qui intervient dans le catabolisme du glycérol en convertissant le glycérol-3-Phosphate en DiHydroxyAcétone-Phosphate (DHAP).

La culture est donc lancée sur glycérol seul. Le suivi de la vitesse de production de dioxyde de carbone, des apports de liquides correcteurs de pH permettent l'évaluation du potentiel d'assimilation du glycérol et de croissance. Ces indicateurs, lors de la phase de croissance, sont présentés dans la Figure 34.

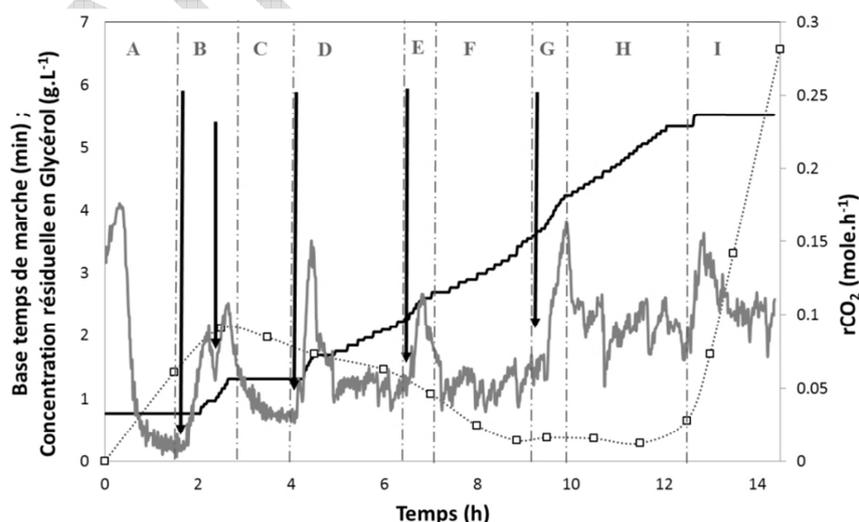


Figure 34 : Phase de croissance : suivi de l'évolution de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> (courbe grise), du temps de fonctionnement de la pompe affectée à la solution basique de correction du pH (courbe noire), et de la concentration résiduelle en glycérol (carrés vides)

## Résultats - Partie B : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

Cette phase a duré 14.5 heures. Le taux de croissance consigné par le débit d'alimentation en glycérol est égal à  $0.15 \text{ h}^{-1}$  jusqu'à carencer le milieu minérale en azote. Toutefois, dans la zone notée A, la vitesse de production de  $\text{CO}_2$  est de l'ordre de  $0.01 \text{ mole.h}^{-1}$ , et la pompe de base ne tourne pas, ce qui signifie que le taux de croissance expérimental est très faible. Pourtant, d'après Pobleto-Castro et al., 2014, le taux de croissance maximal sur glycérol est de  $0.22 \text{ h}^{-1}$ . Comme relaté dans la littérature, nous observons une phase de latence sur glycérol seul. On effectue alors des ajouts successifs de glucose (1.5 g par pulse, indiqués par des flèches noires sur la Figure 34) jusqu'à stabiliser une croissance calculé à partir de  $r_{\text{CO}_2}$ .

On observe, après les deux premiers ajouts (période B), que la vitesse de production de dioxyde de carbone  $r_{\text{CO}_2}$  augmente instantément attestant d'une augmentation du taux de croissance. De plus, la pompe d'alimentation en solution basique tourne afin de neutraliser la consommation d'ions ammonium du milieu réactionnel. Quelques minutes après le second ajout, sur la période C, la pompe de base s'arrête à nouveau et la vitesse de production de  $\text{CO}_2$  diminue jusqu'à atteindre un plateau à  $0.03 \text{ mole.h}^{-1}$ . Le taux de croissance a donc diminuer mais est resté tout de même supérieur au taux de croissance de la phase A. Un nouvel ajout de glucose est effectué au début de la période D provoquant les mêmes effets que sur les périodes B puis C sauf que  $r_{\text{CO}_2}$  diminue jusqu'à  $0.05 \text{ mole.h}^{-1}$ . A noter que, cette fois, la pompe de base ne s'arrête plus de fonctionner. Le taux de croissance ayant augmenté, la vitesse de consommation de l'azote du milieu est devenue suffisamment significative pour que la régulation basique du pH soit en marche de manière continue. Après la période E montrant un nouveau saut de la valeur de vitesse de production de dioxyde de carbone du fait de l'ajout de glucose,  $r_{\text{CO}_2}$  atteint une valeur de  $0.06 \text{ mole.h}^{-1}$ . Un dernier pulse (phase G) permet d'atteindre une vitesse de production de  $\text{CO}_2$  durant la période H de  $0.10 \text{ mole.h}^{-1}$ . La phase I décrit la carence azote du milieu réactionnel puisque la pompe de base s'est arrêtée et le glycérol commence à s'accumuler plus fortement.

Même si l'hypothèse de l'activation de la glyceraldéhyde-3-Phosphate déshydrogénase par l'ajout d'un co-substrat ne peut être confirmée, il est clair que l'initiation de la croissance sur glycérol seule est lente et l'utilisation du glucose a permis un gain de temps certain sur la durée totale de la phase de croissance. Au vue des valeurs de  $r_{\text{CO}_2}$  obtenue en fin de phase de croissance, le taux de croissance expérimental maximal  $\mu_{\text{max}}^{\text{exp}}$  atteint est estimé à  $0.07 \text{ h}^{-1}$ . La stratégie présentée en I.1 de la partie B des résultats est donc redéfinie afin de balayer une gamme de vitesses spécifiques d'accroissement cellulaire (décroissance entre  $0.07$  et  $0 \text{ h}^{-1}$ ), pouvant être obtenue sur glycérol.

La Figure 35 présente les évolutions du pH, des temps de marche des pompes de base et d'acide et de la concentration en glycérol résiduel au cours de la phase de production de PHA.

## Résultats - Partie B : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

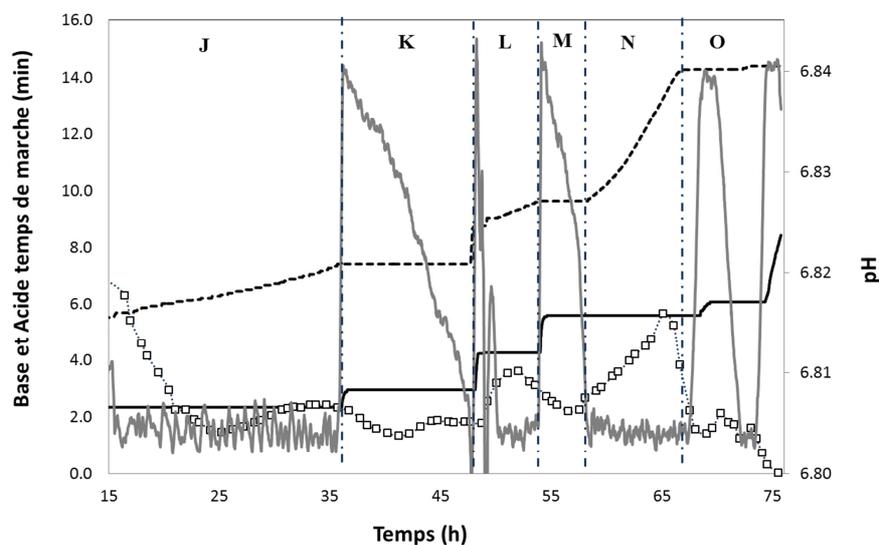


Figure 35 : Evolution de la régulation pH (tirets noirs : base ; courbe noire : acide), du pH (gris clair) et de la concentration résiduelle en glycérol (carrés vides) au cours de la phase de production de la culture B

L'objectif de la culture est de parvenir à atteindre la vitesse spécifique maximale de production de PHA à chaque instant et donc pour chaque  $\mu$  balayés. Le léger excès de glycérol résiduels tout au long de la phase de production prouve que l'apport de substrat carboné est suffisant et que le potentiel de production ne sera pas sous-estimé. Néanmoins, le suivi du pH et des alimentations en solutions correctrices de pH au cours de cette phase laisse suspecter d'une accumulation de co-métabolites, probablement acides (pompe de base tourne tout au long des périodes notées J, L et N). En fin de culture, à partir de 65 heures, le débit de pompe de l'alimentation en glycérol est fortement diminué afin de consommer l'ensemble du substrat résiduel encore présent dans le milieu. Le pH augmente alors et la pompe d'acide se met à tourner indiquant la consommation d'un composé acide comme source de carbone. Une seconde hausse du pH intervient à 72 heures avec la même conséquence sur la pompe d'acide. Les composés acides consommés lors de la phase O sont probablement ceux produits durant l'ensemble de la phase de production. Le dosage de surnageants de cette culture par chromatographie phase liquide colonne  $H^+$  (cf. Matériels & Méthodes II.1.2) confirme cette accumulation de co-métabolites au fil de la phase de production et leur consommation en fin de culture. Poblete-Castro et al., 2014 évoque la possibilité d'une production de citrate comme coproduit issu d'un « overflow » de carbone, tandis que Beckers et al. 2016 évoque une production de malate et de succinate. Ce phénomène d'« overflow » résultant d'un excès de carbone résiduel dans le milieu minéral au moment de la bascule en phase de production a déjà été prouvé sur d'autres souches, comme *Yarrowia lipolytica* qui accumule des lipides. Il est donc important de bien maîtriser l'alimentation en substrat pour gérer cette transition de phases.

### I.2.3 Analyse des performances finales de la culture B

La Figure 36 montre l'évolution des concentrations en biomasse catalytique et produit et du pourcentage d'accumulation intracellulaire des PHA lors de cette culture. Il est possible de déterminer

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

le pourcentage d'accumulation de PHA, à chaque instant, en ramenant la quantité de PHA à la biomasse totale par la formule suivante :

$$\chi_{PHA} = \frac{PHA(t)}{X_{tot}(t)} = \frac{PHA(t)}{PHA(t) + X_{cat}(t)} \quad \text{Équation 55}$$

Ce pourcentage d'accumulation augmente régulièrement tout au long de la phase de production, jusqu'à atteindre 43% ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

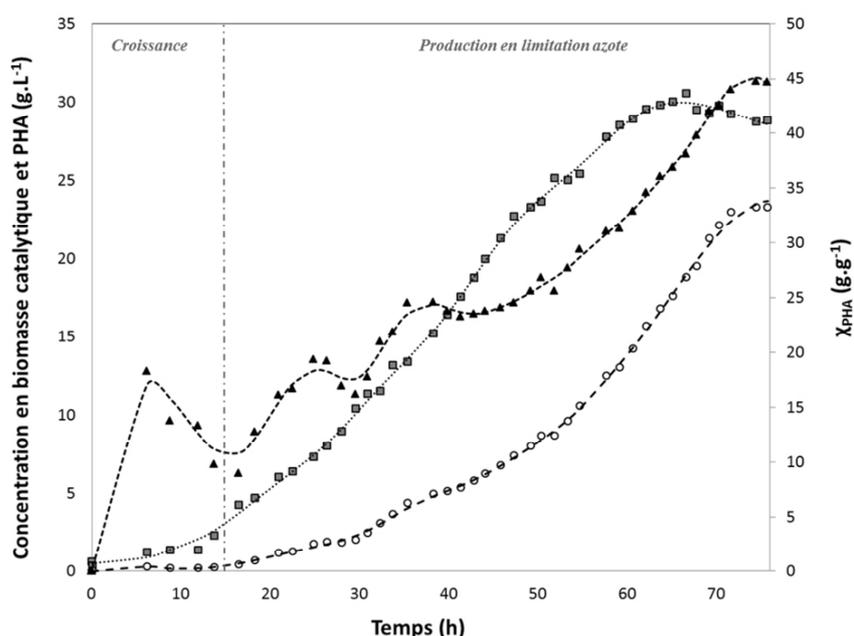


Figure 36 : Evolution des variables macroscopiques : concentration en biomasse catalytique (carrés gris), PHA (ronds vides) et le pourcentage d'accumulation (triangles noirs) au cours de la culture

Au terme de 76 heures de culture, 55  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de biomasse totale contenant 23.4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de PHA, soit 43% ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) d'accumulation ont été synthétisés. L'évolution des rendements expérimentaux de carbone global ( $Y_{S,Xt}^{exp}$ ), de production de PHA ( $Y_{S,PHA}^{exp}$ ) et le rendement énergétique de croissance ( $Y_{ATP,Xcat}$ ), déterminé à l'aide du descripteur métabolique, sont résumés dans le Tableau 22 ci-dessous :

Tableau 22 : Récapitulatif des rendements carbones expérimentaux obtenus lors de la culture B et les rendements énergétiques correspondant déterminés à l'aide du descripteur métabolique

	Croissance	Phase production 1	Phase production 2
$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.07	0.07-0.03	0.03-0
$Y_{S,Xt}^{exp}$ ( $\text{Cmole} \cdot \text{Cmole}^{-1}$ )	0.50	0.36	0.31
$Y_{S,PHA}^{exp}$ ( $\text{Cmole} \cdot \text{Cmole}^{-1}$ )	0.06	0.11	0.21
$Y_{ATP,Xcat}$ ( $\text{g}_{Xcat} \cdot \text{mol}_{ATP}^{-1}$ )	4.96	3.21	1.94

## Résultats - Partie B : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

Le rendement de croissance sur la phase de croissance est quelque peu biaisé car parmi le carbone consommé, 0.25 Cmole proviennent du glucose ajouté sous forme de pulses. Le rendement expérimental de croissance est de  $0.44 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ . Sans synthèse de PHA, le rendement maximal de croissance pouvant être atteint à partir de glycérol  $Y_{S, X_{cat}}^{max}$  est de  $0.60 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  d'après le descripteur métabolique. L'ensemble des rendements obtenus à partir de glycérol est plus faible que ceux obtenus sur acides gras (partie A des résultats). En effet, sur glycérol les voies métaboliques de l'anabolisme et de production de PHA sont totalement découplées. Les PHA sont synthétisés via la voie de biosynthèse des acides gras qui est énergivore. Comme le montre le Tableau 22, les rendements énergétiques de croissance  $Y_{ATP, X_{cat}}$  obtenus lors de la culture B sont largement inférieurs à celui obtenu sur acide gras qui était de  $10.91 \text{ g}_{X_{cat}} \cdot \text{mol}_{ATP}^{-1}$ . En effet, pour chaque ajout d'une molécule d'acétyl-CoA, allongeant la chaîne latérale du monomère de 2 carbones, deux moles de NADPH sont consommées. Cette demande en coenzyme réduit pour la synthèse de PHA vient altérer le rendement expérimental de carbone global obtenu lors de la phase de croissance seule.

La composition monomérique du polymère final produit est présentée dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Composition monomérique des PHA finaux produits lors de la culture B

Nature du monomère	3-HHx	3-HO	3-HD	3-HDD	3-HTD
% (mole.mole <sup>-1</sup> )	2.9	18.2	62.1	16.3	0.5

On peut noter que l'acide 3-hydroxydécanoïque est très majoritaire dans le profil monomérique des PHA obtenu.

### I.2.4 Analyse des cinétiques de la culture B

Un excès de glycérol étant constamment présent dans le milieu, l'ensemble des vitesses spécifiques obtenues lors de cette culture sont maximales à tout instant.

On observe, d'après la Figure 37, que le taux de croissance décroît de manière globalement linéaire suivant, ainsi, la consigne imposée par le débit d'alimentation en ammoniacque.

**Résultats - Partie B :** Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

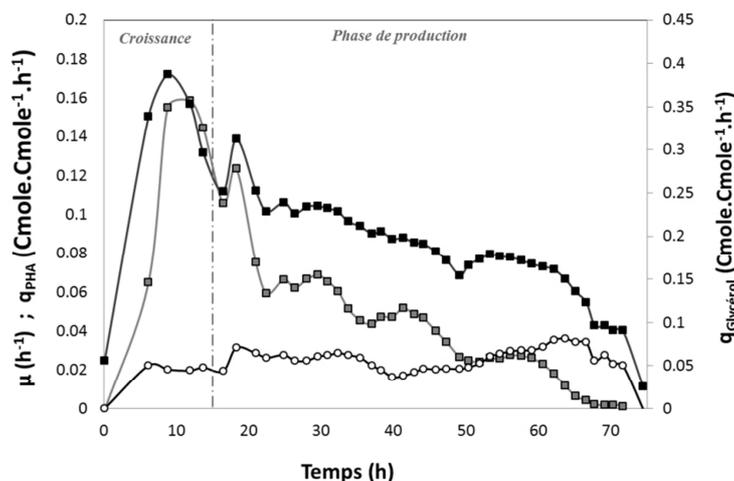


Figure 37 : Evolutions des vitesses spécifiques de consommation du substrat (carrés noirs), de production de PHA (ronds vides) et de croissance (carrés gris) au cours de la culture B

En dépit de cette évolution de  $\mu$ , la vitesse spécifique de production de PHA  $q_{PHA}$  n'évolue que très peu (variation entre 0.02 et 0.03  $Cmole.Cmole^{-1}.h^{-1}$ ) au cours de la culture. On constate qu'en phase de croissance un taux de croissance expérimental supérieur à  $0.15 h^{-1}$  a pu être obtenu, mais cela est dû à la présence du glucose avec le glycérol comme substrat. Cette valeur n'est pas représentative du potentiel anabolique de la souche sur glycérol.

La Figure 38 permet de mettre en lumière une corrélation entre la demande anabolique caractérisée par le taux de croissance et les vitesses spécifiques de consommation du substrat et de production de PHA.

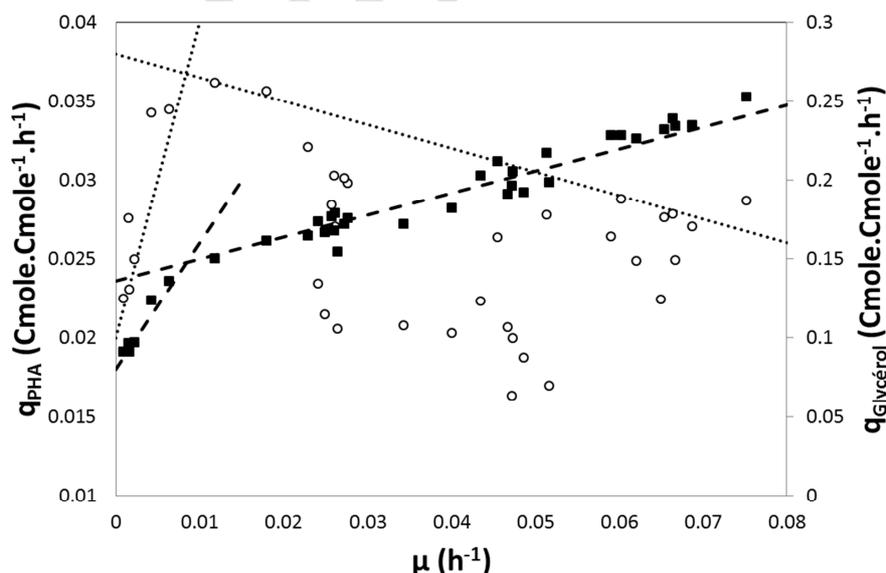


Figure 38 : Vitesses spécifiques de production de PHA (ronds vides) et de consommation du substrat (carrés noirs) en fonction du taux d'accroissement de la biomasse catalytique ( $\mu$ ) lors de la culture B

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

On constate que la distribution du carbone intracellulaire est très différente lorsque le taux de croissance résiduel est inférieur ou supérieur à  $0.01 \text{ h}^{-1}$ . Il existe une relation entre  $q_{\text{Glycérol}}$  et  $q_{\text{PHA}}$ , lorsque  $\mu$  est inférieur à  $0.01 \text{ h}^{-1}$ , de la forme :  $q_{\text{Glycérol}} = \frac{q_{\text{PHA}}}{Y_{S,\text{PHA}}} + m$ . L'augmentation de 0 à  $0.01 \text{ h}^{-1}$  du taux de croissance, dictée par la limitation de l'apport d'azote, entraîne une augmentation du flux d'assimilation de carbone de  $0.09 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$  qui permet une augmentation de la vitesse spécifique de production de PHA de  $0.018 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Pour les taux de croissance augmentant de  $0.01$  à  $0.07 \text{ h}^{-1}$ , on voit que  $q_{\text{Glycérol}}$  augmente de  $0.1 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , tandis que  $q_{\text{PHA}}$  diminue de  $0.01 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . L'accroissement du flux d'assimilation du carbone ne profite pas à la production de PHA ce qui explique pourquoi les rendements expérimentaux de production diminue significativement avec l'augmentation du taux de croissance jusqu'à  $0.07 \text{ h}^{-1}$ .

Les valeurs de vitesses spécifiques maximales de production de PHA, obtenues ici à partir de glycérol, sont très inférieures à celles obtenues à partir d'acides gras dans la partie A des résultats (Tableau 18). Il y a donc un paramètre limitant la vitesse spécifique de production des polymères par la voie de biosynthèse des acides gras. On a évoqué précédemment, la production de composés organiques acides durant la culture B lié à un « overflow » de carbone, on peut donc en conclure que ce n'est pas la vitesse spécifique d'assimilation du substrat qui limite  $q_{\text{PHA}}$ . Par déduction, la limitation de ces cinétiques de production provient de la voie de biosynthèse des acides gras elle-même et donc soit de l'acétyl-CoA carboxylase, soit du complexe FAS.

On note que la vitesse spécifique de production de PHA sur glycérol est maximale lorsque le potentiel anabolique  $\mu/\mu_{\text{max}}$  est égal à  $0.14$  ( $\mu_{\text{max}}^{\text{exp}}=0.07 \text{ h}^{-1}$ ). A l'inverse, pour des taux de croissance supérieurs à cette valeur,  $q_{\text{PHA}}$  augmente avec le taux de croissance tandis que la vitesse spécifique de consommation du glycérol  $q_{\text{Glycérol}}$  diminue.

La Figure 39 schématise les différents flux carbonés au sein de la cellule en condition de production de PHA à partir de glycérol.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

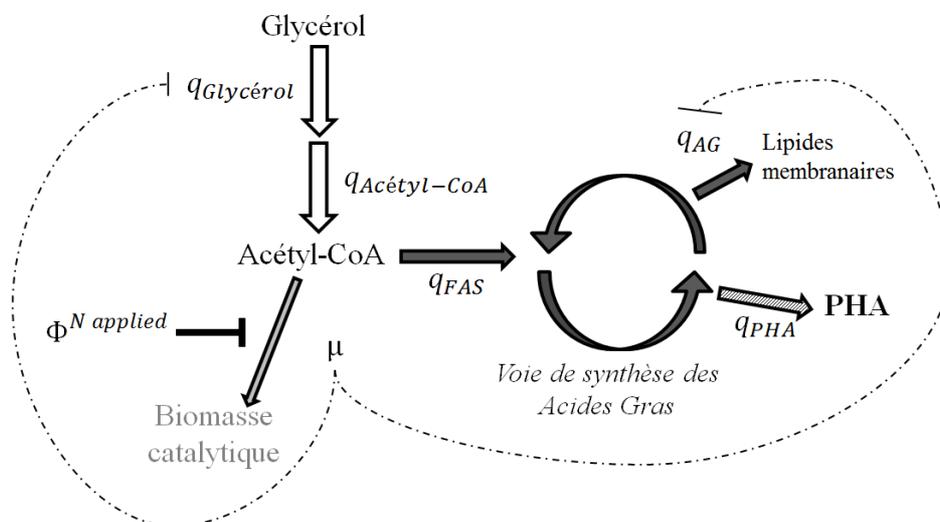


Figure 39 : Schémas représentant la répartition du carbone dans la cellule à partir du glycérol en condition de production de PHA ( $q_{FAS}$  : la vitesse spécifique de biosynthèse des acides gras directement liée aux activités enzymatiques de l'acétyl-CoA carboxylase et du complexe FAS ;  $q_{PHA}$  : la vitesse spécifique de production de PHA dépendante des activités enzymatiques de la R-3-hydroxyacyl-(ACP-CoA) transférase et de la PHA synthase)

Le taux de croissance imposée par le flux d'alimentation en azote au cours de la phase de production, contrôle la demande cellulaire en lipides structuraux et en glycérol à assimiler.  $\mu$  étant, dans ces conditions, inférieur au potentiel anabolique maximal, une réorganisation des flux carbonés au sein de la cellule s'effectue.

Grâce au descripteur métabolique, il est possible de préciser les demandes en acétyl-CoA et en lipides membranaires de la cellule pour un taux de croissance donné. Les résultats de ces simulations sont présentés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Estimations des flux d'acétyl-CoA et de lipides membranaires en fonction de  $\mu$

$\mu$ $h^{-1}$	$q_{Acétyl-CoA}$ $Cmole.Cmole^{-1}.h^{-1}$	$q_{lipides\ membranaires}$ $Cmole.Cmole^{-1}.h^{-1}$	$q_{PHA}$ $Cmole.Cmole^{-1}.h^{-1}$
0.07	0.0099	0.0123	0.027
0.01	0.0014	0.0018	0.035

D'après la Figure 39 et le Tableau 24, on constate qu'entre  $\mu$  égal à 0.07 et 0.01  $h^{-1}$ , l'accroissement de  $q_{PHA}$  correspond à la diminution de  $q_{lipides\ membranaires}$ . On peut donc avoir une redistribution du carbone des lipides structuraux vers les PHA sans qu'il n'y ait formellement un accroissement de  $q_{FAS}$  (cf. Figure 39).

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

### I.3 Détermination de la corrélation entre la vitesse spécifique de production de PHA et le taux de croissance à partir de glycérol et d'acides gras

La culture, présentée dans cette partie, sera nommée C dans le reste de ce manuscrit.

#### I.3.1 Objectif de la culture C

Après avoir étudié les potentialités de production de PHA à partir d'acides gras (partie A des résultats) puis sur glycérol (I.2 de la partie B des résultats), il est nécessaire de s'intéresser aux potentiels de production de ces composés à partir de glycérol et d'acides gras en co-substrats. On a vu dans l'état de l'art de ce manuscrit, que les voies métaboliques empruntées par ces deux types de substrats simples pour la production de polymère sont très différentes, voir même opposées. En effet, à partir d'acides gras, les PHA sont synthétisés grâce à la voie de la  $\beta$ -oxydation. Le glycérol doit pour sa part remonter la voie de biosynthèse des acides gras pour permettre la synthèse de polymères. Comme il semble improbable que la souche dégrade des acides gras (par la  $\beta$ -oxydation) d'un côté, pour en synthétiser à partir de glycérol d'un autre, il est important de s'assurer qu'une co-consommation des substrats est possible sans qu'une répression d'assimilation de l'un par l'autre n'est lieu (Figure 40). Leurs apports respectifs respecteront les proportions relatives de ces composés dans les graisses de canards ( $0.15 \text{ Cmole}_{\text{Glycérol}}/\text{Cmole}_{\text{Acide gras}}$ ). Cette culture a, également, pour objectif l'analyse cinétique et stœchiométrique de cette production en co-substrats afin d'évaluer si il existe une meilleure utilisation du carbone grâce à une synergie catabolique.

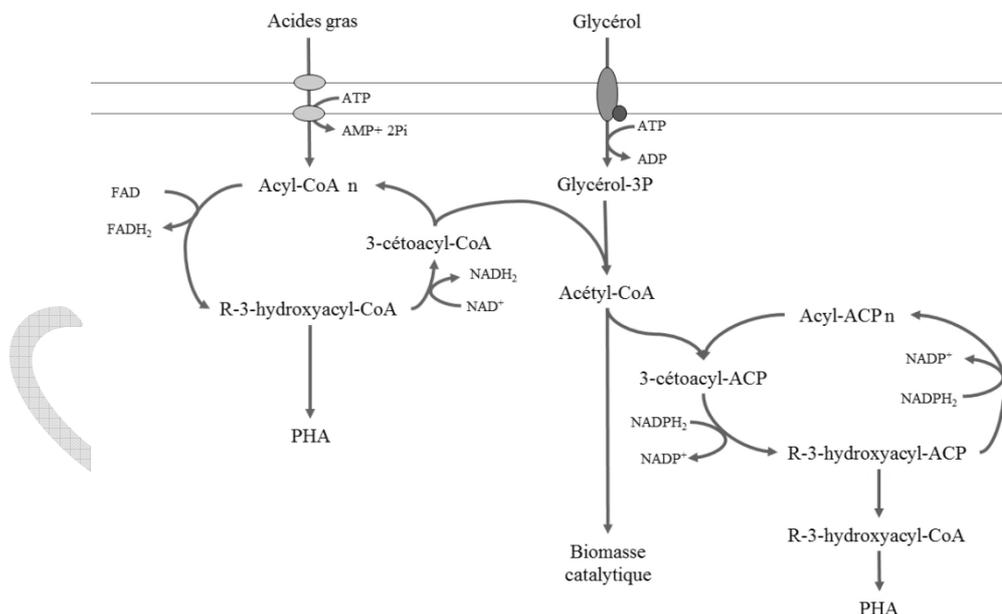


Figure 40 : Schéma des voies métaboliques de génération et d'utilisation de l'acétyl-CoA à partir des substrats glycérol et/ou acides gras

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

### I.3.2 Conduite de la culture C

La phase de croissance a duré 9.5 heures sur acides gras et glycérol. Le taux de croissance consigné par le débit d'alimentation en substrats est égal à  $0.15 \text{ h}^{-1}$  jusqu'à carencer le milieu minérale en azote. Le taux de croissance expérimental obtenu est légèrement supérieur car égal à  $0.16 \text{ h}^{-1}$ .

Une fois l'épuisement de l'élément azote dans le milieu intervenu, la stratégie présentée précédemment (I.1 de la partie B des résultats) peut être appliquée. La Figure 41 présente les évolutions expérimentales des alimentations en acide gras, en glycérol et en solution d'ammoniaque au cours de la culture, ainsi que les concentrations résiduelles en substrats. Le débit d'alimentation en glycérol est asservi sur celui des acides gras selon la relation  $Q_{\text{Glycérol}} = 0.21 Q_{\text{AG}}$ , ce qui permet d'apporter des deux substrats selon le rapport  $0.15 \text{ Cmole}_{\text{Glycérol}}/\text{Cmole}_{\text{AcideGras}}$ .

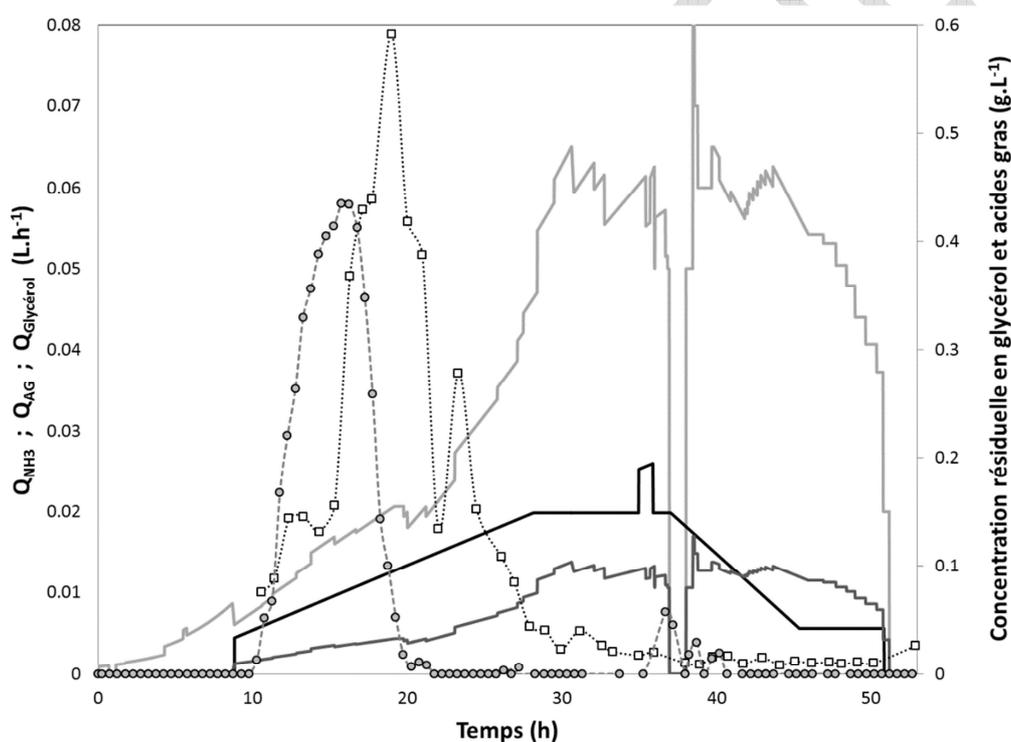


Figure 41 : Récapitulatif du pilotage de la culture C en mode Fed-batch à partir des débits  $Q_{\text{NH}_3}^{\text{exp}}$  (courbe noire),  $Q_{\text{Glycérol}}^{\text{exp}}$  (courbe gris foncée) et  $Q_{\text{AG}}^{\text{exp}}$  (courbe gris claire) et de l'évolution de la concentration en substrats résiduels dans le milieu réactionnel (ronds gris : glycérol ; carrés vides : acides gras)

Entre 10 et 20 heures de culture, la méconnaissance de la demande en source carbonée a conduit à un apport excédentaire en carbone qui s'accumule dans le moût de culture sous forme d'acide gras et de glycérol (Figure 41). L'obtention de concentrations résiduelles maximales du même ordre de grandeur alors que le carbone ex-glycérol ne représente que 15% du flux carbone total ainsi que l'épuisement du polyol alors que l'accumulation des acides gras se poursuit peuvent être interprétés comme un retard à la mise en place du catabolisme adapté du glycérol. On peut penser qu'à

## Résultats - Partie B : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

une accumulation du glycérol correspond, soit une réduction du potentiel de consommation, soit une redistribution métabolique comme cela peut être constaté à 37 h lorsqu'un flux accidentel en azote a levé temporairement la limitation nutritionnelle en azote. Une suraccumulation d'acides gras pourrait favoriser la coalescence et réduire d'autant l'aire spécifique d'échange diffusif des acides gras et ainsi limiter la disponibilité en substrat, c'est pourquoi il est important de maîtriser le léger excès en acides gras résiduels dans le milieu.

On peut désormais affirmer que les deux substrats sont bien co-consommés. Le devenir du carbone, au sein de la cellule, peut être étudié par l'analyse du bilan carbone. En prenant en compte la valeur du rendement expérimentale de croissance  $Y_{S,X_{cat}}^{exp}$  de la culture B (décrit en I.2.4 de la partie résultat), on constate que le glycérol seul ne suffit pas à subvenir aux besoins de l'anabolisme, comme le montre la Figure 42.

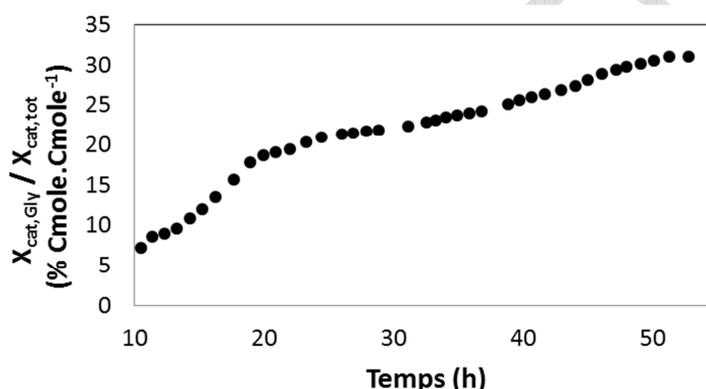


Figure 42 : Evolution de la part de biomasse catalytique synthétisée à partir du glycérol par rapport à la biomasse catalytique totale synthétisée

La part de biomasse catalytique synthétisée à partir du glycérol augmente au cours du temps car la demande anabolique évolue au cours de la culture et donc la répartition du carbone entre l'anabolisme et la production de PHA change. On peut donc conclure que, dans ces proportions glycérol-acides gras d'alimentation, le glycérol sert uniquement à la croissance des cellules alors que les acides gras sont utilisés à la fois pour la production de PHA et en complément pour la croissance. Cette utilisation des substrats n'est vraie que dans les proportions d'alimentation glycérol-acides gras de la culture C. Des hypothèses peuvent être faites quant au devenir des carbones ex-glycérol et ex-acides gras en fonction des différences d'affinités de la souche pour ces substrats si la part de glycérol dans l'alimentation totale en carbone devient majoritaire. Deux scénarios auraient pu se présenter :

- *P. putida* a une plus forte affinité pour le glycérol : dans ce cas, la croissance et la synthèse de PHA s'effectueraient à partir de ce substrat (via la voie de biosynthèse des acides gras). Les acides gras s'accumuleraient alors dans le réacteur.
- *P. putida* a une plus forte affinité pour les acides gras (ce qui semble être le cas) : La souche transformera les acides gras en PHA et utilisera le glycérol pour satisfaire entièrement l'anabolisme. L'excès de glycérol non requis pour l'anabolisme s'accumulera dans le milieu réactionnel.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

Les évolutions des concentrations en biomasses catalytique et PHA, ainsi que le pourcentage d'accumulation en PHA au cours de la culture sont présentées dans le Figure 43. L'arrêt de l'alimentation carbonée mis en place à 38 heures afin de ramener la concentration en glycérol à sa valeur limitante se traduit à la limitation de la croissance et de la production. Le pourcentage d'accumulation augmente régulièrement tout au long de la phase de production, comme pour la culture B, jusqu'à atteindre 40% ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

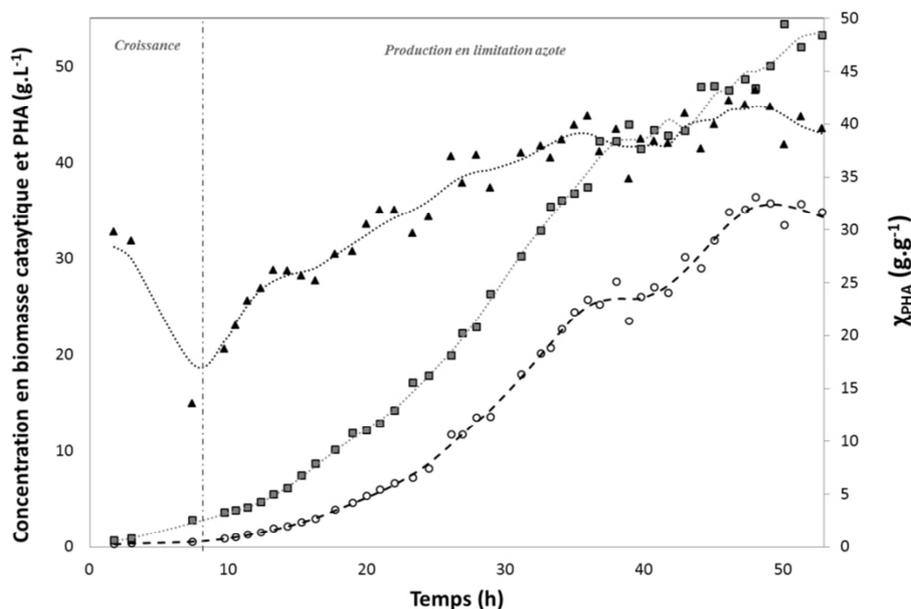


Figure 43 : Evolution des variables macroscopiques : concentration en biomasse catalytique (carrés gris), PHA (ronds vides) et le pourcentage d'accumulation (triangles noirs) au cours de la culture C

### I.3.3 Analyse des performances finales de la culture C

Au terme de 52 heures de culture,  $88 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomasse totale ayant accumulés  $40.3\%$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de PHA ont été synthétisés. L'évolution des rendements expérimentaux de carbone global ( $Y_{S,Xt}^{exp}$ ), de production de PHA ( $Y_{S,PHA}^{exp}$ ) et le rendement énergétique de croissance ( $Y_{ATP,Xcat}$ ), déterminée à partir du descripteur métabolique, sont résumés dans le Tableau 25 ci-dessous :

Tableau 25 : Récapitulatif des rendements carbonés expérimentaux obtenus lors de la culture B et les rendements énergétiques correspondant déterminés à l'aide du descripteur métabolique

	Croissance	Phase production 1	Phase production 2
$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.15	0.15-0.08	0.08-0
$Y_{S,Xt}^{exp}$ ( $\text{Cmole}\cdot\text{Cmole}^{-1}$ )	0.58	0.52	0.30
$Y_{S,PHA}^{exp}$ ( $\text{Cmole}\cdot\text{Cmole}^{-1}$ )	0.14	0.23	0.15
$Y_{ATP,Xcat}$ ( $\text{g}_{\text{Xcat}}\cdot\text{mol}_{\text{ATP}}^{-1}$ )	3.90	2.42	0.96

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

On constate que l'apport de glycérol en même temps que les acides gras altèrent significativement les rendements expérimentaux de carbone global, de production de PHA et énergétique de croissance par rapport à la culture A sur acide gras seuls (partie A des résultats). De plus, lors de la culture A, on a vu que la génération de NADPH était effectuée en partie par l'activité transhydrogénase de la souche. Au cours de la phase de croissance de la culture C, 80% du flux de NADPH est satisfait par l'activité de l'isocitrate déshydrogénase NADPH dépendante du cycle tricarboxylique. Lors de la phase de production, la génération de NADPH est réorganisée. L'enzyme malique prend une place plus importante (jusqu'à 40% du flux total de NADPH). On constate également que la voie des pentoses phosphates très peu empruntée en phase de croissance (9% du flux total de NADPH), devient majoritaire lorsque la production et la croissance sont couplées à partir d'acides gras et de glycérol (autour de 40% du flux total). Par conséquent, il semblerait que, dans ces conditions, le glycérol est principalement utilisé pour la génération de coenzymes réduits via la voie des pentoses phosphates et non comme source carbonée pour la synthèse de biomasse catalytique. La demande en carbone de l'anabolisme est donc satisfaite par, au moins une partie, des carbones acides gras n'ayant pas été convertis en PHA. Dans cette configuration, l'activité de transhydrogénase est importante pour convertir du NADPH en NADH nécessaire à l'anabolisme.

La composition monomérique du polymère final produit est présentée dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Composition monomérique des PHA finaux produits lors de la culture C

Nature du monomère	3-HHx	3-HO	3-HD	3-HDD	3-HTD
% (mole.mole <sup>-1</sup> )	5.1	20.3	35.0	22.5	17.1

Le profil monomérique obtenu présente une plus grande homogénéité dans les proportions respectives de chaque type d'acides 3-hydroxyalcanoïques que le profil obtenu sur glycérol seul (Tableau 23).

#### 1.3.4 Analyse des cinétiques de la culture C

La Figure 44 montre que la décroissance du taux de croissance se fait très linéairement durant la phase de production.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

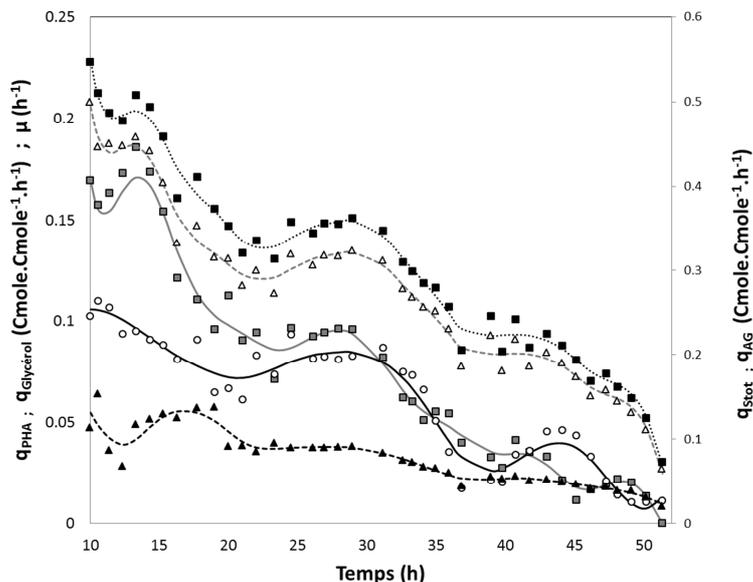


Figure 44 : Evolutions des vitesses spécifiques de consommation des substrats totaux (carrés noirs), du glycérol (triangles noirs), des acides gras (triangles blancs), de production de PHA (ronds vides) et de croissance (carrés gris) au cours de la phase de production de la culture C

On remarque toutefois qu'à l'arrêt des alimentations carbonées, à 37 heures, la vitesse spécifique de production de PHA,  $q_{\text{PHA}}$  diminue fortement, pour remonter aussitôt l'alimentation remis en marche. Les allures de tous ces paramètres évoluant tous de manière relativement monotone, des corrélations entre ces cinétiques peuvent être déterminées.

La Figure 45 permet de mettre en lumière une corrélation entre la demande anabolique caractérisée par le taux de croissance et les vitesses spécifiques de consommation du substrat et de production de PHA.

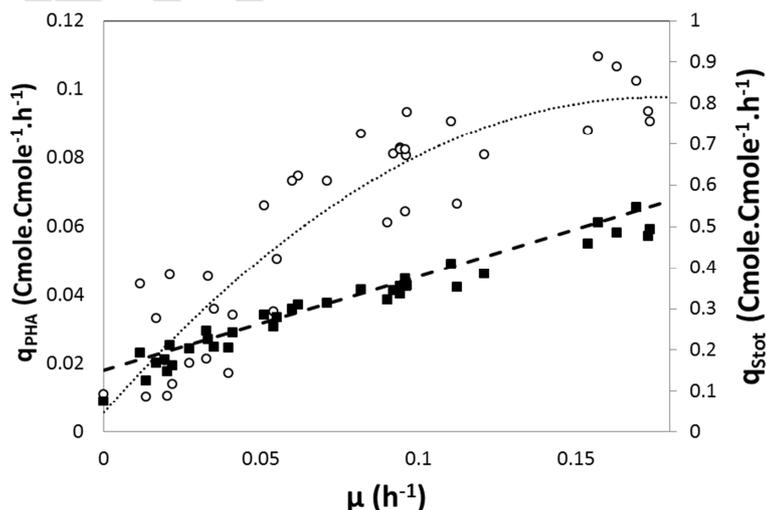


Figure 45 : Vitesses spécifiques de production de PHA (ronds vides) et de consommation des substrats totaux (carrés noirs) en fonction du taux d'accroissement expérimental de la biomasse catalytique ( $\mu$ ) lors de la culture C

## Résultats - Partie B : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

On constate qu'il existe une corrélation linéaire entre  $q_{Stot}$  et  $\mu$  lorsque le taux de croissance est compris entre 0 et  $0.18 \text{ h}^{-1}$ . Par conséquent, il semble que le taux de croissance imposé par le flux d'alimentation en azote impose la vitesse spécifique de consommation des substrats totaux. La relation entre  $q_{PHA}$  et  $\mu$  suit une loi polynomiale d'ordre 2 jusqu'à  $0.18 \text{ h}^{-1}$ . Les valeurs des vitesses spécifiques de production de PHA obtenues lors de cette culture C sont largement supérieures à celles obtenues sur glycérol seul (II.2.4) pour des taux de croissance comparables avec même une valeur maximal proche de  $0.1 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ .

A la vue du Tableau 25 présentant les rendements expérimentaux de cette culture, on constate que le rendement expérimental de production  $Y_{S,PHA}^{exp}$  représente toujours environ 50% du rendement expérimental de carbone global  $Y_{S,Xt}^{exp}$  quel que soit le taux de croissance résiduel. Pourtant à  $\mu$  inférieur à  $0.08 \text{ h}^{-1}$ , les rendements diminuent considérablement. Il est donc évident que le changement dans la distribution du carbone est orienté vers l'augmentation de la respiration du substrat. Ce phénomène signifie que la proportion d'énergie non finalisée dans la biosynthèse (biomasse catalytique et/ou produit) augmente significativement lorsque le taux de croissance devient inférieur à  $0.08 \text{ h}^{-1}$ . L'hypothèse avancée dans la partie A des résultats, concernant l'existence de réactions énergivores pour le stockage et la synthèse de PHA, pourrait également expliquer cette observation.

Le carbone ex-glycérol n'étant pas réorienté vers la synthèse de PHA, on peut estimer que les valeurs des vitesses spécifiques de production de PHA dans cette expérimentation sont représentatives des potentialités de production de PHA à partir d'acides gras à  $30^\circ\text{C}$ . Elles sont d'ailleurs proches des valeurs déterminées en chimostat sur acide gras en limitation azote par Huijberts et al. 1996 (Tableau 27).

Tableau 27 : Comparaison des vitesses spécifiques de production de PHA à partir d'acides gras à  $30^\circ\text{C}$  entre la culture C en mode Fed-batch et la culture en mode chimostat de Huijberts et al. 1996

$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$q_{PHA} \text{ (g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$	Références
0.05	0.04	Huijberts et al. 1996
0.1	0.06	
0.05	0.03	Culture C
0.1	0.06	

### I.4 Détermination de la corrélation entre la vitesse spécifique de production de PHA et le taux de croissance à partir d'acides gras à $37^\circ\text{C}$

La culture, présentée dans cette partie, sera nommée D dans le reste de ce manuscrit.

#### I.4.1 Objectif de la culture D

Les potentialités de production de PHA à partir de glycérol et/ou d'acides gras à  $30^\circ\text{C}$  ont été déterminées et présentée dans les parties précédentes. Une étude sur les effets d'une hausse de la température sur les performances de production de PHA à partir d'acides gras a été menée. La

## Résultats - Partie B : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

littérature concernant l'effet de la température sur les cinétiques de croissance et de production laisse supposer qu'à 37°C  $q_{PHA}^{max}$  est supérieur aux valeurs obtenues lors d'une culture à 30°C alors que le potentiel anabolique maximal de la souche est, pour sa part diminué (Fernández et al. 2005; Haba et al. 2007). A 42°C, le profil de PHA produit semble différent de celui obtenu à 30°C mais les cinétiques de production et le potentiel d'accumulation sont altérés par la température (Haba et al. 2007). Il est possible que le profil monomérique des PHA soit lié à la disponibilité des précurseurs 3-hydroxyacyl-CoA résultant, à la fois, des cinétiques d'assimilation du substrat, de la  $\beta$ -oxydation et de l'anabolisme. Par conséquent, en travaillant à une température différente, la possibilité d'accroître la solubilité (disponibilité) des acides gras et donc de modifier les différentes cinétiques pourrait permettre d'obtenir un profil monomérique de PHA autre. Dans le cas contraire, on peut penser que le profil résulte principalement de l'affinité, spécificité des PHA synthases pour les différents 3-hydroxyacyl-CoA. Afin de déterminer la température de travail la plus intéressante à appliquer à une culture en réacteur de 20L, des cultures en fioles Erlenmeyer sont réalisées.

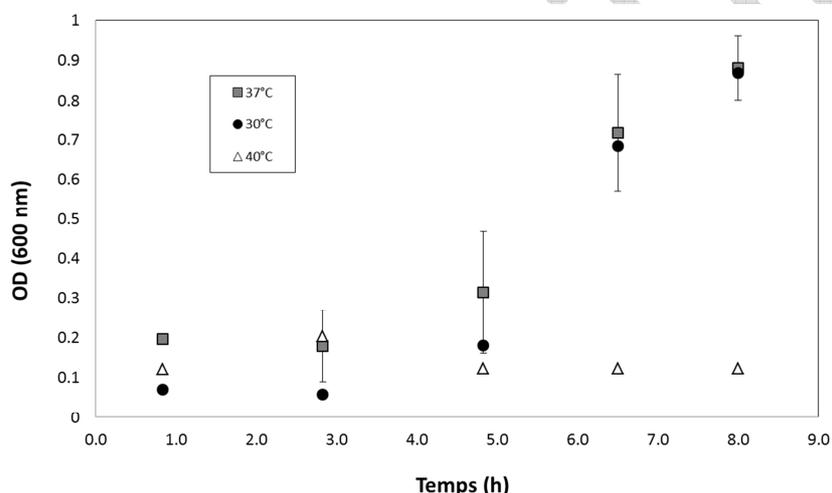


Figure 46 : Suivi de la croissance de *P. putida* KT2440 à 30°C, 37°C et 40°C sur milieu minéral + glucose

On observe sur la Figure 46 que la croissance est totalement inhibée par l'effet de la température à 40°C, alors qu'entre 30 et 37°C, il ne semble pas y avoir de différences majeures, du moins sur la vitesse de croissance cellulaire. La température de 37°C est donc retenue comme paramètre pour cette étude.

### I.4.2 Conduite de la culture D

La phase de croissance a duré 9.85 heures jusqu'à l'épuisement de l'azote présent dans le milieu initial. Le taux de croissance expérimental obtenu lors de cette phase est de  $0.14 \text{ h}^{-1}$ , limité par le débit d'alimentation en solution d'acide gras évoluant selon un mode exponentiel consigné pour maintenir un taux de croissance constant de  $0.15 \text{ h}^{-1}$ .

Une fois l'épuisement de l'élément azote dans le milieu intervenu, la stratégie présentée précédemment (I.1 de la partie B des résultats) peut être appliquée. La Figure 47 présente les évolutions

## Résultats - Partie B : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

expérimentales des alimentations en acide gras et en solution d'ammoniaque au cours de la culture, ainsi que la concentration en substrat résiduel.

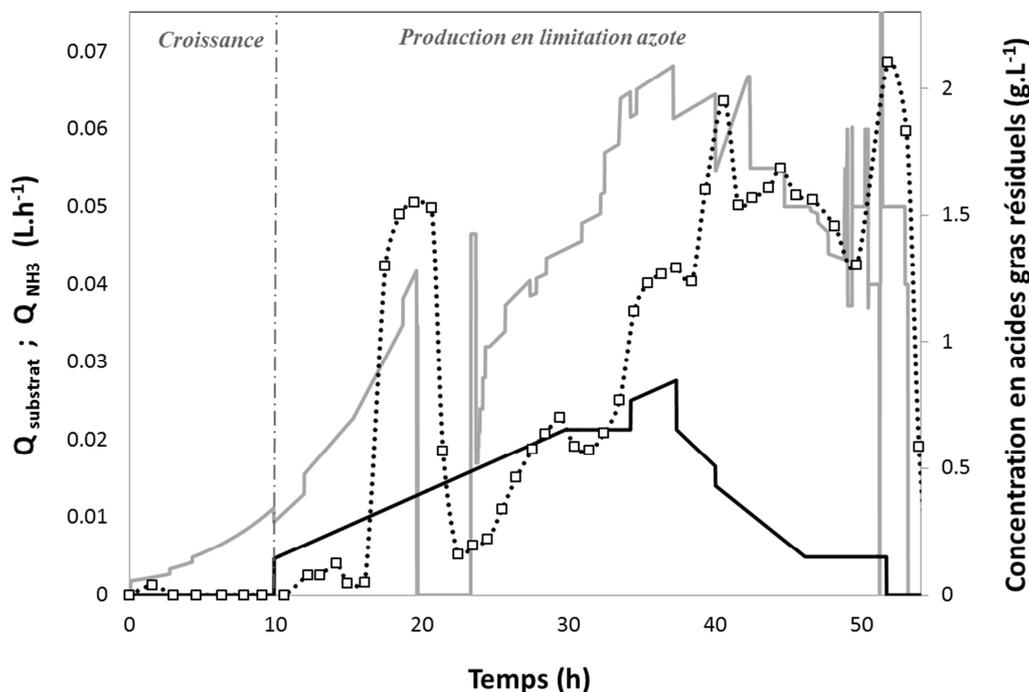


Figure 47 : Récapitulatif du pilotage de la culture en mode Fed-batch à 37°C à partir des débits  $Q_{NH_3}^{exp}$  (courbe noire) et  $Q_{AG}^{exp}$  et de l'évolution de la concentration en substrat résiduel dans le milieu réactionnel

Aux alentours de 20 h de culture, une accumulation de l'ordre de  $1.5 \text{ g.L}^{-1}$  d'acides gras est observée. L'alimentation en substrat carboné est alors arrêtée jusqu'à ce que cet excès soit consommé. Entre 35 et 39 heures de culture, un changement involontaire de la consigne d'alimentation en azote a eu lieu. Dès lors, l'évolution du taux de croissance diffèrera de l'allure désirée. Un léger excès de substrat est maintenu dans le milieu réactionnel tout au long de la culture afin de maximiser les vitesses spécifiques de production.

La Figure 48 montre l'évolution des concentrations en biomasse catalytique, PHA et du pourcentage d'accumulation des polymères dans les cellules lors de cette culture.

**Résultats - Partie B :** Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

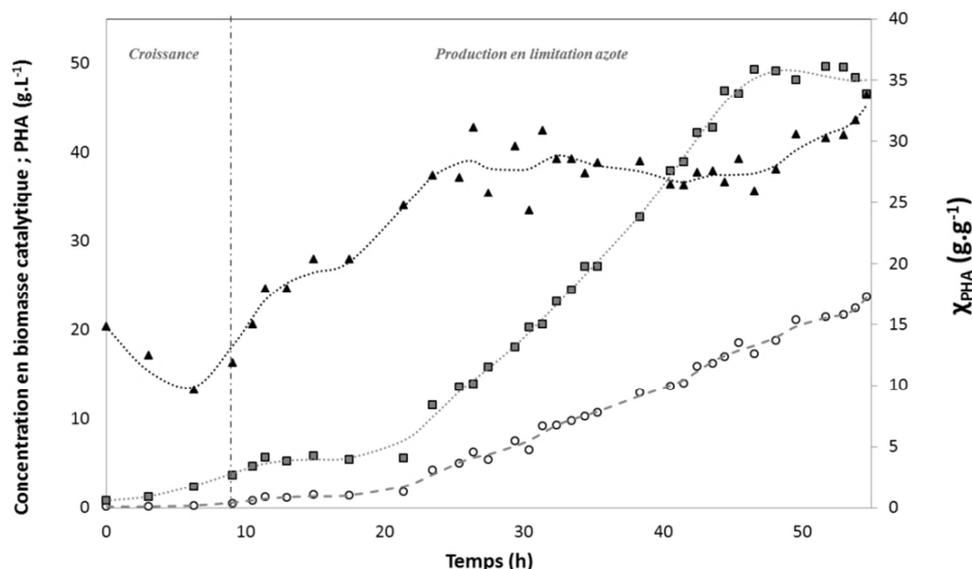


Figure 48 : Evolution des variables macroscopiques : concentration en biomasse catalytique (carrés gris), PHA (ronds vides) et le pourcentage d'accumulation (triangles noirs) au cours de la culture

Le pourcentage d'accumulation atteint dès 25 h un pourcentage moyen de 30 % (g.g<sup>-1</sup>) qui reste constant jusqu'à 47 heures. Il faut attendre l'atteinte du plateau à  $\mu^{theo} = 0.01$  h<sup>-1</sup> constant, à 47 heures de culture, pour voir ce pourcentage d'accumulation augmenter de 30 à 33% (g.g<sup>-1</sup>) pour une biomasse totale finale de 72 g.L<sup>-1</sup> à 55 heures. L'explication de ces tendances sera développée ultérieurement lors de l'analyse cinétique de cette culture en I.4.4 de cette partie.

### I.4.3 Analyse des performances finales de la culture D

Le rendement expérimental de conversion du substrat en biomasse catalytique  $Y_{S,X_{cat}}^{exp}$  sur la phase de croissance est de 0.51 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>, ce qui ne représente que 78% du rendement expérimental de conversion du substrat en biomasse catalytique obtenu sur acide gras, à 30°C (II.4.1 de la partie A). Le rendement expérimental de carbone global  $Y_{S,X_t}^{exp}$  diminue de 0.65 à 0.30 Cmole.Cmole<sup>-1</sup> au cours de la phase de production. Or, dans la partie A, On a démontré qu'en couplant croissance et production de PHA à partir d'acides gras, quand le taux de croissance résiduel est compris entre 0.04 et 0.01 h<sup>-1</sup>, ce rendement expérimental de carbone global peut atteindre 0.7 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>. On peut conclure qu'il existe un effet du taux de croissance sur le rendement expérimental de carbone global entre 0.15 et 0.01 h<sup>-1</sup>. La diminution générale de ce rendement pour la culture à 37°C peut signifier que le substrat est utilisé en plus grande proportion pour la maintenance, que la demande énergétique de croissance augmente (cycles futiles, turn-over, réparation, ...) ou qu'il y a une altération du rendement énergétique de la phosphorylation oxydative. L'ensemble des rendements sont résumés dans le Tableau 28.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

Tableau 28 : Récapitulatif des rendements expérimentaux obtenus lors de la culture D

$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$Y_{S,Xt}^{exp}$ ( $\text{Cmole.Cmole}^{-1}$ )	$Y_{S,PHA}^{exp}$ ( $\text{Cmole.Cmole}^{-1}$ )
0.15 (croissance)	0.65	0.14
0.15 – 0.04	0.43	0.15
0.04 – 0.00	0.30	0.22

La composition monomérique du polymère final produit est présentée dans le Tableau 29.

Tableau 29 : Composition monomérique des PHA finaux produits lors de la culture D

Nature du monomère	3-HHx	3-HO	3-HD	3-HDD	3-HTD
% ( $\text{mole.mole}^{-1}$ )	5.4	24.7	38.1	19.4	12.4

Le profil obtenu sur acide gras à 37°C est très proche de celui de la culture C.

#### I.4.4 Analyse des cinétiques de la culture D

Lors de la phase de croissance, durant laquelle le taux de croissance est maintenu constant à  $0.14 \text{ h}^{-1}$ , la vitesse spécifique de consommation des acides gras est égale à  $0.30 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Concernant la phase de production de PHA en limitation azote, la Figure 49 renseigne sur l'évolution des différentes vitesses spécifiques au cours du temps.

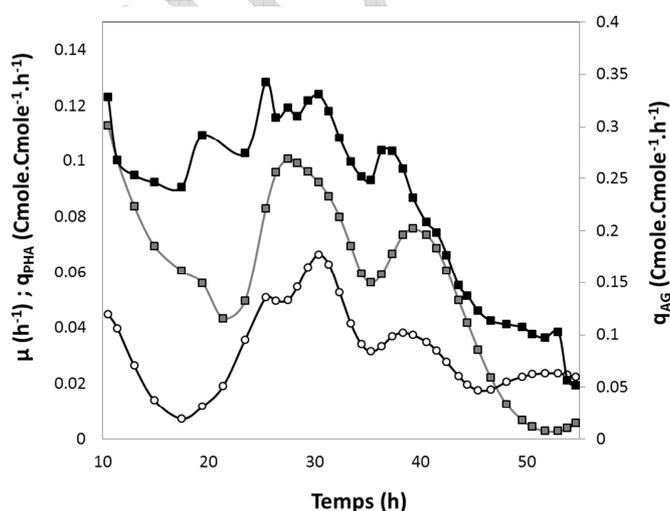


Figure 49 : Evolutions des vitesses spécifiques de consommation du substrat (carrés noirs), de production (ronds vides) et de croissance (carrés gris) au cours de la culture D

Afin de visualiser un éventuel effet de la température sur les vitesses spécifiques de consommation du substrat et de production de PHA de la souche, on compare, sur la Figure 50, les relations de ces vitesses par rapport au taux de croissance résiduel entre la culture à 30°C présentée dans la partie A des résultats et la culture à 37°C développée ici.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

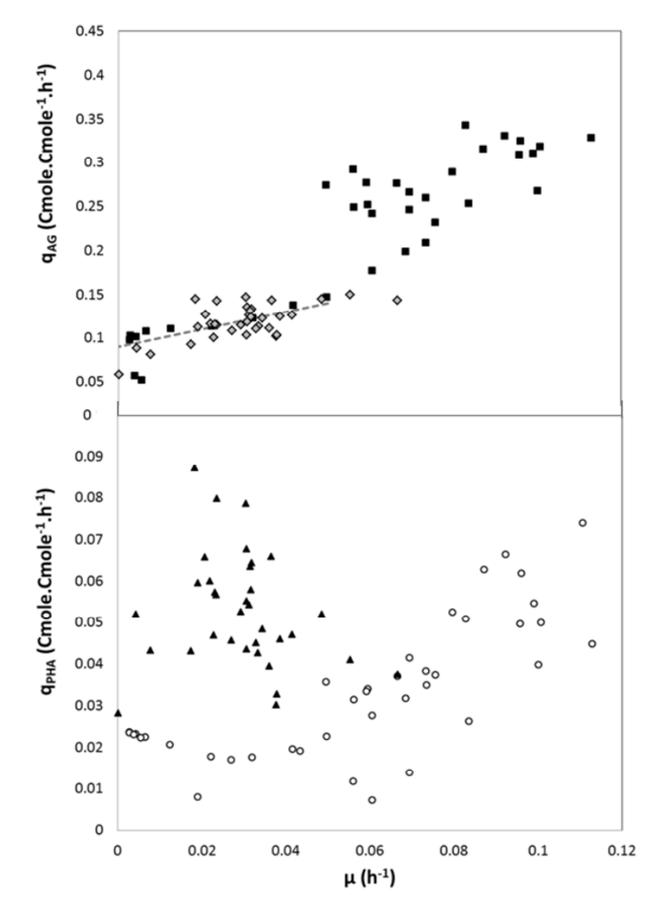


Figure 50 : Evaluation de l'effet de la température sur les cinétiques microbiennes. En haut, les vitesses spécifiques de consommation des acides gras à 30°C (losanges gris) et à 37°C (carrés noirs) en fonction du taux de croissance. En bas, les vitesses spécifiques de production de PHA à 30°C (triangles noirs) et à 37°C (ronds vides)

L'augmentation de la température a un effet négatif net sur les vitesses spécifiques de production de PHA, contrairement à ce que reportait Haba et al. 2007. Par ailleurs, aucun changement n'intervient au niveau des valeurs de vitesses spécifiques d'assimilation du substrat. Or, la hausse de la température du réacteur occasionne obligatoirement une évolution du système qu'est le milieu réactionnel, puisqu'elle induit un accroissement de la solubilité et donc de la concentration saturante d'acides gras dissous dans le milieu ( $AG^*$ ).

A partir de l'équation de bilan matière de la forme dissoute des acides gras dans le milieu (équation 56), à une température donnée, on peut établir la relation de couplage entre les phénomènes de transfert et biologiques dans le système.

$$\left(\frac{dAG^d}{dt}\right) = \mathcal{D}.S.(AG^* - AG^d) - q_{AG} \cdot \frac{AG^d}{k_d.AG^d + AG^d} \cdot X_{cat} \quad \text{Équation 56}$$

Avec,  $\left(\frac{dAG^d}{dt}\right)$  : la variation de la concentration d'acide gras dissous ( $\text{Cmole.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

- $D.S$  : le coefficient de transfert des acides gras dans l'eau prenant en compte la surface d'échange de ce transfert ( $h^{-1}$ )
- $AG^*$  : la concentration saturante d'acides gras dissous ( $Cmole.L^{-1}$ )
- $AG^d$  : la concentration réelle d'acides gras dissous ( $Cmole.L^{-1}$ )
- $q_{AG}$  : la vitesse spécifique de consommation des acides gras ( $Cmole.Cmole^{-1}.h^{-1}$ )
- $X_{cat}$  : la concentration en biomasse catalytique ( $Cmole.L^{-1}$ )
- $k_d$  : un coefficient qualifiant la vitesse de consommation du substrat selon une cinétique de Monod

On a donc deux termes d'ordre 1 que l'on peut donc substituer par deux paramètres évoluant en fonction du temps, l'un caractérisant les phénomènes de transfert et l'autre les phénomènes biologiques, comme suit :

$$\left(\frac{dAG^d}{dt}\right) = \mathcal{J}_{transfert}(t) + \mathcal{J}_{biologique}(t) \quad \text{Équation 57}$$

Ce phénomène de couplage est schématisé dans la Figure 51 montrant que, dans la phase aqueuse, les acides gras se retrouvent sous deux formes, à savoir sous forme dissoute ( $AG^d$ ) et sous forme liquide ( $AG^L$ ) du fait de la très faible solubilité des acides gras dans l'eau. Le substrat est disponible pour la biomasse sous sa forme dissoute et à la surface des gouttelettes d'acides gras de la phase liquide (Dunn, 1968; Humphrey & Erickson, 1972). La vitesse d'assimilation du substrat est donc limitée soit par cette disponibilité (phénomènes de transfert), soit par les phénomènes biologiques liés à l'activité de la cellule.

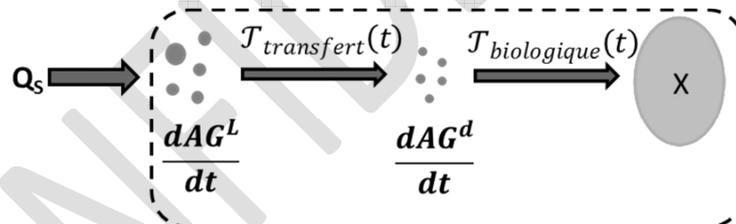


Figure 51 : Schéma représentant le bilan sur le substrat acide gras dans le système du milieu réactionnel, avec  $Q_s$  le débit de substrat entrant,  $\tau_{transfert}(t)$  la constante temps dépendante caractérisant les phénomènes de transfert,  $\tau_{biologiques}(t)$  la constante temps dépendante caractérisant les phénomènes biologiques,  $\frac{dAG^L}{dt}$  la variation de la concentration en acides gras dans la phase liquide et  $\frac{dAG^d}{dt}$  la variation de la concentration en acides gras dissous

- Lorsque  $AG^d$  est très petit :  $\left(\frac{dAG^d}{dt}\right) \approx \mathcal{J}_{transfert}(t)$ , donc la vitesse de consommation des acides gras dissous est dépendant des phénomènes de transfert du substrat dans le milieu.
- Lorsque  $AG^d$  est très grand :  $\left(\frac{dAG^d}{dt}\right) \approx \mathcal{J}_{biologique}(t)$ , donc la vitesse de consommation des acides gras dissous est dépendante des phénomènes biologiques.

Ne connaissant pas la valeur de  $AG^d$ , ni son évolution au cours du temps  $\left(\frac{dAG^d}{dt}\right)$ , plusieurs cas peuvent se présenter comme décrit par la Figure 52 :

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

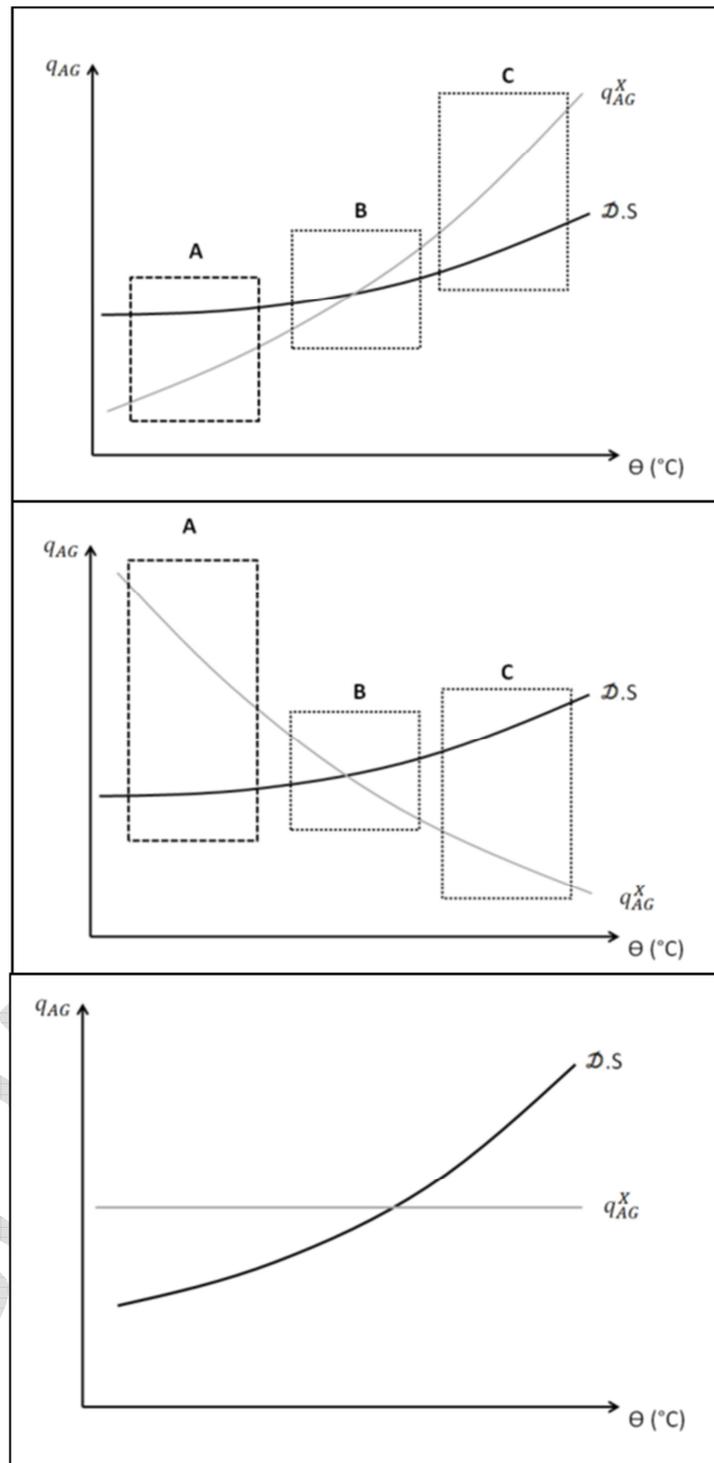


Figure 52 : Représentation des possibles évolutions relatives des phénomènes biologiques et de transfert en fonction de la température. En haut : cas d'une activation par la température de l'activité biologique. Au milieu : cas d'une altération par la température de l'activité biologique. En bas : cas où l'augmentation de la température n'a pas d'effet sur l'activité biologique. La courbe grise représente l'évolution de la vitesse spécifique maximale de consommation des acides gras de la souche ( $q_{AG}^X$ ) et la noire, la vitesse de transfert des acides gras de la phase liquide à la phase dissoute ( $q_{AG}^D$ )

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

Cas d'une activation de l'activité biologique par augmentation de la température (schéma du haut) :

- Dans le cas où les températures de 30 et 37°C sont dans la zone A,  $\mathcal{J}_{transfert}(t) \gg \mathcal{J}_{biologique}(t)$  donc la vitesse de consommation du substrat par la biomasse est limitée par les phénomènes biologiques.
- Dans le cas où les températures de 30 et 37°C sont dans la zone B,  $\mathcal{J}_{transfert}(t) \gg \mathcal{J}_{biologique}(t)$  jusqu'à une certaine température comprise entre 30 et 37°C, puis  $\mathcal{J}_{transfert}(t) \ll \mathcal{J}_{biologique}(t)$ .
- Dans le cas où les températures de 30 et 37°C sont dans la zone C,  $\mathcal{J}_{transfert}(t) \ll \mathcal{J}_{biologique}(t)$  donc la vitesse de consommation du substrat par la biomasse est limitée par les phénomènes de transfert.

Dans ces trois cas,  $[q_{AG}]^{30^\circ\text{C}} < [q_{AG}]^{37^\circ\text{C}}$

Cas d'une altération de l'activité biologique par augmentation de la température (schéma du milieu) :

- Dans le cas où les températures de 30 et 37°C sont dans la zone A,  $\mathcal{J}_{transfert}(t) \ll \mathcal{J}_{biologique}(t)$  donc la vitesse de consommation du substrat par la biomasse est limitée par les phénomènes de transfert et  $[q_{AG}]^{30^\circ\text{C}} < [q_{AG}]^{37^\circ\text{C}}$ .
- Dans le cas où les températures de 30 et 37°C sont dans la zone B,  $\mathcal{J}_{transfert}(t) \ll \mathcal{J}_{biologique}(t)$  jusqu'à une certaine température comprise entre 30 et 37°C, puis  $\mathcal{J}_{transfert}(t) \gg \mathcal{J}_{biologique}(t)$ .
- Dans le cas où les températures de 30 et 37°C sont dans la zone C,  $\mathcal{J}_{transfert}(t) \gg \mathcal{J}_{biologique}(t)$  donc la vitesse de consommation du substrat par la biomasse est limitée par les phénomènes biologiques et  $[q_{AG}]^{30^\circ\text{C}} > [q_{AG}]^{37^\circ\text{C}}$ .

Dans le cas du schéma du bas de la Figure 52,  $\mathcal{J}_{transfert}(t) \gg \mathcal{J}_{biologique}(t)$ , la vitesse de consommation du substrat par la biomasse est limitée par les phénomènes biologiques et  $[q_{AG}]^{30^\circ\text{C}} = [q_{AG}]^{37^\circ\text{C}}$ .

Dans notre comparaison des vitesses spécifiques en fonction de la température de culture de la Figure 50, on a vu que  $[q_{AG}]^{30^\circ\text{C}} = [q_{AG}]^{37^\circ\text{C}}$ , pour des taux de croissance entre 0.01 et 0.04 h<sup>-1</sup>, donc on peut conclure que nous sommes soit dans le cas du schéma du bas, soit dans la zone B du schéma du milieu. Par conséquent, on peut affirmer que les vitesses spécifiques maximales de consommation des acides gras obtenues lors de la culture à 37°C ne sont dépendantes que des phénomènes biologiques. Même si nous ne pouvons pas l'affirmer, il semble probable que les vitesses spécifiques maximales de consommation des acides gras obtenues lors des cultures à 30°C soient également dépendantes des phénomènes biologiques dans les conditions de nos expérimentations. En effet, si l'on se réfère à la Figure 45 (I.3.4 de cette partie), on a vu que la vitesse spécifique de consommation du substrat augmentait linéairement avec la demande anabolique jusqu'à un taux de croissance de 0.15 h<sup>-1</sup>.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

Le fait que  $[q_{PHA}]^{30^{\circ}C} > [q_{PHA}]^{37^{\circ}C}$  provient uniquement d'une altération des activités enzymatiques impliquées dans la synthèse des PHA. Les activités des transporteurs membranaires et enzymes impliqués dans la réaction d'intégration des acides gras au sein du cytoplasme ne sont donc pas affectées par la température de 37°C.

Du fait que les cinétiques sont uniquement dépendantes des phénomènes biologiques, la Figure 53 permet de déterminer les corrélations entre la demande anabolique caractérisée par le taux de croissance et les vitesses spécifiques de consommation du substrat et de production de PHA.

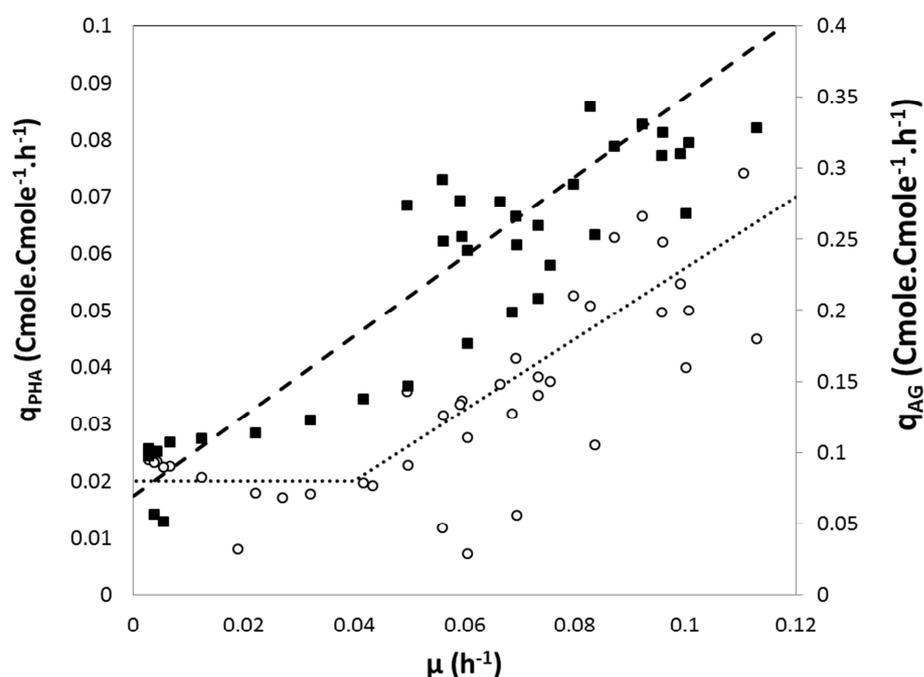


Figure 53 : Vitesses spécifiques de production de PHA (ronds vides) et de consommation du substrat (carrés noirs) en fonction du taux d'accroissement de la biomasse catalytique ( $\mu$ ) pour la culture D

On va considérer ici que l'évolution de la vitesse spécifique d'assimilation des acides gras évolue linéairement avec le taux de croissance lorsque celui-ci est compris entre 0 et 0.12 h<sup>-1</sup>. L'évolution de la vitesse spécifique de production de PHA en fonction de la demande anabolique montre deux tendances en fonction que le taux de croissance soit supérieur ou inférieur à 0.04 h<sup>-1</sup>. Pour des taux de croissance inférieurs à cette valeur,  $q_{PHA}$  devient indépendant du taux de croissance et reste constante à une valeur de 0.02 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> c'est pourquoi le rendement de production de PHA augmente pour cet intervalle de taux de croissance (cf. Tableau 28). Ce changement franc s'explique par une modification de la distribution du carbone intracellulaire.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

## II. Discussion

La souche *P. putida* KT2440 a la capacité d'assimiler un grand nombre de substrats différents dont font partis les acides gras et le glycérol, coproduits provenant de l'hydrolyse de graisses animales. L'étude des performances cinétiques de cette souche à partir de ces substrats pour la production optimale de polyhydroxyalcanoates à moyennes chaînes latérales est donc importante pour établir les points de fonctionnement idéaux d'un procédé de production en mode Fed-batch à partir de ces sources carbonées. Il est désormais intéressant de comparer les résultats des trois cultures présentées précédemment afin d'évaluer si un substrat est plus intéressant qu'un autre ou si leur association peut permettre une amélioration des performances de production.

La comparaison des vitesses spécifiques de production des PHA en fonction des taux de croissances pour les substrats et mélanges de substrats étudiés va nous permettre d'évaluer les éventuelles différences liées aux voies métaboliques impliquées. La Figure 54 présente l'évolution des courbes théoriques caractérisant  $q_{PHA}$  en fonction du taux de croissance résiduel que l'on a défini précédemment.

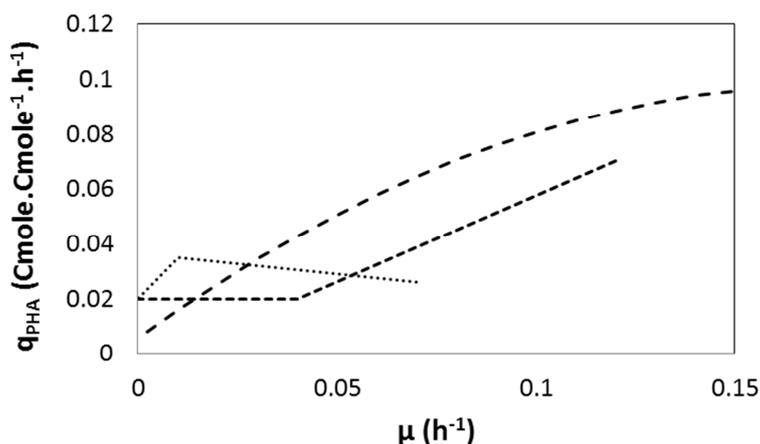


Figure 54 : Vitesses spécifiques théoriques de production de PHA en fonction du taux d'accroissement de la biomasse catalytique ( $\mu$ ) lors des cultures B (points noirs), C (tirets gris) et D (tirets noirs).

Les valeurs de  $q_{PHA}$  pour la culture à 30°C sur le mélange glycérol-acide gras sont clairement les plus élevées pour les taux de croissance supérieurs à 0.02  $h^{-1}$ . Elles atteignent jusqu'à 0.1 Cmole.Cmole $^{-1}$ .h $^{-1}$  lorsque  $\mu$  est voisin de 0.15  $h^{-1}$ . En dessous de  $\mu = 0.02$   $h^{-1}$ , ce sont les valeurs de vitesses spécifiques de production de PHA à partir de glycérol seul qui sont légèrement plus performantes. Les vitesses spécifiques de production de PHA à 37°C sont inférieures à celles obtenues lors des cultures à 30°C sur acide gras et glycérol. On a donc conclu que certaines activités enzymatiques impliquées dans la voie de synthèse des PHA ( $\beta$ -oxydation ou activité PHA synthase) à partir d'acides gras sont altérées par la température de 37°C.

Si l'on considère que le potentiel anabolique maximal de *P. putida* KT2440 sur glycérol est égal à 0.07  $h^{-1}$ ,  $q_{PHA}^{max}$  sur glycérol, égal à 0.036 Cmole.Cmole $^{-1}$ .h $^{-1}$ , est obtenu à 14% du potentiel anabolique maximal de la souche sur ce substrat car atteint pour un  $\mu$  proche de 0.01  $h^{-1}$ . Concernant la

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

culture C, si le potentiel anabolique maximal sur ce mélange de substrat correspond à la valeur de  $\mu_{max}$  de *P. putida* KT2440 sur acide gras à 30°C égale à 0.37 h<sup>-1</sup> (Kellerhals et al. 2000),  $q_{PHA}^{max}$  est atteint pour des taux de croissance élevés, supérieur à 0.1 h<sup>-1</sup>, ce qui correspond à environ 25-30 % du potentiel anabolique maximal.

Huijberts et al. 1996 avait déterminé la corrélation  $q_{PHA} = f(D)$  sur acide oléique en culture continue en contrôlant le rapport C/N de la souche *P. putida* KT2442 pour des taux de dilution compris entre 0.05 et 0.3 h<sup>-1</sup>. La Figure 55, qui compare ses données à celles de la culture C, montre que nos valeurs concordent et suivent la même tendance. Cela valide donc que notre stratégie de culture en mode Fed-batch de type décélérostat nous permet d'atteindre des valeurs cinétiques proches des valeurs optimales atteintes en régime permanent en chémostat.

Plus tard, Durner et al. (2000) a effectué une étude similaire avec l'acide octanoïque comme substrat de sa culture chémostat de *Pseudomonas oleovorans*. Cet acide dont la chaîne carbonée est beaucoup plus courte que celles des acides gras étudiés dans nos travaux est également catabolisé à travers la  $\beta$ -oxydation afin de satisfaire la demande anabolique et la production de PHA définies dans cet article par un ratio C/N. Les valeurs de  $q_{PHA}$  associées aux taux de dilution sont également présentés sur la Figure 55.

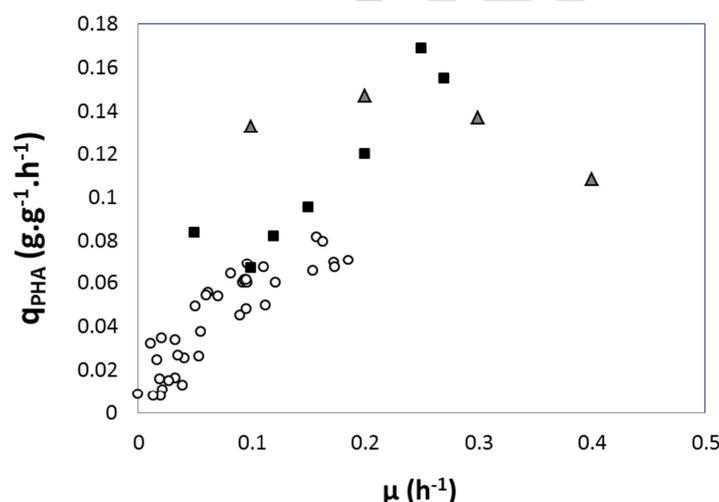


Figure 55 : Vitesses spécifiques théoriques de production de PHA en fonction du taux d'accroissement de la biomasse catalytique ( $\mu$ ) lors de la culture C (ronds vides), d'après les données de Durner et al. 2000 sur octanoate (triangles gris) et les données de Huijberts et al. 1996 sur acide oléique (carrés noirs)

On constate que les valeurs de  $q_{PHA}$  à partir d'acide octanoïque sont près de deux fois supérieures aux nôtres. Cela pourrait être due au fait que ce substrat à 8 carbones puisse directement être pris en charge par la PHA synthase. Les valeurs de vitesses spécifiques de production de PHA de Durner et al. (2000) correspondraient donc globalement à l'activité cinétique de la PHA synthase. A partir d'acide gras, les valeurs de  $q_{PHA}$  caractérisent l'ensemble des activités enzymatiques des voies de la  $\beta$ -oxydation et de la polymérisation des PHA. Donc la différence de vitesses spécifiques de production de PHA entre celles de Durner et al. (2000) et les nôtres pourrait s'expliquer par le fait que l'activité enzymatique limitante de l'ensemble de ces voies se trouve au sein de la  $\beta$ -oxydation.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

L'évolution des différents rendements au cours des cultures peut également apporter des informations sur la répartition du carbone et de l'énergie en fonction des substrats utilisés. La comparaison de ces rendements (Tableau 30) montre qu'en phase de croissance, le rendement expérimental de croissance sur acide gras à 37°C ( $Y_{S,Xcat}^{exp} = 0.51 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ ) est supérieur à ceux sur le glycérol ( $Y_{S,Xcat}^{exp} = 0.44 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ ) ou le mélange ( $Y_{S,Xcat}^{exp} = 0.44 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ ). Ceci montre bien que c'est l'ajout de glycérol dans l'alimentation carbonée qui altère le rendement expérimental de croissance.

Tableau 30 : Récapitulatif des rendements expérimentaux obtenus lors des trois cultures

Culture B			Culture C			Culture D		
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$Y_{S,Xt}^{exp}$	$Y_{S,PHA}^{exp}$	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$Y_{S,Xt}^{exp}$	$Y_{S,PHA}^{exp}$	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$Y_{S,Xt}^{exp}$	$Y_{S,PHA}^{exp}$
0.07 (croissance)	0.50	0.06	0.15 (croissance)	0.58	0.14	0.15 (croissance)	0.65	0.14
0.07 – 0.03	0.36	0.11	0.15-0.08	0.52	0.23	0.15 – 0.03	0.43	0.15
0.03 – 0.00	0.31	0.21	0.08-0.00	0.30	0.15	0.03 – 0.00	0.30	0.22

Pour toutes les cultures, les rendements expérimentaux en carbone global diminuent lors du passage en phase de production. Pour la culture D, cela résulte d'un effet négatif de la température sur les performances de la cellule (I.4.4 de cette partie). Concernant les deux autres cultures, c'est la présence de glycérol comme substrat carboné qui explique cette diminution. La production de PHA sur glycérol seul nécessite une disponibilité en coenzymes réduits très importante. Si la production de PHA à partir de la  $\beta$ -oxydation génère des coenzymes réduits à chaque cycle, la voie de biosynthèse des acides gras, empruntée pour la synthèse de PHA à partir de glycérol, en consomme. Par extension, la demande en ATP nécessaire à la synthèse de NADPH<sub>2</sub>, via les activités des transhydrogénases, est importante et entraîne une diminution des rendements carbone globaux. Plus la demande anabolique diminue ( $\mu$  diminue), plus les rendements carbone globaux diminuent. On a détaillé dans la partie A des résultats, que cette tendance pourrait s'expliquer par une augmentation de la part d'ATP dissipé lorsque l'accumulation de produit est forte. On remarque pour ces trois cultures, que plus le taux de croissance diminue, plus le rendement carbone global diminue, mais plus la part de ce rendement lié à la production seule (rapport  $Y_{S,PHA}^{exp}/Y_{S,Xt}^{exp}$ ) augmente. Ce phénomène peut s'expliquer par une demande moindre en carbone et énergie pour la synthèse de biomasse catalytique et donc une réorientation, au moins partielle, de ces flux de carbones et d'énergie vers la synthèse et le stockage de PHA.

Les performances cinétiques et de rendements de la culture à 30°C sur un mélange acide gras-glycérol étant les meilleures, il semble exister une synergie catabolique. Nous allons désormais nous concentrer sur les résultats de la culture C pour la suite de cette discussion.

On nomme taux de croissance apparent ( $\mu_{app}$ ), la vitesse de production de la biomasse totale ( $X_{cat} + PHA$ ) au cours de la culture. Ramener la vitesse spécifique de production de PHA au taux de croissance apparent, renseigne sur la répartition du carbone entrant dans la cellule entre production et synthèse de biomasse catalytique (équation 59).

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

$$\frac{q_{PHA}}{\mu_{app}} = \frac{q_{PHA}}{q_{PHA} + \mu} \quad \text{Équation 58}$$

Ce rapport correspond, lors d'une culture en mode Fed-batch au taux d'accumulation instantané en PHA. Il correspond au taux d'accumulation qui serait atteint, si le ratio des vitesses spécifiques demeure constant, au terme de la culture. Il peut également être écrit comme suit :

$$\chi_{PHA} = \frac{PHA}{PHA + X_{cat}} = \frac{\int_{t=0}^t r_{PHA} \cdot dt}{\int_{t=0}^t r_{PHA} \cdot dt + X_{cat}} \quad \text{Équation 59}$$

Avec  $r_{PHA}$  : la vitesse de production de PHA (en Cmole.h<sup>-1</sup>)

$t = 0$  : le temps auquel la phase de production à  $\mu$  résiduel constant débute (en h)

$X_{cat}$  : la quantité de biomasse catalytique produite (en Cmole)

En considérant des cultures Fed-batch au cours desquelles les vitesses spécifiques de réaction seraient maîtrisées et maintenues constantes par une alimentation en azote exponentielle, cette fraction  $\chi_{PHA}$  évolue au cours de la culture selon l'équation 61 suivante :

$$\chi_{PHA} = \frac{q_{PHA} \int_{t=0}^t X_{cat}(t) \cdot dt}{q_{PHA} \int_{t=0}^t X_{cat}(t) \cdot dt + X_{cat}(t)} = \frac{q_{PHA}}{q_{PHA} + \frac{X_{cat}(t)}{\int_{t=0}^t X_{cat}(t) \cdot dt}} \quad \text{Équation 60}$$

Or,  $X_{cat}(t) = X_{cat}(t=0) \cdot e^{\mu \cdot t}$  donc,  $\int_{t=0}^t X_{cat}(t) \cdot dt = \frac{X_{cat}(t=0)}{\mu} \cdot (e^{\mu \cdot t} - 1)$

$$\text{D'où, } \chi_{PHA} = \frac{q_{PHA}}{q_{PHA} + \frac{\mu}{(1 - e^{-\mu \cdot t})}} \quad \text{Équation 61}$$

A  $t=0$ , cette fraction est théoriquement nulle.  $\chi_{PHA}$  évolue ensuite asymptotiquement vers une valeur limite égale à :

$$\chi_{PHA}^{lim} = \frac{q_{PHA}}{q_{PHA} + \mu} = \frac{1}{1 + \frac{\mu}{q_{PHA}}} \quad \text{Équation 62}$$

Cette valeur limite sera d'autant plus forte que l'écart entre  $q_{PHA}$  et  $\mu$  sera élevé.

La Figure 56 reprend la relation polynomiale d'ordre 2  $q_{PHA} = f(\mu)$  déterminée précédemment et montre l'évolution de la valeur limite  $\chi_{PHA}^{lim}$  en fonction du taux de croissance résiduel. Ces valeurs limites sont purement théoriques car elles ne seront atteintes qu'au bout d'un temps de culture infiniment long en régime permanent.

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

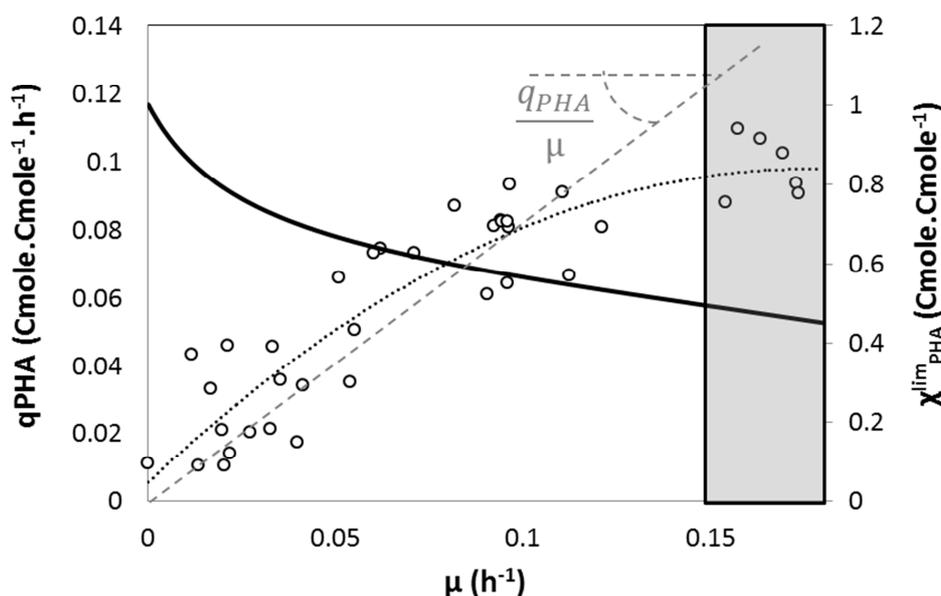


Figure 56 : Evolution des vitesses spécifiques expérimentales (ronds vides) et théoriques (pointillés noirs) de production de PHA et du pourcentage d'accumulation limite de PHA (courbe noire) en fonction du taux de croissance résiduel pour la culture C

On constate que plus le taux de croissance est faible, plus la fraction d'accumulation limite de PHA est élevée. *A contrario*, plus les taux de croissance ont des valeurs élevées (entre 0.1 et 0.18 h<sup>-1</sup>), plus le taux d'accumulation limite de PHA est faible. On optimise donc soit l'accumulation intracellulaire des PHA, soit la vitesse spécifique de production. Un compromis est donc à trouver afin d'optimiser le procédé de production à partir d'acides gras ou d'acides gras-glycérol dans les proportions de la culture C. En effet, soit l'accumulation de produit dans la cellule est privilégiée, dans ce cas, la culture devra être effectuée avec une croissance résiduelle faible, soit la vitesse spécifique de production et le rendement carbone global (cf. Tableau 30) sont optimisés et dans ce cas le taux de croissance de travail devra se situer autour de 0.15 h<sup>-1</sup> (zone grise sur la Figure 56).

Par exemple, si l'on conserve l'idée de réaliser la culture à partir d'acides gras en deux phases : On pourrait effectuer une première phase de production de PHA à taux de croissance élevé (autour de 0,15 h<sup>-1</sup>) pour obtenir rapidement une forte quantité de biomasse catalytique tout en apportant suffisamment de substrat pour atteindre les vitesses spécifiques maximales de production de PHA de l'ordre de 0.1 Cmole.Cmole<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. On optimiserait le rendement de carbone global durant cette phase. Puis, une seconde à des taux d'accroissement cellulaires plus faibles maintenus constants (entre 0,05 et 0,01 h<sup>-1</sup>) pourrait permettre d'optimiser l'accumulation intracellulaire de produit en tendant vers une valeur limite d'accumulation de PHA élevée (~60% g.g<sup>-1</sup> d'accumulation). Il n'est toutefois pas certain que maintenir un taux de croissance résiduel constant durant une très longue durée conserve constante la vitesse spécifique maximale de production de PHA associée. En effet, Heinzle & Lafferty, 1980 pense que si un taux de croissance résiduel est maintenu constant très longtemps, de sorte qu'un pourcentage d'accumulation critique puisse être atteint, la vitesse spécifique de production

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

de PHA va diminuer, comme si au-delà d'un certain titre de PHA accumulé, le produit pouvait provoquer une régulation négative sur sa voie de production.

A partir de glycérol, il ne semble pas y avoir besoin de trouver ce type de compromis entre vitesse spécifique de production de PHA et pourcentage d'accumulation limite, puisque leurs valeurs optimales sont obtenues pour des taux de croissance résiduels très faibles (autour de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ ). Ce phénomène pourrait être dû au fait qu'à partir de ce substrat la croissance et la production de PHA n'empruntent pas la même voie métabolique et sont donc découplées.

Pour conclure cette comparaison entre ces trois cultures, le Tableau 31 résume les profils monomériques au point final des polymères obtenus. Si les compositions des PHA des cultures C et D sont relativement similaires, elles diffèrent de la composition du polymère de la culture menée à partir de glycérol seul. Existe-t-il un lien entre le profil monomériques des PHA et le substrat carboné utilisé ? Le rapport  $q_{PHA} / \mu$  peut-il influencer sur ce profil ? Ces points seront détaillés dans la partie C des résultats.

Tableau 31 : Récapitulatif des profils monomériques des polymères obtenus dans les cultures B, C et D

(mole.mole <sup>-1</sup> )	Culture B	Culture C	Culture D
% (3-HHx)	2.9	5.1	5.4
% (3-HO)	18.2	20.3	24.7
% (3-HD)	62.1	35.0	38.1
% (3-HDD)	16.3	22.5	19.4
% (3-HTD)	0.5	17.1	12.4

**Résultats - Partie B** : Etudes des potentialités de production de PHA par *P. putida* KT2440 à partir de glycérol et/ou d'acides gras

### **III. Synthèse des résultats**

- La culture B a montré qu'il est nécessaire d'apporter un co-substrat carboné pour amorcer l'assimilation du glycérol permettant ainsi la croissance et la production de PHA.
- Il a été démontré que les acides gras et le glycérol peuvent être co-consommés dans la proportion stœchiométrique testée et engendre une synergie catabolique optimisant les performances de production de PHA
- La culture C sur acides gras à 37°C a permis d'établir que les cinétiques d'assimilation des acides gras par la souche ne sont pas limitées par la diffusion du substrat lors des cultures à 37°C. La relation linéaire existant entre  $q_{AG}$  et  $\mu$  dans les conditions testées à 30°C semble indiquer que la vitesse spécifique d'assimilation du substrat est également limitée par les phénomènes biologiques à cette température.
- Cette partie a permis de déterminer les corrélations entre  $q_{PHA}$  et  $\mu$  pour les cultures sur glycérol, glycérol-acide gras à 30°C et acides gras à 37°C
- La demande énergétique liée à la production de PHA à partir de glycérol plus importante qu'à partir d'acides gras semble être responsable des performances cinétiques et des rendements moins élevés sur ce substrat
- Le point de fonctionnement optimal d'un procédé de production à partir de glycérol se situe à des taux de croissance résiduel autour de  $0.02 \text{ h}^{-1}$
- A partir d'acide gras, il est nécessaire de trouver un compromis pour optimiser le procédé de production de PHA, entre vitesse spécifique de production de PHA-rendement de carbone global et accumulation intracellulaire du produit
- Il semble exister un impact de la nature du substrat sur le profil monomérique des PHA finaux

## C- Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

### Introduction

Les PHA produits à partir de la souche *P. putida* KT2440 sont composés de différents types de monomères dont la longueur de chaîne latérale comporte de 6 à 14 carbones. Ce panel de monomères est obtenu quel que soit le substrat et, donc, les voies métaboliques empruntées pour les synthétiser. Toutefois, les proportions relatives de chacun de ces monomères ne semblent pas figées. En effet, comme présenté dans la partie B-II, le profil monomérique diffère entre les différentes expérimentations. Il semble donc qu'il soit possible de moduler le profil des PHA synthétisés. Pour cela, il est nécessaire d'identifier les paramètres pouvant influencer sur la synthèse de tel ou tel profil.

De plus, après extraction et purification des PHA de l'ensemble des cultures effectuées au cours de ces travaux de thèse, des aspects très différents sont obtenus. Les polymères produits via la voie de biosynthèse des acides gras forment un film élastique, alors que ceux produits à partir d'acides gras, via la  $\beta$ -oxydation, ont l'aspect d'une pâte très collante et relativement visqueuse. Quelles différences dans les propriétés de ces bio-polymères pourraient être responsables d'un tel résultat ? Quels phénomènes biologiques sont responsables de cette différence ?

Dans ce chapitre, nous tenterons de répondre à l'ensemble de ces questions à travers deux grands axes : l'un concernant les paramètres influant sur le profil monomérique des PHA finaux et l'autre concernant les différences dans les caractéristiques plasturgiques de ces polymères et leurs origines.

### I- Analyse des paramètres responsables du profil monomérique des PHA produits

#### **I.1 Influence du substrat carboné sur le profil monomérique des PHA produits**

Le Tableau 31 présenté dans le chapitre précédent semble indiquer que le substrat utilisé pour la production des PHA a une influence sur le profil monomérique. Eggink et al. 1992, pour sa part, l'affirme en comparant la production de PHA produits à partir de glucose, glycérol et d'acide oléique. Le Tableau 32 récapitule les profils monomériques, référencés dans la littérature, obtenus avec *P. putida* à partir de différents substrats comme le glycérol et les carbohydrates utilisant la voie de biosynthèse des acides gras pour la synthèse des PHA. Il contient notamment les profils des PHA produits au cours de la culture B et d'une culture non détaillée dans ce manuscrit sur glucose (production de PHA en condition de carence azote) que l'on appellera culture E. Le Tableau 33

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

résume, quant à lui, les profils de PHA obtenus par cette même souche via la  $\beta$ -oxydation à partir d'acides gras. Les monomères à 12 et 14 carbones peuvent être saturés et/ou insaturés. Lors de la quantification des PHA produits au cours de cette thèse, le coefficient de réponse de la forme saturé est utilisé pour déterminer les concentrations des monomères saturés et (poly-) insaturés. Il y a donc un biais dans la quantification des PHA produits par la méthode de dosage utilisée dans cette thèse (voir Matériels & Méthodes).

Tableau 32 : Récapitulatif des profils monomériques obtenus à partir de la voie de biosynthèse des acides gras

Substrat	Pourcentage relatif des monomères de PHA (mole.mole <sup>-1</sup> )							Références
	3-HHx	3-HO	3-HD	3-HDD :1	3-HDD	3-HTD :1	3-HTD	
Glucose	tr	8.3	75.8	7.8	6.9	1.2	tr	Eggink et al. 1992
Glycérol	2.4	24.5	62.0	7.2	3.2	0.6	0.1	
Glycérol	ND	11.6	88.4	ND	ND	ND	ND	Haywood et al. 1990
Glucose	ND	27.1	72.9	ND	ND	ND	ND	
Acide gluconique	ND	22.7	77.3	ND	ND	ND	ND	
Fructose	ND	19.3	80.7	ND	ND	ND	ND	Marsudi et al. 2008
Glycérol	3.2	20.8	70.0	2.8	3.0	0.3	0.0	
Acide gluconique	ND	42.8	57.2	ND	ND	ND	ND	Y.-J. Chen et al. 2014
Fructose	ND	25.4	74.6	ND	ND	ND	ND	
Glycérol	2.9	18.2	62.1	8.0	8.3	0.5	0.0	Culture B
Glucose	1.2	14.9	62.4	6.2	6.4	5.5	3.4	Culture E

On constate que les profils de monomères de PHA produits à partir de glycérol ou de carbohydrates comportent un type de monomère majoritaire qu'est l'acide 3-hydroxydécanoïque (>55% mole.mole<sup>-1</sup> des monomères totaux) lorsqu'ils sont produits par la souche *P. putida*. Pour les cultures B et E, le taux de monomères insaturés est respectivement de 8.5 et de 11.7% (mole.mole<sup>-1</sup>).

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

Tableau 33 : Récapitulatif des profils monomériques obtenus à partir du catabolisme des acides gras

Substrat	Pourcentage relatif des monomères de PHA (mole.mole <sup>-1</sup> )								Références
	3-HHx	3-HO	3-HD	3-HDD :1	3-HDD	3-HTD:2	3-HTD :1	3-HTD	
Acide oléique	6.1	38.4	31.5	tr	12.2	ND	11.7	tr	Waard et al. 1993
Acide linoléique	7.7	44.2	22.0	14.3	ND	13.8	ND	ND	
Acide oléique	6.5	49.0	33.6	1.6	7.1	ND	1.9	0.4	Marsudi et al. 2008
Acides gras libres	6.0	53.8	22.9	1.8	9.1	ND	4.8	1.6	Cromwick et al. 1996
Acide oléique	6.1	38.4	31.4	ND	13.2	ND	11.7	ND	Eggink et al. 1992
Acide gras	7.0	31.1	30.1	2.6	14.6	2.0	11.1	1.5	Culture A
Glycérol + Acide gras	5.1	20.3	35.0	3.4	19.1	2.4	13.0	1.7	Culture C

A partir d'acides gras, les profils sont plus homogènes dans la répartition des différents types de monomères. Si les 3-hydroxyoctanoate et 3-hydroxydécanoate sont plus présents, aucun n'émerge véritablement (sauf Marsudi et al. 2008 et Cromwick et al. 1996). La part des monomères à 12 et 14 carbones est beaucoup plus importante comparée aux produits des cultures sur glycérol ou carbohydrates. Parmi ces monomères, un forte part d'acide 3-hydroxytétradécanoïque comporte une insaturation et une faible part en a deux. Une partie des acides 3-hydroxydodécanoïque possède également une insaturation. Pour la culture A, le part d'insaturé est de 15.7% (mole.mole<sup>-1</sup>), tandis qu'il est de 17.8% pour la culture C. Eggink 1992 explique que la présence de ces monomères de PHA insaturés prouve l'implication de l'enoyl-CoA isomérase dans le processus de production de PHA. La présence ou non d'une insaturation sur le monomère dépend de la nature de l'acide gras à son origine (Figure 57) (Silva-Queiroz et al. 2009). A partir de d'acide stéarique ou palmitique, aucun des monomères produits ne sera insaturé. Lorsque l'acide oléique seul est utilisé comme substrat, certains monomères à 14 carbones peuvent avoir une insaturation en position 5. L'acide linoléique permettra d'obtenir des composés à 12 carbones insaturés 1 fois et à 14 carbones avec deux doubles liaisons.

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

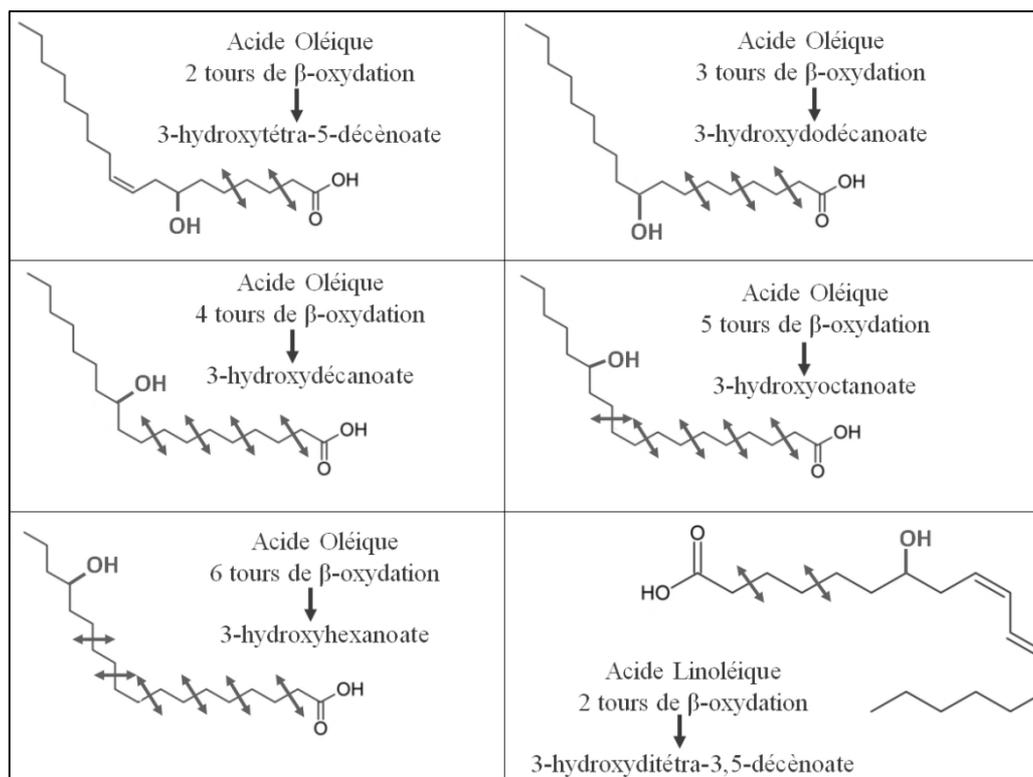


Figure 57 : Exemples de monomères de PHA pouvant être produits à partir d'acide oléique et linoléique

Chez *P. putida* KT2440, que les PHA soient produits via la synthèse ou le catabolisme des acides gras, les PHA synthases intervenant dans la polymérisation (PhaC1 et PhaC2) ont peu de différences de spécificités (Huisman, 1989). La différence de profil du polymère en fonction de la voie métabolique empruntée n'est donc pas le résultat de la seule spécificité de cette enzyme.

La voie de biosynthèse des acides gras est empruntée, en condition de croissance, pour produire les acides gras nécessaire au renouvellement et à la croissance des membranes plasmiques. Les acides gras principalement retrouvés dans les phospholipides de ces membranes comportent en moyenne entre 16 et 18 carbones chez cette souche (Kim et al. 2014). Pourtant, lorsque l'apport en substrat de type carbohydrates/glycérol est supérieur à la demande anabolique, ce sont des monomères à 10 carbones que l'on retrouve dans les PHA produits par cette voie et non des composés à 16 et 18 carbones. Pour Rehm & Mitsky (2001), ce phénomène s'explique par la spécificité de la R-3-hydroxyacyl-(ACP-CoA) transférase, également appelé PhaG pour les monomères à 10 carbones. En effet, la PHA synthase ne prenant en charge que des 3-hydroxyacyl-CoA, il faut que les 3-hydroxyacyl-ACP générés par la voie de biosynthèse des acides gras soient au préalable convertis par PhaG.

La  $\beta$ -oxydation, chez cette souche, permet de cataboliser n'importe quel acide gras saturé/insaturé quel que soit sa longueur de chaîne. Lorsque l'apport de carbone est supérieur à la demande anabolique, il y a une déviation des intermédiaires carbonés vers une voie de stockage que sont les PHA comme le montre la Figure 58. Ces intermédiaires en excès sont alors directement disponibles pour la PHA synthase.

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

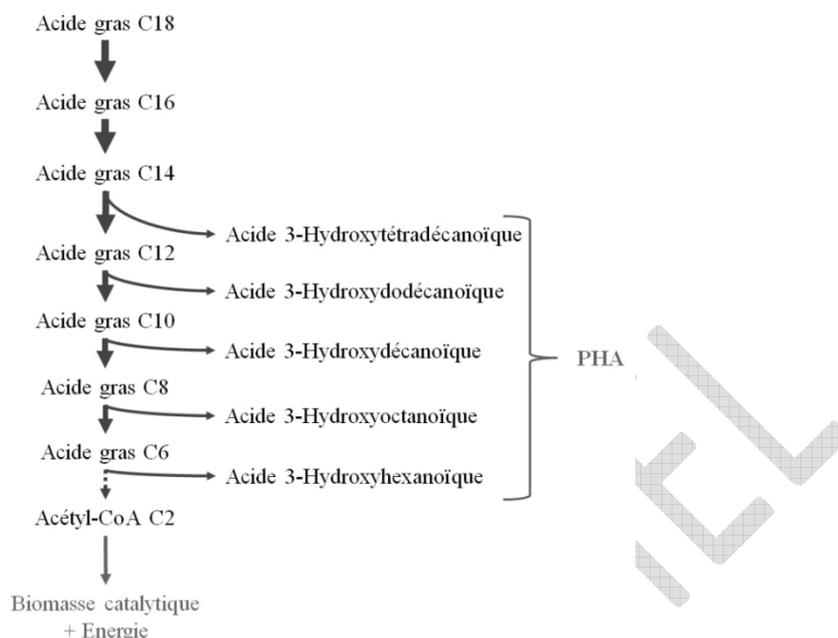


Figure 58 : Déviation des intermédiaires cataboliques des acides gras vers la production de PHA

De ce fait, le profil des intermédiaires déviés pourrait dépendre du rapport entre la vitesse spécifique d'assimilation du substrat par la cellule et le taux de croissance résiduel et/ou par la vitesse spécifique de production de PHA. L'étude de l'effet d'un inhibiteur de la voie catabolique des acides gras peut permettre d'évaluer les potentialités de modulation du profil monomérique des PHA en déstabilisant la distribution intracellulaire du carbone. Il existe plusieurs inhibiteurs de cette voie, comme l'acide salicylique (Glasgow et al. 1999) et l'acide acrylique (Kessler & Witholt, 2001; Qi et al. 1998; Thijssse, 1964). D'après ces auteurs, ces deux molécules inhibent l'acyl-CoA synthétase responsable du passage des acides gras à travers la membrane plasmique et de leur activation en leur ajoutant un coenzyme A. L'acide acrylique agirait également sur le  $\beta$ -cétotliase qui est l'enzyme séparant un acétyl-CoA de l'acyl-CoA concluant ainsi un tour de la  $\beta$ -oxydation (Green et al., 2002). Si l'acide acrylique est parfaitement miscible dans l'eau, l'acide salicylique a une limite de solubilité de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  dans l'eau. Par commodité, c'est l'acide acrylique qui a été retenu pour l'étude présentée ci-après.

### I.2 Influence de la PHA synthase sur le profil de PHA obtenus à partir d'acide gras

La culture présentée dans cette étude sera nommée « culture F » dans la suite de ce manuscrit.

#### I.2.1 Stratégie de la Culture F

La culture à partir d'acide gras est décomposée en deux phases. La phase de croissance à un taux de croissance constant égale à  $0.30 \text{ h}^{-1}$  sera contrôlée par l'alimentation exponentielle en substrat carboné jusqu'à obtenir  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse catalytique correspondant au moment où l'azote du milieu minéral initial sera épuisé. Au cours de la phase de production de PHA, une croissance

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

résiduelle est assurée par un flux d'alimentation en azote constant de telle sorte que le taux de croissance résiduel sera quasi constant et égal à  $0.02 \text{ h}^{-1}$  (en réalité il tendra vers  $0.01 \text{ h}^{-1}$  au fil de l'augmentation de la concentration en biomasse catalytique).

On cherche à voir si l'action de l'acide acrylique, caractérisée par une réduction du potentiel de croissance, entraîne un ralentissement de la  $\beta$ -oxydation, une modification de l'accumulation des intermédiaires de dégradations et par conséquent des monomères de PHA tout en laissant la possibilité d'une production d'acétyl-CoA nécessaire à la production d'énergie, requise en phase de production, ne serait-ce que pour l'activation des acides gras lors de leur assimilation. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'acide acrylique chez *P. putida* KT2440 n'est pas connue. Or, une inhibition totale de cette voie bloquerait totalement la croissance. Il est donc important d'apporter juste ce qu'il faut en inhibiteur pour observer un effet sans bloquer totalement la voie. Pour cela, au cours de la phase de croissance de la culture, lorsqu'une concentration suffisamment importante de biomasse catalytique sera obtenue (environ  $5 \text{ g.L}^{-1}$ ), de l'acide acrylique sera ajouté au goutte à goutte jusqu'à observer un effet d'inhibition. L'objectif de l'étude n'est pas de quantifier l'effet de l'acide acrylique, mais simplement de constater ce qu'il pourrait occasionner sur le profil des PHA en fin de culture. En effet, l'action de l'inhibiteur de la  $\beta$ -oxydation pourrait faire s'accumuler soit de manière globale les intermédiaires 3-hydroxyacyl-CoA au sein de la cellule, élargissant ainsi le spectre de possibilité d'ajouts de monomères par la PHA synthase au polymère, soit un intermédiaire préférentiel permettant d'obtenir un profil où l'un des types de monomères serait largement majoritaire. Cette inhibition du catabolisme des acides gras pourra être observée en ligne sur la vitesse de production de dioxyde de carbone, si celle-ci diminue après l'ajout d'acide acrylique. Au cours de la phase de production, l'inhibiteur sera ajoutée régulièrement afin de maintenir et/ou d'accentuer son effet sur la culture.

### I.2.2 Effet de l'acide acrylique sur la culture de production de PHA

La phase de croissance a duré 10.5 heures sur acides gras. Le taux de croissance expérimental obtenu est égal à  $0.27 \text{ h}^{-1}$ . Les premiers ajouts d'inhibiteur sont effectués au bout de 8 heures de culture. La Figure 59 présente l'évolution de la vitesse de production de  $\text{CO}_2$  à partir du premier ajout d'inhibiteur jusqu'à la fin de la phase de croissance. On y trouve également l'évolution du rapport  $[\text{Inhibiteur}]/X_{\text{cat}}$  sur cet intervalle de temps indiquant les moments où les ajouts ont été réalisés.

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

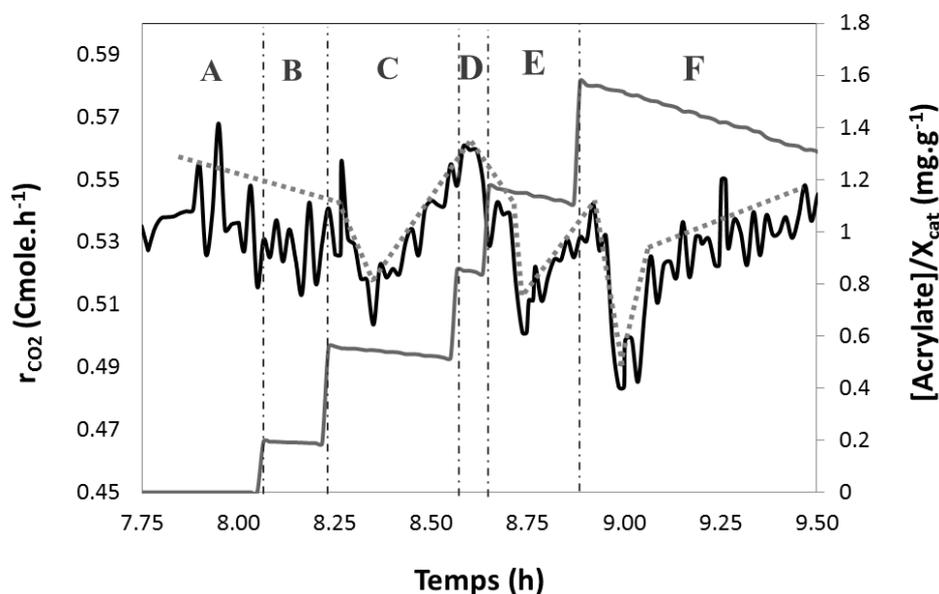


Figure 59 : Evolution de la vitesse de production de dioxyde de carbone (courbe noire) et de la concentration en inhibiteur ramenée à une unité de biomasse catalytique (courbe continue grise) au cours de la phase de croissance de la culture F

La zone notée A représente le système avant le premier ajout de l'acide acrylique. Après celui-ci, permettant d'obtenir une concentration d'inhibiteur de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  dans le milieu réactionnel, on ne constate aucun changement dans la dynamique d'évolution de la vitesse spécifique de production de  $\text{CO}_2$  (zone B). Le second ajout ( $4 \text{ mg.L}^{-1}$  totaux) provoque une brève chute de  $r_{CO_2}$  avant qu'elle ne se stabilise (zone C). L'effet inhibiteur de l'acide acrylique commence à être observable. Après les troisième (zone D), quatrième (zone E) et cinquième ajouts (zone F), les mêmes effets sont observés. Au terme de la phase de croissance, l'effet inhibiteur de l'acide acrylique est effectif. Il y a, alors, un rapport [Acide acrylique]/ $X_{cat}$  supérieur à  $1.2 \text{ mg.g}^{-1}$ , ce qui équivaut à une concentration de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  du composé dans le milieu de culture.

Au cours de la phase de production, 4 nouveaux ajouts sont effectués (Figure 60), pour atteindre une concentration finale de  $18 \text{ mg.L}^{-1}$ . Les mêmes effets sont notés sur la vitesse de production de dioxyde de carbone.

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

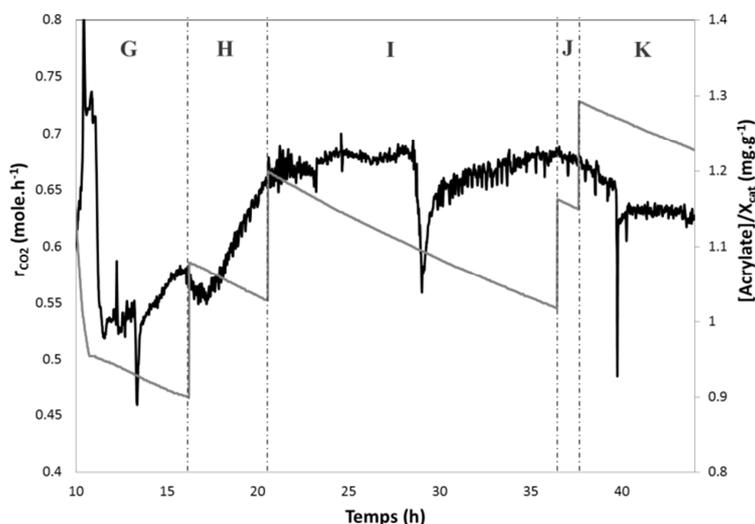


Figure 60 : Evolution de la vitesse de production de dioxyde de carbone (courbe noire) et de la concentration en inhibiteur ramené à une unité de biomasse catalytique (courbe grise) au cours de la phase de croissance de la culture F

L'effet inhibiteur de l'acide acrylique a été constaté tout au long de la culture. Le degré d'inhibition, même s'il n'est pas quantifiable, a augmenté au fil des ajouts de l'inhibiteur par rapport à la biomasse catalytique synthétisée.

Au terme de 45 heures de culture,  $36.3 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse totale, ayant accumulé 53% ( $\text{g.g}^{-1}$ ) de PHA, ont été synthétisés. Tout au long de la culture un léger excès de substrat résiduel a été maintenu dans le milieu réactionnel afin d'assurer des cinétiques d'assimilation de substrat et de production de PHA non limitées.

L'évolution des vitesses spécifiques au cours de la culture (Figure 61) ne montrent pas significativement d'effet de l'acide acrylique.

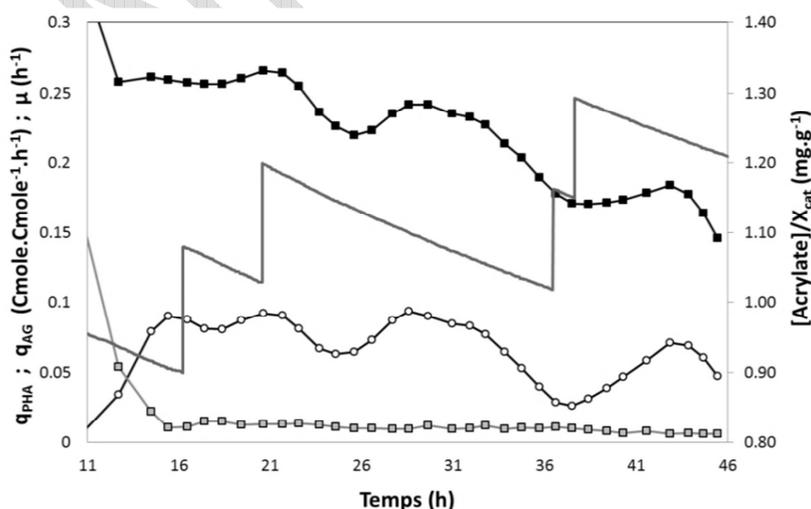


Figure 61 : Evolutions des vitesses spécifiques de consommation du substrat (carrés noirs), de production de PHA (ronds vides), de croissance (carrés gris) et de la concentration en inhibiteur ramené à une unité de biomasse catalytique (courbe continue grise) au cours de la phase de production de la culture F

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

D'après la littérature, cet inhibiteur a pour action d'altérer l'activité de la  $\beta$ -cétotliase. Par conséquent, le flux d'acétyl-CoA libéré par la  $\beta$ -oxydation devrait diminuer. Dans notre stratégie de culture, la limitation azote qui impose le taux de croissance résiduel est plus importante que l'effet d'inhibition sur le potentiel de croissance, c'est pourquoi le taux de croissance ne semble pas affecter et est de l'ordre de  $0.01 - 0.02 \text{ h}^{-1}$ . Les différents ajouts d'inhibiteur n'entraînent aucun changement immédiat dans l'évolution des vitesses spécifiques de consommation des acides gras et de production de PHA. On ne peut donc constater de l'effet de l'acide acrylique qu'en effectuant l'analyse des gaz de sortis de fermenteur. Le fait que  $q_{AG}$  ne diminue pas avec les ajouts d'inhibiteur montre que, jusqu'à  $18 \text{ mg.L}^{-1}$  d'acide acrylique dans le réacteur, l'activité de l'acyl-CoA synthétase, permettant l'activation des acides gras au moment de leur assimilation dans la cellule, n'est pas inhibée.

A taux de croissance résiduel équivalent (entre  $0.01$  et  $0.02 \text{ h}^{-1}$ ), les valeurs de  $q_{AG}$  et  $q_{PHA}$  de cette culture sont supérieures à celles de la culture A, sur acides gras à  $30^\circ\text{C}$  sans inhibiteurs (voir Figure 50 & Figure 61). Le fait que les vitesses spécifiques de production de PHA aient augmenté signifie qu'elles ont été favorisées par une disponibilité plus importante en intermédiaires 3-hydroxyacyl-CoA par action de l'inhibiteur. La distribution du carbone au sein de la cellule a donc été différente avec ou sans inhibiteur. L'ajout d'acide acrylique a provoqué une dissipation accrue en énergie (voir Figure 62) caractérisé par une production plus importante de dioxyde de carbone.

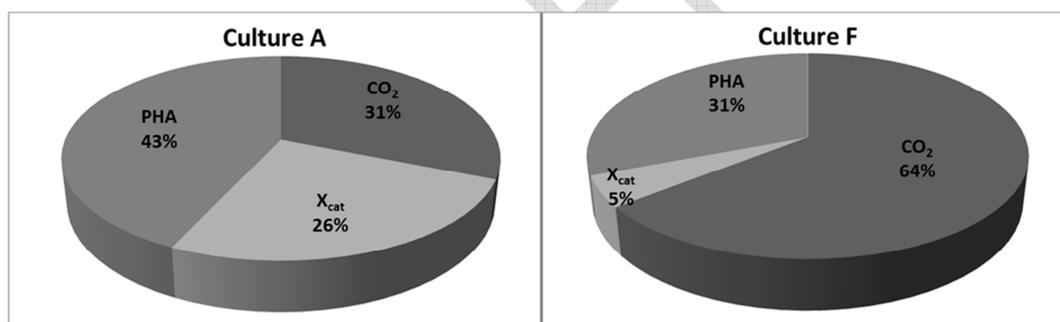


Figure 62 : Comparaison de la répartition du carbone entre la culture A (sans inhibiteur) et F (avec acide acrylique) lorsque le taux de croissance résiduel est compris entre  $0.01$  et  $0.02 \text{ h}^{-1}$

Comme montré dans la partie A des résultats, la  $\beta$ -oxydation produit des molécules d'acétyl-CoA et des coenzymes réduits. Ces coenzymes et une certaine part de l'acétyl-CoA servent de source d'énergie à la cellule. L'acide acrylique inhibant l'activité de la  $\beta$ -cétotliase, les flux d'acétyl-CoA et de coenzymes réduits ( $\text{FADH}_2$  et  $\text{NADH}_2$ ), générés par la  $\beta$ -oxydation, diminuent. Pour compenser la diminution du flux de coenzymes réduits nécessaires à la satisfaction de la demande énergétique, il est possible que la distribution de l'acétyl-CoA entre énergie et biomasse catalytique (comme source de carbone) ait changé en augmentant la part d'acétyl-CoA transformée en énergie. Ce phénomène pourrait expliquer la diminution du rendement expérimental de croissance lors de la culture F.

L'objectif de cette culture est de voir si l'ajout d'un inhibiteur du catabolisme des acides gras permet de moduler le profil des PHA finaux obtenus. Le diagramme de la Figure 63 indique le profil monomérique au point final des PHA produits lors de la culture F, comparé à celui de la culture A.

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

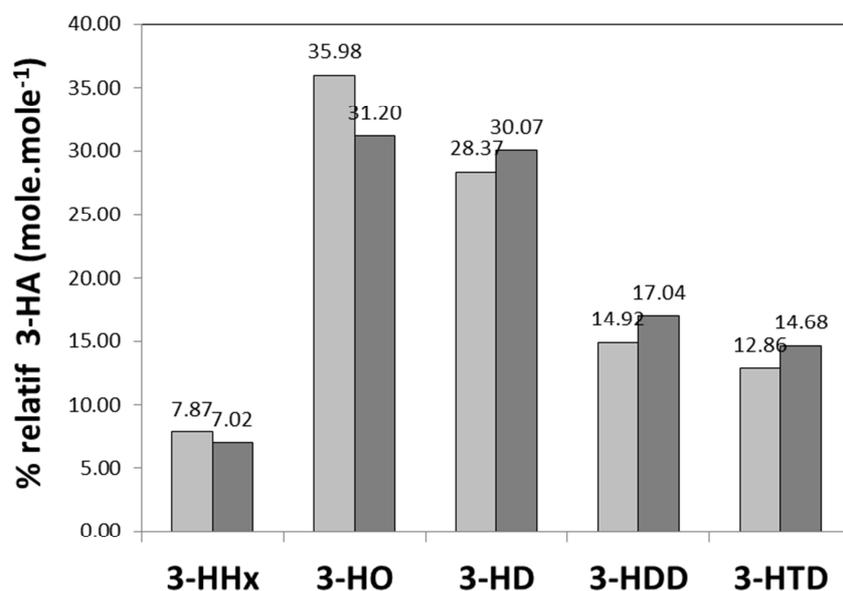


Figure 63 : Profil monomérique au point final de la culture sur acide gras à 30°C avec (culture F -gris clair) ou sans (culture A - gris foncé) inhibiteur de la  $\beta$ -oxydation

On remarque, que la part d'acides 3-hydroxyhexanoïques et 3-hydroxyoctanoïques a légèrement augmenté au détriment des acides 3-hydroxydodécanoïques et 3-hydroxytétradécanoïques en présence de l'inhibiteur. Le nombre de carbones moyen par monomère des PHA de cette culture égal à 9.78 est légèrement inférieur aux PHA des cultures sur acides gras sans inhibiteur qui ont en moyenne 10.02 carbones. Toutefois, le faible écart de profil, entre les cultures A et F, malgré une amélioration de la disponibilité des intermédiaires 3-hydroxyacyl-CoA par l'acide acrylique (dans la culture F), laisse penser que cette répartition monomérique est le reflet de la spécificité de la PHA synthase.

## II- Propriétés des polymères produits

### II.1 Caractérisation des polymères

Les paramètres influant sur la composition monomérique des PHA produits au cours de cette thèse ont été détaillés dans le paragraphe précédent. Il est également intéressant et nécessaire d'évaluer certaines propriétés caractérisant les polymères extraits et purifiés par des analyses DSC et de SEC (voir Matériels & Méthodes). L'objectif est d'évaluer s'il est possible d'établir des liens entre la conduite de la culture, les phénomènes biologiques qui en résultent et les caractéristiques des polymères finaux synthétisés. De plus, les PHA extraits provenant des différentes productions réalisées présentent des aspects très différents. Les polymères synthétisés à partir de glycérol et de glucose ont l'aspect d'un film élastique non collant (cultures B & E), tandis que les autres ressemblent à des pâtes très collantes et non maniables (cultures A, C, D & F). Il est donc intéressant d'évaluer, via ces analyses, si cette différence visuelle d'aspect trouve son explication dans des différences de caractéristiques. L'ensemble des résultats des analyses des PHA produits au cours du doctorat sont résumés dans le Tableau 34.

Tableau 34 : Caractéristiques thermoplastiques et de composition de MCL-PHA produits au cours des différentes cultures de la thèse

Culture	Substrat	$M_w$ (kDa)	$I_p$	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{fus}$ (J.g <sup>-1</sup> )	$T_g$ (°C)
A	Acide gras	78.5	1.28	non	non	-48.8
B	Glycérol	92.6	1.41	47.1	14.56	-47.8
C	Acide gras + Glycérol	94.4	1.41	non	non	-46.0
D	Acide gras	88.8	1.38	non	non	-47.1
E	Glucose	77.7	1.30	45.6	7.08	-45.6
F	Acide gras	125	2.29	non	non	-45.9

Les valeurs de masses molaires moyennes en poids et d'indice de polydispersité ont été déterminées par le détecteur RI de l'analyse de chromatographie à perméation de gel. Aucune détection de ces polymères n'a eu lieu avec le détecteur UV. Cela signifie que la part de monomères insaturés est restée faible devant la part de monomères saturés au sein de ces PHA, ce qui correspond aux valeurs de taux de monomères insaturés au sein des polymères présentées précédemment.

Les températures de transition vitreuse  $T_g$  ont des valeurs très proches, entre -45 et -49°C, quel que soit le substrat, la conduite de culture ou la composition monomérique des PHA finaux.

Il n'y a par contre de températures de fusion et d'enthalpies de fusion associées que pour les cultures B et E au cours desquelles les polymères ont été produits via la voie de biosynthèse des acides gras. Les PHA n'ayant pas de  $T_m$  sont totalement amorphes à température ambiante. L'ensemble des polymères dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 34 sont à l'état caoutchoutique puisque  $T_{amb}$  (20-25°C) est compris entre leur  $T_g$  et leur  $T_m$ .

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

On constate que les valeurs de  $M_w$  présentes dans le Tableau 34 sont très variables allant de 78 à 125 kDa. La culture F a une masse molaire moyenne en poids égale à 125 kDa alors que les autres sont comprises entre 78 et 94 kDa.

### II.2 Formulation au cours de l'extraction

Comme énoncé précédemment, les aspects des PHA extraits et purifiés diffèrent en fonction de la voie métabolique empruntée. Des mélanges des moûts lyophilisés des cultures A (PHA synthétisés à partir d'acides gras) et B (PHA produits à partir de glycérol) ont été effectués avant l'extraction des PHA au chloroforme (voir Matériels & Méthodes pour le protocole d'extraction). Les différentes formulations, le pourcentage molaire de monomères insaturés et les compositions monomériques des polymères obtenus sont présentés dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Récapitulatif des formulations de MCL-PHA effectuées et compositions monomériques des produits finaux

% (g.g <sup>-1</sup> )		% (mole.mole <sup>-1</sup> )					
Moût culture A	Moût culture B	%Insat	3-HHx	3-HO	3-HD	3-HDD	3-HTD
0	100	8.5	2.9	18.2	62.1	16.3	0.5
10	90	9.2	3.3	19.5	58.9	16.4	1.9
25	75	10.3	3.9	21.4	54.1	16.5	4.0
50	50	12.1	5.0	24.7	46.1	16.8	7.6
75	25	13.9	6.0	27.9	38.1	17.0	11.1
90	10	15.0	6.6	29.8	33.3	17.1	13.2
100	0	15.7	7.0	31.1	30.1	17.2	14.6

Les produits obtenus ont ensuite été analysés en analyses SEC et DSC. Le Tableau 36 en présente les résultats.

Tableau 36 : Caractéristiques thermoplastiques des PHA après formulation

% (g.g <sup>-1</sup> )		$M_w$ (kDa)	$I_p$	$T_m$ (°C)	$T_g$ (°C)	$\Delta H_{fus}$ (J.g <sup>-1</sup> )
Moût culture A	Moût culture B					
0	100	92.6	1.41	47.1	-47.8	14.59
10	90	81	1.62	48.2	-47.9	15.85
25	75	83.5	1.99	47.2	-49.1	12.00
50	50	84.6	2.00	46.0	-48.1	9.45
75	25	84.8	2.09	44.6	-48.4	3.87
90	10	83.5	2.07	44.4	-49.1	2.49
100	0	78.5	1.28	non	-48.8	non

Bien que les PHA de la culture A ne présentent pas de température de fusion une fois extrait, l'ensemble des polymères obtenus après formulation en ont une. On note que plus la part des PHA

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

produits à partir d'acides gras est grande, plus  $T_m$  est basse.  $M_w$  et  $T_g$  diffèrent peu d'un produit de formulation à l'autre. L'évolution de l'enthalpie de fusion en fonction des proportions relatives de PHA produits à partir d'acides gras et de glycérol est présentée dans la Figure 64.

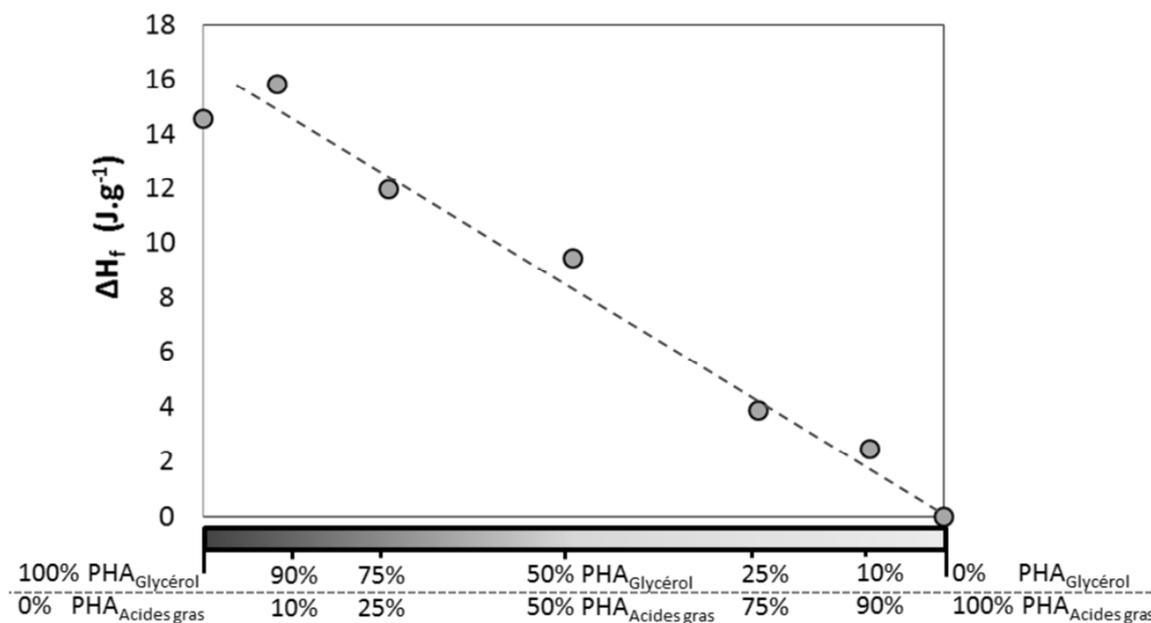


Figure 64 : Evolution de l'enthalpie de fusion des polymères en fonction des parts relatives de PHA formés lors des cultures A et B

Plus la part de polymères synthétisés à partir de glycérol est grande dans le mélange, plus l'enthalpie de fusion est élevée, et donc plus le taux de cristallinité du produit est important.

L'aspect film non collant, caractéristique de la culture B, se retrouve pour les mélanges comportant 50% ou plus de PHA produits à partir de glycérol. Dans ces conditions, le comportement cristallin du polymère prend le dessus sur le comportement rhéologique correspondant à une pâte collante des polymères synthétisés à partir d'acides gras. De plus, on a vu que les polymères synthétisés à partir d'acides gras avaient un taux de monomères insaturés supérieurs à ceux produits à partir de glycérol (ou glucose). On peut supposer que ce taux de monomères insaturés est lié au degré de cristallinité. En effet, de par leur structure moléculaire coudée, les monomères insaturés ne favorisent pas les interactions hydrophobes entre les chaînes carbonées des différents monomères, ce qui empêche le polymère de cristalliser. Il faut donc que le pourcentage de monomères insaturés soit inférieur ou égal à 12.1% ( $\text{mole}\cdot\text{mole}^{-1}$ ) pour que le polymère formulé ait l'aspect d'un film élastique.

### **III- Discussion**

Ce chapitre a permis d'étudier les paramètres influant sur le profil monomérique des PHA et les caractéristiques plasturgiques de ces polymères.

Les caractéristiques des polymères produits lors des différentes cultures de cette thèse peuvent être comparées aux données issues de la littérature présentées dans le Tableau 37. Il a été montré que le profil monomérique des PHA était en partie dépendant de la nature du substrat utilisé. Les PHA, synthétisés via la voie de biosynthèse des acides gras, ont des profils comportant une majorité d'acide 3-hydroxydécanoïque (cultures B, E & Miura et al. 2013), alors que les polymères obtenus par le catabolisme des acides gras ont des profils plus homogènes en terme de répartition des monomères (cultures A, C, D, F, Ashby & Foglia 1998, Chan Sin et al. 2010, Mozejko & Ciesielski 2013 & 2014). Abe et al. (2012) a effectué des cultures au cours desquelles la demande anabolique est satisfaite par un apport de glucose et les PHA sont synthétisés à partir d'acide gras à 6, 8, 10 ou 12 carbones. Les PHA alors obtenus sont constitués de presque 100% des monomères comportant le même nombre de carbones. Ces acides gras à moyenne chaîne latérale ont pourtant empruntée la  $\beta$ -oxydation pour devenir PHA. Les polymères obtenus par Abe et al. (2012) montrent que ce n'est pas la voie métabolique qui détermine le profil monomérique mais surtout le substrat.

Pour ce qui concerne la production de PHA via la  $\beta$ -oxydation, Huijberts & Eggink (1996) avaient observé qu'à des taux de croissance élevés, il y a moins d'acide 3-hydroxytétradécanoïque au sein des PHA produits à partir d'acides gras qu'à des  $\mu$  faibles. Lageveen et al. (1988) évoque l'existence d'un point clé au sein de la  $\beta$ -oxydation où l'intermédiaire carboné a le choix entre l'anabolisme ou la production de polymère. Ce choix serait dicté par des différences d'affinités entre la PHA synthase et les enzymes du catabolisme des acides gras. Par conséquent, à  $\mu$  faible, les intermédiaires à longues chaînes latérales ont une plus grande probabilité d'être stockés sous forme de PHA alors qu'à  $\mu$  élevé ce serait les intermédiaires plus courts. Nos résultats ne sont pas en accord avec cette théorie puisque les polymères synthétisés lors des cultures A, C & D, où les taux de croissance résiduels étaient très différents, ont tous le même profil monomérique final. La culture F a permis de montrer que le profil obtenu sur acides gras était globalement dépendant de la spécificité de la PHA synthase même s'il reste légèrement modulable en utilisant des inhibiteurs de la  $\beta$ -oxydation. A partir de cette conclusion, les profils de PHA de Abe et al. (2012) peuvent être expliqués par le fait que les substrats de production ont un nombre de carbone correspondant à l'affinité de la PHA synthase.

Via la voie de biosynthèse des acides gras, le profil des PHA très riche en monomères à 10 carbones serait dû à la spécificité de la R-3-hydroxyacyl-(ACP-CoA) transférase d'après Rehm & Mitsky 2001.

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

Tableau 37 : Caractéristiques thermomécaniques et de composition des MCL-PHA produits par des souches du genre *Pseudomonas*

Substrat	% (mole.mole <sup>-1</sup> )					M <sub>w</sub> (kDa)	I <sub>p</sub>	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>fus</sub> (J.g <sup>-1</sup> )	T <sub>g</sub> (°C)	Références
	3-HHx	3-HO	3-HD	3-HDD	3-HTD						
Acide gras	7.0	31.1	30.1	17.2	14.6	78.5	1.28	non	non	-48.8	A
Glycérol	2.9	18.2	62.1	16.3	0.5	92.6	1.41	47.1	14.56	-47.8	B
Acide gras + Glycérol	5.1	20.3	35.0	22.5	17.1	94.4	1.41	non	non	-46.0	C
Acide gras	5.4	24.7	38.1	19.4	13.0	88.8	1.38	non	non	-47.1	D
Glucose	1.2	14.9	62.4	12.6	8.9	77.7	1.30	45.6	7.08	-45.6	E
Acide gras	7.8	35.9	28.5	14.9	12.9	125	2.29	non	non	-45.9	F
Glycérol	3.5	28.2	49.9	18.4	0.0	58	1.40	n.d.	n.d.	n.d.	Miura et al. 2013
Acide Octanoïque	1.2	98.8	0.0	0.0	0.0	160.8	2.40	51	29	-47	Abe et al. 2012
Acide Décanoïque	0.0	0.0	100	0.0	0.0	138	2.00	69	40	-53	
Acide Hexanoïque	100	0.0	0.0	0.0	0.0	193.6	2.20	59	34	-28	
Acide Dodécanoïque	0.0	0.0	5.0	95.0	0.0	91.8	1.80	69	57	n.d.	
Acide Oléique	13.7	32.7	30.8	11.7	11.1	146	2.00	42	10.7	-44	Ashby & Foglia 1998
Huile de lard	9.8	30.0	33.4	15.4	11.4	139.4	1.66	39	9.5	-46	
Huile d'olive	12.4	32.8	31.8	12.6	10.4	119	1.65	41	10.7	-45	
Huile de coco	10.6	40.6	32.8	13.8	2.2	165	1.63	48	12.3	-38	
Acide Oléique	6.8	46.7	28.5	10.7	7.3	60.9	2.00	n.d.	n.d.	-44.1	Chan Sin et al. 2010
Déchets d'huile de palme	0.0	48.0	39.1	12.9	0	109	1.68	86	n.d.	-55	Możejko & Ciesielski 2013
Déchets d'huile de colza	14.4	51.1	26.6	7.9	0	144	2.48	46	2.5	-38	Możejko & Ciesielski 2014

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

La température de fusion des polymères caractérise le changement de transition secondaire du polymère de l'état caoutchoutique à l'état fondu. L'enthalpie de fusion  $\Delta H_{fus}$  permet d'évaluer le taux de cristallinité du polymère. On constate que les polymères synthétisés au cours des cultures A, C, D & F n'ont pas de  $T_m$  alors que ceux des cultures B & E en possède une. Cette observation peut s'expliquer par plusieurs facteurs.

Premièrement, d'après Tortajada et al. (2013), plus la fraction molaire de monomères insaturés est grande au sein du polymère, plus basses seront les températures de fusions et de transition vitreuse du fait d'une inhibition de la cristallisation du polymère par ces doubles liaisons. En effet, l'insaturation provoquant un coude dans la chaîne latérale. L'écart stérique entre les chaînes latérales augmente alors, ne permettant plus la mise en place de liaisons hydrophobes qui facilitent la cristallisation. On a vu précédemment que la fraction molaire de monomères insaturés est directement dépendante de la nature des acides gras utilisés comme substrat de production (voir Figure 57). Il semble donc possible de moduler ces deux caractéristiques thermiques par le choix d'un substrat brut plus ou moins riches en acides gras polyinsaturés. Toujours d'après Tortajada et al. (2013), la synthèse d'acides 3-hydroxyalcanoïques insaturés est presque nulle par la voie de biosynthèse des acides gras, par conséquent la cristallisation s'effectue plus facilement. Les résultats des formulations précédentes ont confirmé cette tendance, puisque les polymères ayant un taux de monomères insaturés inférieur ou égal à 12.1% (mole.mole<sup>-1</sup>) ont un degré de cristallinité suffisant pour garantir une certaine rigidité au film plastique.

Enfin, le second aspect, pouvant influencer le taux de cristallinité et donc la  $\Delta H_{fus}$  du polymère, est sa composition monomérique. D'après les données issues des cultures A-F et de Abe et al. 2012, on peut affirmer que pour favoriser la formation de ces zones cristallines, il semble préférable d'avoir un type de monomère de PHA majoritaire au sein du polymère, de telle sorte que des interactions hydrophobes entre chaînes latérales de mêmes longueurs puissent se mettre en place aisément (Tableau 37). Toutefois la réciproque n'est pas vraie (Ashby & Foglia 1998), ce qui prouve que le profil monomérique des PHA n'est pas le seul aspect permettant d'obtenir des PHA ayant des zones cristallines.

Les valeurs de masses molaires moyennes en poids, présentées dans le Tableau 37, sont très variables en fonction des auteurs. Les valeurs de  $M_w$  des PHA des cultures A à E sont, elles, très proches alors que les dynamiques des cultures, qui ont permis leurs productions, ont été différentes. Lors des cultures B et C, le taux de croissance a évolué en fonction du temps, selon des équations de la forme :  $\mu = a \cdot t + b$  différentes (soit  $d\mu = a \cdot dt$ ). Si l'on note  $X_{PHA}$  l'avancement de la production de PHA par rapport à la quantité de PHA finale synthétisée (en % Cmole.Cmole<sup>-1</sup>) pour chacune des cultures, on a :

$$X_{PHA} = \frac{1}{PHA_f} \cdot \int_0^t r_{PHA} \cdot dt = \frac{1}{a \cdot PHA_f} \cdot \int_{\mu_0}^{\mu} r_{PHA} \cdot d\mu \quad \text{Équation 63}$$

Avec :  $r_{PHA}$  : la vitesse de production de PHA (en Cmole.h<sup>-1</sup>)

$PHA_f$  : la quantité finale de PHA de la culture (en Cmole)

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

La Figure 65 représente l'évolution de cet avancement de la production de PHA en fonction du taux de croissance pour les cultures B et C.

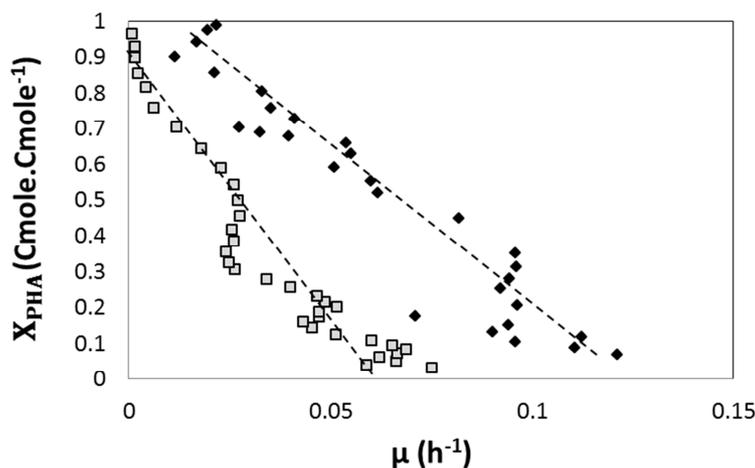


Figure 65 : Evolution de l'avancement de production de PHA en fonction du taux de croissance pour les cultures B (carrés gris) et C (losanges noirs)

On constate que les relations entre l'avancement de la production de PHA et le taux de croissance de ces deux cultures sont linéaires. Par conséquent, on peut dire que les propriétés caractérisant les PHA produits lors de ces cultures sont des valeurs moyennes. Elles ne sont pas plus représentatives des PHA synthétisés aux taux de croissance faibles que ceux produits à  $\mu$  élevés. Les PHA de la culture A, synthétisés à un taux de croissance relativement constant (entre 0.01 et 0.04 h<sup>-1</sup>), ont une masse moyenne en poids très proche de celle de la culture C, où le taux de croissance a évolué de 0.15 à 0.01 h<sup>-1</sup> au cours fil du temps. Il semble donc que les valeurs des masses molaires moyennes en poids  $M_w$  de ces expérimentations sont indépendantes de la dynamique de la culture. Cette conclusion avait également été relatée par Huijberts & Eggink, (1996) et Hori et al. (1994).

Selon Huisman et al. (1992) et Sim et al. (1997), la concentration en PHA synthase au sein de la cellule pourrait être un facteur déterminant pour  $M_w$ . Ces enzymes étant situées sur les membranes des granules de PHA, il y a une initiation de polymérisation par PHA synthase. De ce fait, plus la concentration en PHA synthase serait importante, plus le nombre de polymère serait important et plus la masse molaire moyenne en poids serait faible. Toutefois, le moyen de contrôler cette concentration en PHA synthase reste inexpliqué.

Il existerait également un effet appelé « end-cap » lorsque le substrat est le glycérol, ce qui engendrerait des polymères à faible masse molaire sur ce substrat. Le glycérol viendrait se polymériser ne laissant alors aucune fonction acide carboxylique disponible pour prolonger l'élongation (Escapa et al., 2013; Miura et al., 2013; Poblete-Castro et al., 2014). Toutefois cette hypothèse paraît surprenante car il n'y a aucune raison que le glycérol puisse entrer dans la granule ou qu'il soit pris en charge par la PHA synthase.

Il a été montré que les PHA obtenus à partir de substrats composés d'acides gras, bien qu'intéressant du point de vue de la composition monomérique, ont un aspect ne permettant pas leur manipulation à l'échelle industrielle. *A contrario* les films élastiques obtenus à partir de glycérol sont très prometteurs. Cependant, le glycérol ne représente qu'une faible part du carbone des substrats bruts

## Résultats - Partie C : Détermination des paramètres influençant les caractéristiques des PHA produits

à valoriser (environ 15% du carbone du substrat). Des formulations de ces deux types de PHA ont permis d'établir que le facteur responsable de l'aspect était le degré de cristallinité des polymères. Ce dernier, directement corrélé à l'enthalpie de fusion permet aux polymères de maintenir le comportement mécanique d'un film à partir d'une valeur  $\Delta H_{fus}$  égale à  $10 \text{ J.g}^{-1}$ . Cette valeur correspond au mélange 50%-50% des moûts lyophilisés de culture réalisée à partir d'acides gras et de glycérol. Dans ces proportions, le polymère devient manipulable. Toutefois, une culture avec une alimentation composée d'un mélange de glycérol – acides gras dans un rapport de 50%-50% ( $\text{Cmole.Cmole}^{-1}$ ) ne devrait pas permettre d'obtenir des PHA avec un degré de cristallinité suffisant pour avoir l'aspect d'un film.

Globalement, les polymères obtenus lors de ces travaux de thèses ont des masses molaires moyennes en poids faibles. Seulement les leviers sur lesquels agir, lors de la culture, pour augmenter celles-ci demeurent obscurs. Il est néanmoins possible de conclure que, dans nos expérimentations, la masse molaire n'est pas responsable de l'aspect du produit final. En effet, les PHA sous forme de film élastique ou de pâte collante ont des masses molaires moyennes en poids relativement proches. Il serait toutefois intéressant de tenter d'augmenter significativement la masse molaire des polymères obtenus à partir d'acides gras par une réaction chimique de polycondensation pour évaluer si la  $M_w$  peut, au-delà d'une certaine valeur, influencer sur la rigidité du PHA.

#### **IV- Synthèse des résultats**

- Le profil monomérique des PHA est dépendant du substrat et de la voie métabolique empruntée. Par la  $\beta$ -oxydation, il semble que la spécificité de la PHA synthase détermine le profil, tandis que via la voie de biosynthèse des acides gras, c'est celle de la R-3-hydroxyacyl-(ACP-CoA) transférase
  
- Les PHA ex-acides gras extraits ont l'aspect d'une pâte collante non maniable, totalement amorphe, alors que les PHA ex-glycérol ont l'aspect d'un film élastique non collant avec des zones cristallines
  
- Le degré de cristallinité du polymère, caractérisé par l'enthalpie de fusion, est dépendant du taux de monomères insaturés au sein du polymère et de la nature du profil monomérique
  
- En effectuant de la formulation au moment de l'extraction de polymères synthétisés à partir d'acides gras et de glycérol dans des proportions de 50%-50% massique, il est possible d'obtenir un film élastique manipulable
  
- Pour obtenir ce film élastique de PHA, il est nécessaire que les polymères aient un taux de monomères insaturés inférieur ou égal à 12.1% mole.mole<sup>-1</sup>.

## D- Production de PHA à partir de graisses de canard : Etude de faisabilité

### I. Introduction

Cette thèse intitulée « Etude des potentialités de production de polyhydroxyalcanoates à partir de substrats de types acides gras » a pour objectif final la détermination des paramètres d'optimisation du procédé de production de PHA à partir de graisses de canard par la souche *P. putida* KT2440. Ce substrat brut dont le gisement peut être important n'est pour le moment que peu valorisé (seulement dans le secteur alimentaire). Les différentes cultures présentées précédemment ont permis de comprendre le fonctionnement physiologique et métabolique de la souche et d'établir que des PHA d'intérêts industriels pouvaient être synthétisés à partir des substrats simples tels que le glycérol et/ou les acides gras. Seulement, dans les graisses animales, ces substrats se trouvent sous la forme de mono-, di- et triglycérides. Ils ne sont donc pas assimilables directement (Walsh et al. 2015). La souche pouvoir les hydrolyser dans le milieu grâce à la sécrétion de lipases, qui rendront ces substrats simples et disponibles pour leurs consommations par la biomasse. Shang et al. 2008 expliquent que la souche *P. putida* KT2442 (souche KT2440 ayant acquis une résistance à la rifampicine) n'a pas cette capacité de sécrétion de lipases et est donc incapable de croître sur des graisses ou huiles non hydrolysées. Cette conclusion a été confirmée par un test de croissance sur boîte (milieu minéral + graisse) dont le résultat a été négatif. L'hydrolyse de ces graisses doit donc être effectuée en amont de la culture pour rendre les substrats simples et disponibles pour la production de biomasse catalytique et de PHA. Ce chapitre va détailler l'étude de faisabilité du procédé global de production de polymères à partir de ces graisses de canard jusqu'à l'extraction des polymères produits, sans nécessairement en faire une analyse aussi poussée que pour les cultures précédemment présentées dans ce manuscrit.

### II. Hydrolyse enzymatique

Dans l'optique d'hydrolyser les graisses de canard, le CRITT Bio-industrie a été sollicité afin d'étudier la faisabilité de cette étape de traitement de ce substrat brut en testant deux types de lipases commerciales (Tableau 38).

Tableau 38 : Références des lipases testées pour l'hydrolyse des graisses de canard

Enzymes	Fournisseur	Activité fournisseur (U.mg <sup>-1</sup> )	prix (€/100g)
Lipase Type VII de <i>Candida rugosa</i>	Sigma	885 ou 1117	417,00
Lipase OF	Meito Sangyo	392	45,00

A partir de la composition des graisses de canard en acides gras (voir Matériels & Méthodes), l'activité de ces lipases est testée en effectuant un suivi, au cours du temps, de la quantité d'acide gras libérée ramenée à la quantité totale d'acides gras présente dans les graisses Dans une solution à 500 g de graisses par litre d'émulsion, les lipases ont été ajoutées à hauteur de 0.1% (g lipases. g graisses<sup>-1</sup>).

## Résultats - Partie D : Production de PHA à partir de graisses de canard : Etude de faisabilité

Deux températures de travail ont été testées (30°C et 45°C). L'expérience se fait à pH 7.0 grâce à l'utilisation d'un tampon phosphate citrate (solutions stock acide citrique 0,1M et sodium phosphate dibasique 0,1M). Le pourcentage d'hydrolyse le plus élevé a été obtenu par la Lipase OF de Meito Sangyo à 30°C et est présenté dans la Figure 66.

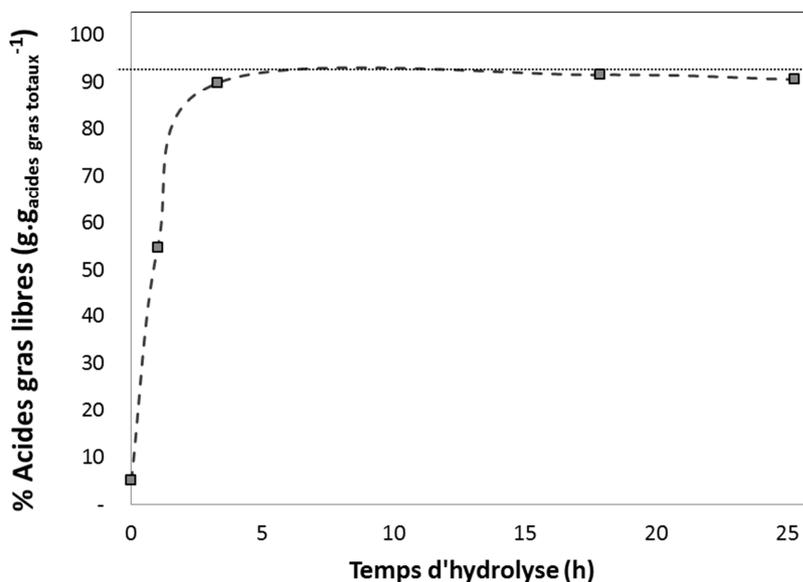


Figure 66 : Suivi du pourcentage d'acides gras libres par rapport à la quantité d'acides gras totaux présents dans les graisses (carrés gris) au cours de l'hydrolyse enzymatique (résultats du CRITT Bio-Industrie)

A partir de 5h d'hydrolyse, 92% des acides gras contenus dans les graisses ont été libérés. L'hydrolyse de ce substrat brut par les lipases Meito Sangyo est donc efficace. Toutefois, initialement liquide à température ambiante, la graisse de canard prend en masse au cours de son hydrolyse. Le milieu finit par devenir diphasique comme sur la photo de la Figure 67. La phase aqueuse contenant le glycérol libéré se retrouve au fond alors que la phase organique contenant les acides gras flotte à la surface.



Figure 67 : Photo de l'hydrolysat des graisses de canard à température ambiante

## Résultats - Partie D : Production de PHA à partir de graisses de canard : Etude de faisabilité

Ce changement d'état est dû à une différence de point de fusion entre les triglycérides et les acides gras libres. Plus précisément, cette solidification de la phase grasse provient de l'importante proportion en acides gras saturés (26 % Acide palmitique C16:0 et 6.8% Acide Stéarique C18:0) dont le point de fusion est supérieur à la température ambiante, respectivement 63.1°C et 70°C (David R. Lide, 2008). Inoue et al. (2004) a présenté un diagramme dans lequel sont représentés les états physique d'un mélange d'acides oléique et palmitique en fonction de leurs proportions respectives (Figure 68).

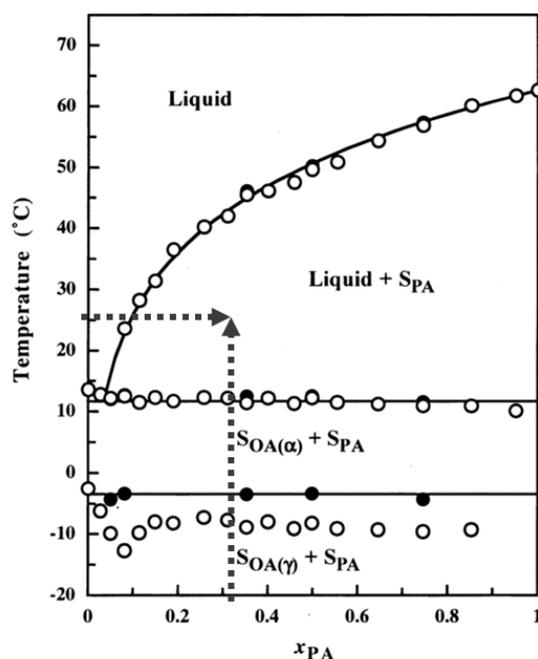


Figure 68 : Diagramme de phases du mélange acide oléique (OA) – acide palmitique (PA) construit à partir de résultats de DSC. S<sub>PA</sub> : Acide palmitique à l'état solide ; S<sub>OA(α)</sub> et S<sub>OA(γ)</sub> : Acide oléique solide sous les formes polymorphiques α et γ (Inoue et al. 2004).

Si l'on simplifie la composition des graisses en considérant tous les acides gras saturés comme de l'acide palmitique (33% des acides gras totaux sont saturés dont 26% d'acide palmitique) et les insaturés comme de l'acide oléique (67% des acides gras totaux sont insaturés dont 50.6% d'acide oléique). Dans ces proportions et à température ambiante, le mélange d'acides gras libres est à l'état liquide-solide. Les insaturés sont liquides tandis que les saturés sont solides.

Les hydrolysats de graisses de canard ne restent donc pas homogènes et leur état empêche leur transport vers le bioréacteur afin de servir de substrat à la production de PHA par *P. putida*. Un couplage de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation est donc envisagé. On appellera cette culture G dans la suite du manuscrit.

Dans les conditions d'hydrolyse testées précédemment, le flux d'acides gras libérés ( $\Phi_{AG}^{hydrolysé}$ ) est équivalent à 90 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Cette valeur est largement supérieure au flux d'acide gras pouvant être assimilé par la souche aux vues des résultats expérimentaux des cultures sur acides gras simples déjà présentées ( $\Phi_{AG}^{assimilé} = 1.5$  g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Le flux d'assimilation étant faible, il est nécessaire

## Résultats - Partie D : Production de PHA à partir de graisses de canard : Etude de faisabilité

de vérifier qu'à une concentration en graisses faibles, l'activité enzymatique est toujours effective. De plus, la synthèse de PHA s'effectuant en limitation azote et les lipases étant des protéines, sources d'azote, il faut vérifier que ces enzymes ne sont pas dégradées par d'éventuelles protéases sécrétées par la biomasse dans ces conditions. De nouveaux tests d'hydrolyses enzymatiques (effectués avec le CRITT Bio-Industrie) à des concentrations en graisses faibles ( $1.5 \text{ g.L}^{-1}$ ) ont permis de conclure que l'activité était plus lente mais toujours effective. D'autres tests ont permis de s'assurer de la non-dégradation des lipases en condition de carence azote au terme de 70 heures de culture.

Grâce à l'ensemble des résultats fournis par le CRITT Bio-industries, on peut déterminer un ratio Enzyme/Substrat de travail. Bien que ce ratio ne permette pas de déterminer la vitesse de l'hydrolyse, il nous aidera à conduire la culture G en réacteur 20 L. Pour que le flux d'acide gras hydrolysé corresponde au flux d'acide gras pouvant être assimilé par la biomasse catalytique, le ratio Enzyme/Substrat de 0.001, imposé par le CRITT, pourrait être divisé par 60. Toutefois, dans l'espoir d'approcher la vitesse d'hydrolyse maximale ( $V_{\max}$ ) et parce que cela ne représente pas une très grande quantité d'enzyme, ce ratio n'est divisé que par 10.

### III. Couplage de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation : Culture G

#### III.1 Stratégie de la culture G

Une phase de croissance sur glucose est contrôlée pour produire  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse catalytique selon un taux de croissance constant de  $0.6 \text{ h}^{-1}$  ( $\mu_{\max} = 0.65 \text{ h}^{-1}$  (Davis et al. 2015)) jusqu'à atteindre l'épuisement en azote du milieu minéral initial.

La phase de production s'effectue avec des graisses de canard comme source de carbone. On ajoute également des lipases selon le ratio établi dans la partie D-II. Une croissance résiduelle est maintenue selon un taux de croissance de l'ordre de  $0.04 \text{ h}^{-1}$  à l'aide d'une alimentation constante en ammoniac. Ce taux de croissance va donc évoluer vers  $0.03 \text{ h}^{-1}$  au fur et à mesure que la concentration en biomasse catalytique va augmenter. Le suivi du coefficient respiratoire et du rapport  $C_{\text{accumulé}}/C_{\text{ajouté}}$  sont de bons indicateurs nous permettant de savoir si la croissance et la production ont bien lieu simultanément (respectivement  $QR = 0.65$  et  $Y_{S,Xt}^{\text{exp}} = 0.7 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ ). Comme précédemment, il est préférable de ne pas accumuler trop de graisses non hydrolysées et d'acides gras libres dans le milieu réactionnel. Malheureusement, aucune méthode de dosage des triglycérides n'a été développée au cours de ces travaux. Il est toutefois possible de connaître la quantité de graisses envoyée dans le bioréacteur par pesée. Afin d'assurer des productivités maximales dans ces conditions, il est nécessaire de maintenir un léger excès d'acides gras libres dans le milieu, c'est pourquoi les concentrations en acides gras et glycérol libres ont été quantifiées par HPLC (voir Matériels & Méthodes).

### III.2 Résultats de la culture G

La Figure 69 présente l'évolution des concentrations en substrats assimilables résiduels (acides gras et glycérol), des lipases ajoutées dans le milieu réactionnel et de la vitesse de production de dioxyde de carbone au cours de la culture.

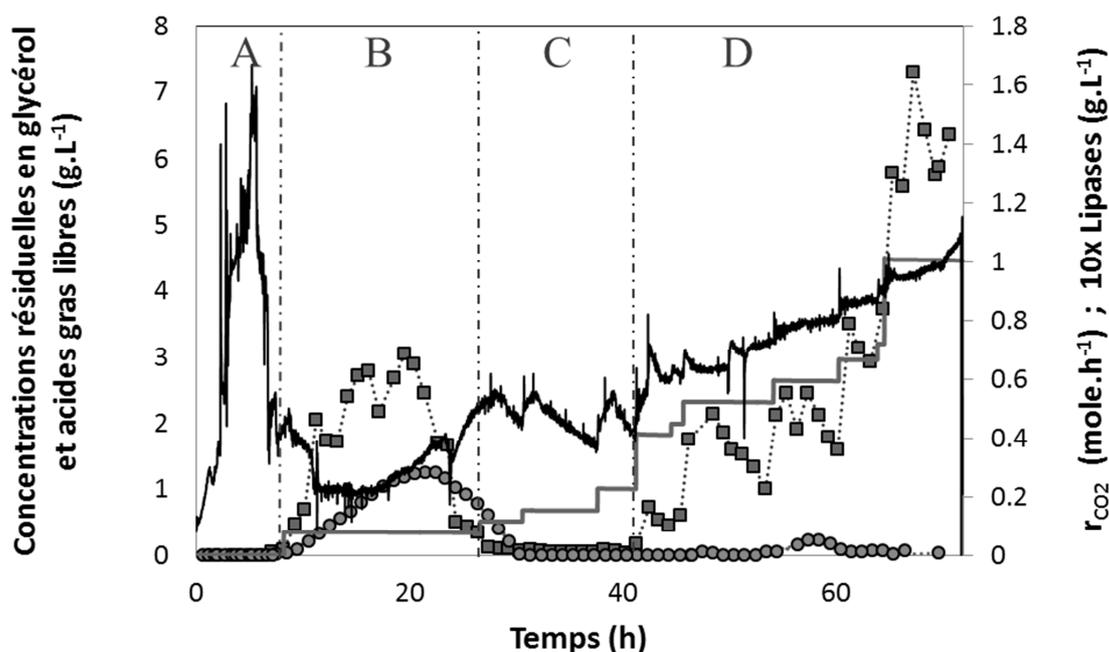


Figure 69 : Evolution des concentrations résiduelles en glycérol (ronds gris) et acides gras (carrés gris), de la concentration en lipase multiplié par 10 (courbe grise) dans le milieu réactionnel, de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> (courbe noire) au cours de la culture

La phase de croissance a duré 6 heures avec un taux de croissance expérimental constant de  $0.58 \text{ h}^{-1}$  sur glucose (phase A). Une fois l'ensemble de l'azote du milieu initial consommé, la phase de production de PHA à partir de graisses de canard peut débuter. Comme expliqué dans la partie précédente, un rapport Enzyme/Substrat minimum de 0.01% est visé. Des lipases sont donc ajoutées jusqu'à atteindre une concentration de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Au cours de la phase notée (B), des acides gras libres et du glycérol sont détectés (entre 3 et  $4 \text{ g.L}^{-1}$ ), ce qui confirme l'efficacité des lipases. Suite à la diminution des concentrations en substrats assimilables vers 23 heures, et malgré un ajout de lipase, la source carbonée s'épuise (phase C). Cela a amené à l'augmentation de l'apport en graisses et du rapport Enzyme/Substrat jusqu'à restaurer un accroissement de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> et l'accumulation d'acides gras libre et glycérol témoignant d'un métabolisme non limité. A partir de 55 heures de culture, en dépit de fortes réductions de l'alimentation en graisses de canard, la concentration en acides gras résiduels continue d'augmenter au fil des ajouts de lipases. Une grande quantité de graisses non hydrolysés s'est donc accumulé dans le milieu réactionnel tout au long de la culture.

## Résultats - Partie D : Production de PHA à partir de graisses de canard : Etude de faisabilité

La Figure 70 présente l'évolution des concentrations en biomasse catalytique (ici calculée à partir de l'azote apporté au milieu au cours de la culture avec un rendement de conversion azote en biomasse catalytique  $\varepsilon_N = 0.21 \text{ mole.Cmole}^{-1}$  considéré constant au cours la culture), PHA, graisses accumulées et du pourcentage d'accumulation en polymère. La concentration en graisses résiduelles a pu être estimée lors du dosage des PHA par GC-FID, car sur les chromatogrammes apparaissent les acides gras à 16 et 18 carbones. Les échantillons, nettoyés des acides gras libres par un lavage à l'isopropanol, ont subi un traitement chimique provoquant l'hydrolyse des polymères, des mono-, di- et triglycérides. Par conséquent, la quantification de ces acides gras à 16 et 18 carbones permet d'approcher la concentration en graisses résiduels.

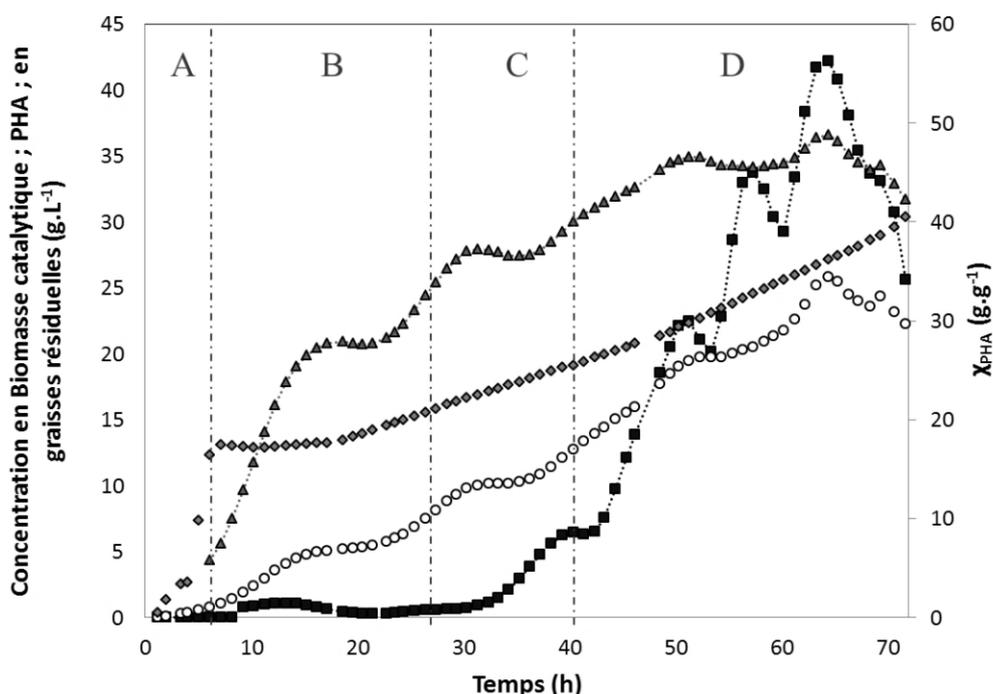


Figure 70 : Evolution des concentrations en biomasse catalytique (losanges gris), PHA (ronds vides), graisses accumulées (carrés noirs) et du pourcentage d'accumulation en PHA (triangles gris) au cours de la culture

Au terme de 72 heures de culture,  $53 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse totale ont été synthétisée et  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de lipases se trouvent dans le milieu de culture. L'accumulation en PHA représente 43.3 % ( $\text{g.g}^{-1}$ ) de la biomasse totale. Environ  $27 \text{ g.L}^{-1}$  de graisses se sont accumulées dans le moût final de culture due au fait que l'hydrolyse des graisses n'est jamais totale, comme vu dans la Figure 66. On a vu, dans la Figure 69 qu'à partir de 40 heures, l'accumulation des acides gras libres signifie que la cinétique d'hydrolyse des graisses est supérieure à la vitesse de consommation de ce substrat par la souche. On peut donc conclure que l'alimentation en graisses de cette culture a été trop importante expliquant la concentration élevée de graisses non consommées dans le milieu en fin de culture.

## Résultats - Partie D : Production de PHA à partir de graisses de canard : Etude de faisabilité

Le bilan carbone a pu être validé aux alentours de 90% malgré les incertitudes de mesures de la concentration de graisses résiduelles. Cette analyse peut nous permettre de situer les performances de cette culture sur graisses de canard par rapport aux cultures précédemment présentées.

La Figure 71 indique l'évolution de la vitesse spécifique de production de PHA au cours de la culture.

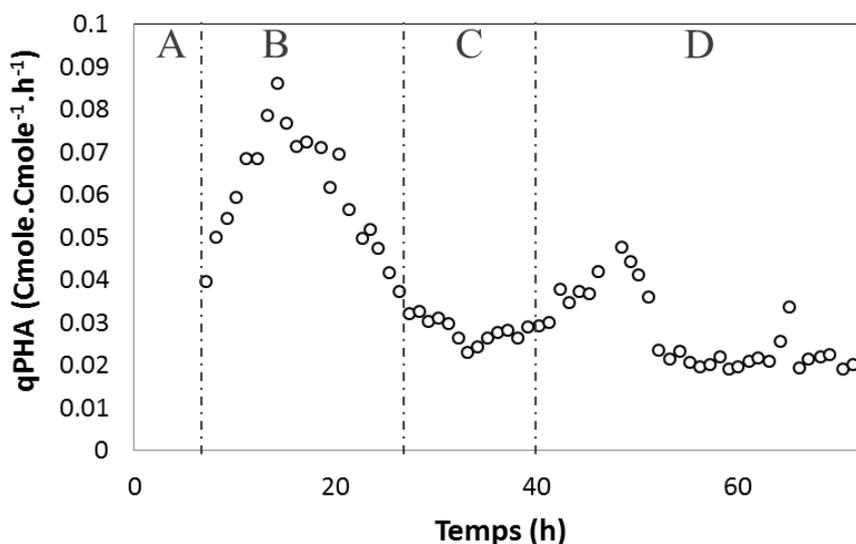


Figure 71 : Vitesse spécifique de production de PHA à partir de graisses de canard au cours de la culture G

La vitesse spécifique de production est basse lors de la phase C car le carbone disponible est limitant. Durant cette phase  $q_{PHA}$  est divisé par 2.6 comparé au  $q_{PHA}^{max}$  (égal à  $0.085 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) obtenu lors de la phase B. Malgré une augmentation entre 40 et 50 heures liée aux nombreux ajouts consécutifs d'enzymes effectués, la vitesse spécifique de production de PHA diminue puis se maintient à  $0.02 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$  jusqu'à la fin de la culture. Si l'on compare ces valeurs de  $q_{PHA}$  par rapport à celles obtenues sur le mélange glycérol – acides gras (partie B-II.3.4) lorsque le taux de croissance résiduel est de  $0.04 \text{ h}^{-1}$ , on se rend compte que les valeurs sur graisses sont supérieures dans la phase B et du même ordre de grandeur dans la phase D.

En ne considérant que le substrat assimilé par la souche, le rendement expérimental de carbone global sur la phase de production de 6 à 35 heures atteint  $0.65 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  soit 93% du rendement expérimental de carbone global obtenu sur acide gras seul à  $30^\circ\text{C}$  (partie A des résultats). Après, celui-ci diminue à  $0.30 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ . Le rendement expérimental de production de PHA est de  $0.43 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  (égal à celui de la partie A) puis diminue jusqu'à  $0.19 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ . Cette altération des rendements après 35 heures pourrait provenir d'une dissipation grandissante d'énergie liée à l'accumulation et au stockage des PHA.

Le profil monomérique des PHA obtenus à partir d'hydrolysats de graisses de canard est présenté dans la Figure 72 où il est comparé à celui de la culture C (culture en co-subsstrats acide gras et glycérol).

## Résultats - Partie D : Production de PHA à partir de graisses de canard : Etude de faisabilité

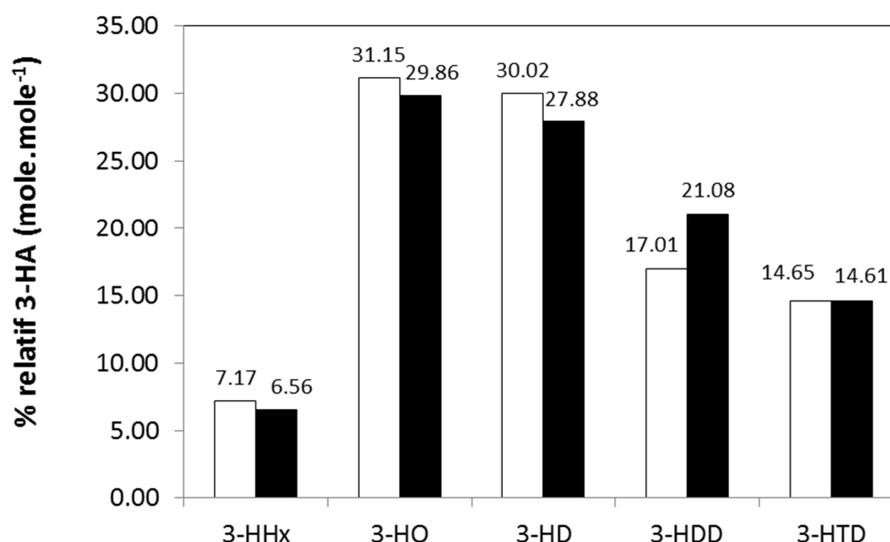


Figure 72 : Profils monomériques au point final de la culture C (colonnes blanches) et de la culture G (colonnes noires)

On constate que les profils sont très proches, même si la part d'acide 3-hydroxydodécanoïque est légèrement supérieur dans la culture G. Ce résultat est en accord avec les conclusions de la partie C.

### III.3 Traitement du moût final

Il a été montré qu'en fin de culture près de 30 g.L<sup>-1</sup> de graisses n'avaient pas été consommées et se trouvent encore dans le moût de fermentation final. Ce moût a été placé dans une chambre à 0°C afin de faciliter la séparation de la phase lipidique et du milieu aqueux, dans le but d'éliminer cette phase lipidique par flottation. De manière inattendue, le moût reste homogène et adopte un comportement viscoélastique rendant son traitement particulièrement délicat.

Dans le but d'extraire et d'analyser les polymères produits, une partie du moût a été remis en culture dans du milieu minéral sans azote en fiole erlenmeyer avec une quantité arbitraire mais importante de lipases, afin de « nettoyer » le moût de fermentation des graisses résiduelles sans consommer les PHA déjà formés. Une fois l'échantillon « dégraissé », il est possible d'effectuer l'extraction des PHA permettant l'obtention d'une pâte collante et visqueuse caractéristiques des polymères obtenus par le catabolisme des acides gras au cours de cette thèse. La masse molaire moyenne en poids et l'indice de polydispersité de ce produit sont respectivement égaux à 68 kDa et 2.12, ce qui en fait les polymères les plus courts en moyenne obtenus lors de ces travaux (voir partie C).

Une meilleure gestion de l'alimentation en graisses aurait permis de ne pas accumuler trop de substrats non hydrolysés dans le milieu. Il est également impératif que l'ensemble des graisses apportées au réacteur soient totalement consommées en fin de culture afin de pouvoir extraire et purifier le produit efficacement.

## **IV. Discussion**

Une possible valorisation des déchets agricoles tels que les graisses de canard a été étudiée au travers de ces travaux de thèse et de cette dernière culture. La preuve d'une possible utilisation de cette ressource carbonée pour la production de polyhydroxyalcanoates avec la souche *P. putida* KT2440 en culture Fed-batch a été faite. Afin d'effectuer cette étude de faisabilité, une culture couplant hydrolyse enzymatique des graisses animales et fermentation a permis la synthèse de polyhydroxyalcanoates à moyenne chaînes latérales. En dépit de la réussite de cette culture, de nombreux points peuvent encore être optimisés.

En premier lieu, il n'est pas certain que le couplage dans le même réacteur de l'étape de traitement du substrat brut et de la culture soit si judicieux. En effet, du fait du haut point de fusion de l'hydrolysate de graisses de canard (mélange de 33% des acides gras saturés et 67% d'insaturés) autour de 40°C (Inoue et al. 2004), il pourrait être intéressant d'effectuer l'hydrolyse enzymatique à une température de 45°C où l'activité des lipases OF de Meito Sangyo est très proche de celle à 30°C (résultats du CRITT Bio-industries non présentés dans ce document) et où l'ensemble de l'hydrolysate resterait à l'état liquide. Sous agitation, le mélange obtenu devrait rester relativement homogène et pourrait servir à alimenter le bioréacteur de culture grâce à une pompe. L'ensemble de la tuyauterie d'alimentation devra être calorifugé afin que le refroidissement de cet hydrolysate ne s'effectue qu'au contact du milieu réactionnel (30°C) dans le réacteur. De cette manière, l'alimentation du bioréacteur en hydrolysate sera mieux contrôlée ce qui limitera l'accumulation des graisses dans le milieu réactionnel. Via une telle stratégie, le volume de milieu minéral initial du réacteur de culture devra prendre en compte le volume d'eau nécessaire à l'étape d'hydrolyse des graisses qui sera amené lors de l'alimentation en substrats carbonés hydrolysés, ce qui n'était pas le cas dans la culture G. Les lipases pourront être envoyées dans le bioréacteur avec les hydrolysats puisqu'il a été montré que la souche ne les dégradait en conditions de limitation et carence azote.

On a vu que l'inconvénient des graisses animales est le pourcentage élevé d'acides gras saturés dans leur composition, ce qui rend leur point de fusion élevé. L'utilisation d'un autre type de substrats gras à valoriser et dont le gisement est également important comme les huiles végétales, riches en acides gras insaturés et dont le point de fusion de l'hydrolysate est proche de 30°C, pourrait également être une alternative. L'hydrolysate pourrait alimenter aisément le bioréacteur de production. De plus, comme il a été prouvé que le profil monomérique des PHA, obtenue par le catabolisme des acides gras, est globalement constant (voir partie C), la nature du substrat brut à valoriser peut donc évoluer sans que la composition du produit ne change (excepté le taux de monomères insaturés qui lui augmenterait avec l'utilisation d'huiles végétales). Seule la température du traitement enzymatique du substrat brut sera à modifier en fonction de la composition en acide gras de celui-ci et donc du point de fusion du mélange.

Il est également primordial de parvenir à consommer l'intégralité des substrats résiduels en fin de culture pour que le traitement du moût soit facile à effectuer.

## V. Synthèse des résultats

- Cette étude a prouvé la faisabilité de la production de PHA à partir de graisses de canard
- *P. putida* KT2440 ne sécrète pas de lipases, il est donc nécessaire de traiter le substrat brut par une hydrolyse enzymatique par des enzymes commerciales
- Le couplage de l'hydrolyse enzymatique du substrat brut et de la production de PHA fonctionne mais montre certaines limites ne rendant pas cette solution très efficace. L'alimentation du bioréacteur en graisses par rapport à la vitesse d'hydrolyse des lipases est difficile à piloter.
- Les cinétiques de production et rendements de culture obtenus à partir de graisses sont comparables aux performances obtenues sur acides gras seuls à 30°C sur la première moitié de la culture ( $Y_{S,xt}^{exp} = 0.65 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  dont  $Y_{S,PHA}^{exp} = 0.43 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  et  $q_{PHA}^{max} = 0.085 \text{ Cmole.Cmole}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
- L'accumulation de graisses résiduelles dans le milieu réactionnel rend l'extraction des polymères finaux très délicate. Il est donc primordial de bien gérer l'alimentation en substrat et de s'assurer de la consommation totale des graisses en fin de culture.
- Le profil monomérique des PHA obtenu à partir des graisses de canard est similaire à ceux des autres cultures sur acides gras présentés dans la partie C, mais le polymère a une masse molaire moyenne en poids plus faible (68 kDa).
- L'utilisation de substrats bruts gras à haute teneur en acides gras insaturés, dont le point de fusion est bas, peut faciliter le procédé global de production de PHA (exemple des huiles végétales)
- Le traitement enzymatique des substrats bruts doit être effectué en amont de la culture à une température de travail supérieure au point de fusion du mélange d'acides gras. L'alimentation calorifugée de l'hydrolysate du substrat brut au bioréacteur de production permet une conduite plus précise et efficace de la culture

# CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le contexte de recherche d'indépendance de l'industrie de transformation vis-à-vis des matières d'origine fossile et les matières bioplastiques, bio-sourcées et biodégradables, se positionnent de plus en plus sur le marché. Devant l'essor de ces matériaux, la société Végéplast SAS, expert de leur production, formulation et valorisation, a lancé un projet de recherche et développement visant à mettre au point un procédé optimisé de production, par voie microbienne, de polyhydroxyalcanoates originaux différents des PHB et PHB-co-PHV déjà disponibles. Dans cette optique, une association avec les coopératives du Sud-ouest français a été mise en place afin d'accéder à des substrats de production peu coûteux et renouvelables et plus particulièrement les graisses de canard. Ce choix est porté par le fait que sur le coût de production d'un bioprocédé, environ 50% proviennent de l'approvisionnement en substrat.

Les objectifs de ces travaux étaient d'identifier une souche d'intérêt productrice de PHA, de comprendre et de quantifier les mécanismes métaboliques majeurs susceptibles de contrôler l'accumulation et la nature des bio-polymères sur des substrats simples, modèles (acides gras et glycérol) dans un premier temps, puis sur substrat industriel de type lipidique. Cette démarche devrait fournir les bases d'une approche rationnelle de définition des points de fonctionnement d'un procédé de production de PHA performant.

Grâce à une étude bibliographique et quelques tests expérimentaux, la souche *P. putida* KT2440 a rapidement été retenue pour sa capacité à synthétiser des PHA à moyennes chaînes latérales, ce qui confèrent des propriétés élastomériques très intéressantes aux polymères. Le stockage de ces PHA par la cellule se fait en condition de croissance limitée par un élément nutritionnel. La littérature suggère que la limitation phosphore est la plus performante, toutefois, la composition élémentaire en cet élément pouvant être très variables en conditions limitante, son usage rend moins précis la maîtrise du degré de limitation des potentialités anaboliques, clé de la redistribution du carbone vers la production. Cette variation de composition élémentaire de la biomasse étant nettement réduite pour l'azote, cet élément a été retenu pour le contrôle des cultures et l'ensemble de ces travaux.

Il a été démontré au cours de ces travaux qu'une conduite de culture couplant production de PHA et croissance résiduelle simultanément à partir d'acides gras permet d'obtenir des rendements expérimentaux de carbone globaux ( $Y_{S,Xt}^{exp}$ ) atteignant  $0.7 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$ . L'obtention d'un rendement aussi élevé est due à l'incorporation, pour satisfaire les demandes anaboliques, d'une fraction du carbone (acétyl-CoA) et de l'énergie provenant par la ré-oxydation du pouvoir réducteur (NADH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>) générés par le catabolisme partiel des acides gras avant leur conversion en PHA. Il est surprenant de constater que cette proportion d'utilisation est d'autant plus importante que le taux de croissance est élevé (variation de 7.4 à 24.3% pour le carbone, de 11.8 à 38.9% pour l'énergie lorsque  $\mu$  passe de 0.017 et 0.039 h<sup>-1</sup>). Ceci suggère qu'il existe des mécanismes énergivores, probablement liés au stockage et à l'accumulation des PHA au sein de la cellule, pour utiliser l'excédent énergétique libéré par la beta oxydation partielle du substrat.

## Conclusion générale

L'ensemble des cultures ont donc été pilotées en couplant croissance et production de PHA quel que soit le substrat utilisé et avec des alimentations en sources carbonées maîtrisées afin d'atteindre les cinétiques maximales de la souche à chaque instant sans accumuler de large excès pouvant, dans le cas des acides gras, engendrer des problèmes rhéologiques et de transferts. La définition des corrélations entre la vitesse spécifique de production de PHA et le taux de croissance a permis de déterminer les points de fonctionnements idéaux du procédé de production de PHA à partir d'acides gras, de glycérol et d'un mélange des deux dans les proportions stoechiométriques correspondant aux graisses de canard.

La culture sur glycérol seul a montré qu'il est nécessaire d'apporter initialement un co-substrat carboné pour amorcer la croissance sans quoi une longue phase de latence vient augmenter significativement le temps de séjour dans le réacteur. A partir de ce substrat, les PHA sont synthétisés à partir d'acyl-CoA issus de la voie de biosynthèse des acides gras. Il est possible d'optimiser la vitesse spécifique de production et le potentiel d'accumulation maximal  $\chi_{PHA}^{lim}$  de la souche à des taux de croissance voisin de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ . On a également pu noter que la demande énergétique liée à la production de PHA à partir de glycérol est plus importante qu'à partir d'acides gras et donc altère les rendements.

Lorsque les PHA sont synthétisés via le catabolisme des acides gras, il est impossible d'optimiser à la fois la vitesse spécifique de production, les rendements et le potentiel maximal d'accumulation de polymère. Il est donc nécessaire de trouver un compromis. A partir de nos résultats, il peut être imaginé une production en deux phases. Une première phase serait menée à des taux de croissance de l'ordre de  $0.15 \text{ h}^{-1}$  où les vitesses spécifiques de production de PHA sont maximales (autour de  $0.1 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) avec un apport en acides gras suffisant pour satisfaire à la fois la demande anabolique et le potentiel maximal de production de polymères. Puis, une seconde phase, à des taux de croissance résiduels très bas (inférieur à  $0.05 \text{ h}^{-1}$ ), servirait à optimiser le pourcentage d'accumulation de PHA au sein des cellules dont le maximum pouvant être atteint avec cette souche se trouve entre 55 et 60% ( $\text{g.g}^{-1}$ ).

La culture sur acides gras à  $37^\circ\text{C}$  a permis d'établir que les cinétiques d'assimilation des acides gras par la souche ne sont pas limitées par la diffusion du substrat insoluble et qu'à cette température certaines activités enzymatiques impliquées dans la production de polymères sont altérées ce qui entraîne des résultats moins performants qu'à  $30^\circ\text{C}$  en terme de vitesses spécifiques maximales de production de PHA, de rendements et d'accumulation de PHA au sein de la cellule.

Il a été également démontré que les acides gras et le glycérol peuvent être co-consommés et engendre une synergie catabolique permettant d'améliorer les vitesses spécifiques d'assimilation des substrats et de production de PHA par rapport aux cultures sur substrats uniques. Sur la base du modèle métabolique construit pour la description de la croissance et la production de PHA et paramétré à partir des résultats expérimentaux obtenus sur substrat purs, il semblerait que le glycérol est principalement utilisé pour la génération de coenzymes réduits via la voie des pentoses phosphates et non comme source carbonée pour la synthèse de biomasse catalytique. La demande en carbone de l'anabolisme est donc satisfaite par, du moins en partie, des carbones acides gras n'ayant pas été convertis en PHA.

## Conclusion générale

A partir de glycérol ou d'acides gras, une alimentation trop forte en carbone par rapport aux potentiels de synthèse de PHA et de la biomasse catalytique, au moment de la transition entre la phase de croissance et de production, provoque un « overflow » entraînant une fuite de carbone vers la production d'intermédiaires organiques acides, on pourrait les préciser, pouvant altérer le rendement global de carbone de la culture. Ce résultat argumente pour une conduite de culture avec une alimentation en substrat carboné parfaitement maîtrisée non limitante et non excessive pour optimiser le bioprocédé.

Une ultime culture a permis de prouver la faisabilité de la production de PHA à partir du substrat industriel, les graisses de canard. La souche *P. putida* KT2440 ne possédant pas la capacité d'hydrolyser les triglycérides, il a été mis au point, en partenariat avec le CRITT Bio-industrie de Toulouse, les conditions d'un prétraitement de ces substrats par traitement enzymatique. Les hydrolysats ne pouvant être maintenus sous forme d'émulsion stable, la culture associera l'hydrolyse des graisses par des lipases commerciales libres et la production de PHA. De cette étude il en résulte qu'en termes de conduite de procédé, il est nécessaire non seulement de piloter l'apport de substrat afin de satisfaire à une concentration non limitante pour la réaction enzymatique mais également piloter l'apport en lipases afin d'assurer une cinétique d'hydrolyse non limitante pour la dynamique de production. Il est intéressant de noter que les cinétiques de production de PHA et rendements de culture, obtenus à partir de graisses, sont comparables aux performances obtenues sur acides gras seuls à 30°C ( $Y_{S,Xt}^{exp} = 0.65 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  dont  $Y_{S,PHA}^{exp} = 0.43 \text{ Cmole.Cmole}^{-1}$  et  $q_{PHA}^{max} = 0.085 \text{ Cmole.Cmole}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) (voir partie A des résultats).

Si, d'un point de vue métabolique la faisabilité d'utiliser les graisses de canard a été démontrée, en particulier dans l'assimilation simultanée des différents composants avec les performances attendues ce qui élimine la possibilité de présence de composés inhibiteurs, la conduite d'un procédé robuste associant production et hydrolyse enzymatique ne semble pas réaliste. Il devra être envisagé la possibilité d'une hydrolyse préalable avec maintien de l'hydrolysat sous forme liquide n'excluant pas l'enrichissement en huiles végétales si elles n'altèrent pas les caractéristiques physiques des PHA accumulés.

L'obtention de quantités suffisantes de PHA purifiés à partir des différents moûts produits au cours de ces travaux de thèse a permis l'identification d'un certain nombre de corrélations entre les conditions de production et les propriétés des polymères finaux. Il a été observé que le profil monomérique des PHA est dépendant du substrat et de la voie métabolique empruntée pour la synthèse des polymères. Via la  $\beta$ -oxydation, la spécificité de la PHA synthase paraît déterminer le profil monomérique des PHA constitué de résidus avec des chaînes carbonées uniformément distribuées entre 6 et 14 carbones. Sur glycérol, avec les précurseurs issus de la voie de biosynthèse des acides gras, ce serait la spécificité de la R-3-hydroxyacyl-(ACP-CoA) transférase, responsable du remplacement du groupement ACP par un coenzyme A, qui déterminerait la distribution en monomères, distribution faiblement dispersée et centrée sur l'acide 3-hydroxydécanoïque.

Les masses molaires moyennes en poids, l'indice de polydispersité, les températures de transition vitreuses et de fusion sont les propriétés physiques des PHA produits qui ont été recherchées et investiguées lors de ces travaux. Parmi l'ensemble de ces données, l'enthalpie de fusion, caractérisant le degré de cristallinité des polymères, est la seule propriété physique vraiment

## Conclusion générale

concluante. Les polymères obtenus par la voie de biosynthèse des acides gras comportent des zones cristallines contrairement aux PHA produits à partir d'acides gras, qui sont totalement amorphes à température ambiante. Il semblerait que le degré de cristallinité du polymère soit dépendant du degré d'insaturation des monomères composant le PHA et de la nature de ce profil monomérique.

En dépit de la compréhension de certaines corrélations entre les caractéristiques de culture et les propriétés des polymères que l'on peut obtenir au final, les mécanismes contrôlant la masse molaire des polymères synthétisés restent encore très incompris et mériteraient d'être investiguée plus profondément dans le but d'éventuellement identifier certaines protéines, gènes impliqués et qui pourraient être optimisés par de l'ingénierie métabolique homologue.

L'aspect des PHA extraits du moût de culture sur glycérol est un film élastique non collant très intéressant pour une application industrielle. A l'inverse, les polymères d'origines acides gras ont l'aspect d'une pâte collante non maniable. Des essais de formulation entre ces deux types de moûts ont permis de mettre en lumière le fait que l'aspect physique du polymère est dépendant de son degré de cristallinité. Il a été établi que tous les formulations comportant au moins 50% de PHA synthétisés à partir de glycérol ont l'aspect d'un film.

La production de PHA à partir de graisses, comme établi sur un mélange acide gras-glycérol conduit à des PHA dont le profil monomérique correspond à celui des polymères ayant pour précurseurs les intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation. Si les propriétés mécaniques d'un tel produit ne permettent pas son utilisation directe, une formulation reste toujours possible afin d'obtenir un composé d'intérêt. Toutefois, cette étape de formulation devra s'opérer avant extraction et purification et suppose que l'unité de production ait un atelier de production de PHA, avec la même souche ou autre, pour la production de PHA courtes chaînes ... On peut également imaginer, si l'on occulte l'optimisation des rendements et des productivités, une culture unique avec des alimentations séquentielles et alternées d'acides gras et de glycérol. Cette stratégie serait à mettre en place afin que la part de PHA produits à partir de glycérol soit suffisamment conséquente pour que le polymère final puisse avoir les caractéristiques nécessaires à l'obtention d'un film.

L'ensemble des conclusions apportées par ces travaux de doctorat permettent une meilleure compréhension des mécanismes impliqués, pour *P. putida*, dans la synthèse de PHA au travers de deux voies métaboliques différentes (catabolisme et voie de biosynthèse des acides gras), des corrélations entre les caractéristiques du produit final et les conditions dans lesquels il a été obtenu. Partant de ces conclusions, il est désormais possible d'évaluer les contraintes pour le dimensionnement d'un réacteur de bio-production de MCL-PHA. De plus ces connaissances métaboliques et dynamiques ont apporté un éclairage sur les caractéristiques physiques du produit final et, ainsi, proposer les limites de l'utilisation des graisses de canard pour la formulation d'un PHA présentant un intérêt industriel.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, H., Ishii, N., Sato, S., & Tsuge, T. (2012).** "Thermal properties and crystallization behaviors of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate)s". *Polymer*, 53(14), 3026–3034
- Agnew, D. E., & Pfleger, B. F. (2013).** "Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources". *Chemical Engineering Science*, 103, 58–67.
- Annuar, M. S. M., Tan, I. K. P., Ibrahim, S., & Ramachandran, K. B. (2007).** "Production of Medium-Chain-Length Poly(3-hydroxyalkanoates) from Crude Fatty Acids Mixture by *P. putida*". *Food and Bioproducts Processing*, 85(2), 104–119.
- Aragão, G. M. F. (1996).** "Production de poly- $\beta$ -hydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus* : caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures". Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, soutenu le 2 Décembre 1996.
- Ashby, T., Solaiman, D. K. Y. & Foglia, R. D. (1998).** "Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates". *Biomacromolecules*, 431–437.
- Babel, W., J. U. Ackermann & U. Breuer (2001)** "Physiology, regulation, and limits of the synthesis of poly(3HB)", *Adv Biochem Eng Biotechnol* 71 125-57.
- Ballard, D. G. H. & P. J. Senior (1987)** "Formation of polymers of  $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparison of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state", D. reidel Publishing Company,
- Baptist, J. N.** "Process for preparing Poly- $\beta$ -hydroxy-butyric acid". (1962). US Patent 3044942.
- Bewa, H.** "Note de synthèse I: Biodégradabilité et matériaux polymères biodégradables." ADEME (2005), consulté le 21-07-2016, sur [http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/23224\\_biodeg.pdf](http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/23224_biodeg.pdf)
- Blank, L. M., Ionidis, G., Ebert, B. E., Bühler, B., & Schmid, A. (2008).** "Metabolic response of *P. putida* during redox biocatalysis in the presence of a second octanol phase". *The FEBS journal*, 275(20), 5173–90.
- Brandl, H., Gross, R. a, Lenz, R. W., & Fuller, R. C. (1988).** "*Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters". *Applied and environmental microbiology*, 54(8), 1977–82.
- Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., & Marchessault, R. H. (1994).** "A Method for the Isolation of Microorganisms Producing Extracellular Long-Side-Chain Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) Depolymerase"; *Journal of Environmental Polymer Degradation*. Vol. 2, No. I.
- Byrom, D.(1987).**"Polymer synthesis by micro-organisms: technology and economics". *Tibtech* Vol.5.
- Cescut, J. (2009).** "Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique : physiologie et performances de procédés". Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, soutenu le 31Mars 2009.

- Chan Sin, M., Gan, S. N., Mohd Annuar, M. S., & Ping Tan, I. K. (2010).** "Thermodegradation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *P. putida* from oleic acid". *Polymer Degradation and Stability*, 95(12), 2334–2342.
- Chavarría, M., Kleijn, R. J., Sauer, U., Pflüger-grau, K., & Lorenzo, V. De. (2012).** "Regulatory Tasks of the Phosphoenolpyruvate-Phosphotransferase System of *P. putida* in Central Carbon Metabolism". *mBio*. (3)2
- Chen, G. Q. (2010),** "Industrial production of PHA," dans "Plastics from Bacteria: natural functions and applications," Microbiology Monographs, G. Q. Chen, 14.
- Chen, Y.-J., Huang, Y.-C., & Lee, C.-Y. (2014).** "Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7". *Journal of bioscience and bioengineering*, 118(2), 145–52.
- Choi, J. et S. Y. Lee (1999a)** "Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation", *Applied Microbiology And Biotechnology* 51 (1), 13-21.
- Cromwick, A. M., Foglia, T., Lenzhe, R. W. (1996).** "The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5-6), 464–469.
- David R. Lide. (2008).** CRC Handbook of Chemistry and Physics. *CRC Press/Taylor and Francis*, Edition 89.
- Davis, R., Duane, G., Kenny, S. T., Cerrone, F., Guzik, M. W., Babu, R. P., Casey, E., O'Connor, K. E. (2015).** "High cell density cultivation of *P. putida* KT2440 using glucose without the need for oxygen enriched air supply". *Biotechnology and bioengineering*, 112(4), 725–33.
- De Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Morales, V., Dinjaski, N., Galán, B., García, J. L., & Prieto, M. a. (2010).** "The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *P. putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance". *Environmental microbiology*, 12(1), 207–21.
- De Koning, G. J. M., Kellerhals, M., van Meurs, C., & Witholt, B. (1997).** "A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonads Part 2: Process development and economic evaluation". *Bioprocess Engineering*, 17(1), 15.
- Dirusso, C. C., & Black, P. N. (2004).** "Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system". *The Journal of biological chemistry*, 279(48), 49563–6.
- Doi, Y., A. Segawa, Y. Kawaguchi et M. Kunioka (1990)** "Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*", *FEMS Microbiol Lett* 55 (1-2), 165-9.
- Du, G., J. Chen, H. Yin, H. Gao et S. Lun (2000)** "Effects of nitrogen feeding on the accumulation of polybeta- hydroxybutyrate with *Alcaligenes eutrophus*", *Wei Sheng Wu Xue Bao* 40 (3), 290-5.
- Dunn, I. J. (1968).** "An interfacial Kinetics model for hydrocarbon oxidation" *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. X.

**Ebert, B. E., Kurth, F., Grund, M., Blank, L. M., & Schmid, A. (2011).** "Response of *P. putida* KT2440 to increased NADH and ATP demand". *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6597–605.

**Eggink, G., Dewaard, P., & Huijberts, G. N. M. (1992).** "The Role Of Fatty-Acid Biosynthesis And Degradation In The Supply Of Substrates For Poly(3-Hydroxyalkanoate) Formation In *P. putida*". *Fems Microbiology Letters*, 103(2-4), 159–163.

**Egli, T., & Fiechter, A. (1981).** "Theoretical Analysis of Media Used in the Growth of Yeasts on Methanol". *Journal of General microbiology*, 123: 365–369.

**Elbahloul, Y., & Steinbüchel, A. (2009).** "Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *P. putida* GPO1 and a simplified downstream process". *Applied and environmental microbiology*, 75(3), 643–51.

**Escapa, I. F., García, J. L., Buhler, B., Blank, L. M., & Prieto, M. A. (2012).** "The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *P. putida*". *Environmental Microbiology*, 14(4), 1049–1063.

**Escapa, I. F., del Cerro, C., García, J. L., & Prieto, M. A. (2013).** "The role of GlpR repressor in *P. putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol". *Environmental microbiology*, 15(1), 93–110.

**European Bioplastics et University of Applied Sciences and Arts Hanover. (2016).** "Driving the evolution of plastics", consulté le 21-07-2016, sur [http://docs.european-bioplastics.org/2016/association/EUBP\\_image\\_brochure.pdf](http://docs.european-bioplastics.org/2016/association/EUBP_image_brochure.pdf)

**Fernández, D., Rodríguez, E., Bassas, M., Viñas, M., Solanas, a. M., Llorens, J., Marques, A.M., Manresa, A. (2005).** "Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions". *Biochemical Engineering Journal*, 26(2-3), 159–167.

**Fiorese, M. L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, A. M., de Aragao, G. M. F., Reis, M. A. M. (2009).** "Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate". *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 454–461.

**Fuhrer, T., Fischer, E., & Sauer, U. (2005).** "Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species", *Journal of bacteriology*. 187(5), 1581–1590.

**Fulco, A. J. (1983).** "Fatty Acid". *Prog. Lipid Res.* VoL 22, pp. 133-160

**Gaudin, P. (1998)** "Contribution de la synthèse de poly-β-hydroxybutyrate (PHB) à la croissance de *Ralstonia eutropha*", Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, soutenu le 18 mai 1998.

**Glasgow, J. F. T., Y, B. M., Moore, R., Gray, A., & Hill, J. (1999).** "The mechanism of inhibition of L-oxidation by aspirin metabolites in skin fibroblasts from Reye's syndrome patients and controls", *Biochimica et Biophysica Acta*. 1454, 115–125.

**Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., & Rehm, B. H. A. (2009).** "Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as

Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications". *Biomacromolecules*, 10(4), 660–669.

**Green, P. R., Kemper, J., Schechtman, L., Guo, L., Satkowski, M., Fiedler, S., Steinbüchel, A., Rehm, B. H. A. (2002).** "Formation of Short Chain Length / Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Copolymers by Fatty Acid -Oxidation Inhibited *Ralstonia eutropha*". *Biomacromolecules*. 3, 208–213.

**Grousseau, E, Blanchet, E., Deleris, S., Albuquerque, M. G. E., Paul, E., & Uribe Larrea, J. L. (2013).** Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 148, 30–38.

**Grousseau, E. (2012).** "Potentialités de production de Poly-Hydroxy-Alcanoates chez *Cupriavidus necator* sur substrats de type acides gras volatils : études cinétiques et métaboliques". Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, soutenu le 24 Février 2012.

**Haba, E., Vidal-Mas, J., Bassas, M., Espuny, M. J., Llorens, J., & Manresa, A. (2007).** "Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition". *Biochemical Engineering Journal*, 35(2), 99–106.

**Hartmann, R., Hany, R., Witholt, B., Zinn, M. (2010).** "Simultaneous Biosynthesis of Two Copolymers in *P. putida* GPo1 Using a Two-Stage Continuous Culture System". *Biomacromolecules*, 11:1488–1493.

**Haywood, G. W., Anderson, A. J., Ewing, D. F., & Dawes, E. A. (1990).** "Accumulation of a Polyhydroxyalkanoate Containing Primarily 3-Hydroxydecanoate from Simple Carbohydrate Substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135". *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), 3354–3359.

**Haywood, G. W., Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1989).** "The importance of Phb-Synthase substrate-specificity in Polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*". *FEMS Microbiology Letters*. 57: 1-6.

**Heijnen, J. J., Van Scheltinga, A. H. T., & Straathof, A. J. (1992).** "Fundamental bottlenecks in the application of continuous bioprocesses". *Journal of Biotechnology*. 22, 3–20.

**Heinrich, D., Madkour, M. H., Al-Ghamdi, M. a, Shabbaj, I. I., & Steinbüchel, A. (2012).** "Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite". *AMB Express*, 2(1): 59.

**Heinze, E., & Lafferty, R. M. (1980).** "A kinetic model for growth and synthesis of Polyhydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16". *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16, 8–16.

**Hoffmann, N., Amara, A. A, Beermann, B. B., Qi, Q., Hinz, H.-J., & Rehm, B. H. A. (2002).** "Biochemical characterization of the *P. putida* 3-hydroxyacyl ACP:CoA transacylase, which diverts intermediates of fatty acid de novo biosynthesis". *The Journal of biological chemistry*, 277(45), 42926–36.

**Hoffmann, N., & Rehm, B. H. A. (2005).** "Nitrogen-dependent regulation of medium-chain length polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes in pseudomonads". *Biotechnology letters*, 27(4), 279–82.

**Holmes, M. (1985).** "Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic", *Phys. Technol.* Vol 16.

**Hori, K., Sogal, K., & Do, Y. (1994).** "Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *P. putida* from octanoate". *Biotechnology Letters*. 16(7), 709–714.

**Huijberts, G N M, & Eggink, G. (1996).** "Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *P. putida* KT2442 in continuous cultures". *Applied Microbiology And Biotechnology*, 46(3), 233–239.

**Huijberts, G. N., Eggink, G., de Waard, P., Huisman, G. W., & Witholt, B. (1992).** "*P. putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers". *Applied and environmental microbiology*, 58(2), 536–44.

**Huijberts, Gern N M, Wal, H. Van Der, Wilkinson, C., & Eggink, G. (1994).** "Gas chromatographic analysis of Poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria". *Biotechnology Techniques*, 8(3), 187–192.

**Huisman, G. W., De Leeuw, O., Eggink, G., & Witholt, B. (1989).** "Synthesis of Poly-3-Hydroxyalkanoates Is a Common Feature of Fluorescent Pseudomonads". *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1949–1954.

**Huisman, G. W., Wonink, E., Koning, G. De, Preusting, H., & Witholt, B. (1992).** "Synthesis of poly ( 3-hydroxyalkanoates ) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38: 1–5.

**Humphrey, A. E., & Erickson, L. E. (1972).** "Kinetics of Growth on Aqueous - Oil and Aqueous - Solid Dispersed Systems". *J. appl. Chem. Biotechnol.*, 4: 125–147.

**Ibrahim, M. H. a, & Steinbüchel, A. (2009).** "Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction". *Applied and environmental microbiology*, 75(19), 6222–31.

**Inoue, T., Hisatsugu, Y., Ishikawa, R., & Suzuki, M. (2004).** "Solid – liquid phase behavior of binary fatty acid mixtures 2 . Mixtures of oleic acid with lauric acid , myristic acid , and palmitic acid". *Chemistry and Physics of lipids*. 127, 161–173.

**Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S., & Wang, S. S. (2008).** "Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)". *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15–27.

**Jendrossek, D. (2009).** Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal Of Bacteriology*, 191(10), 3195–3202.

**Jendrossek, D, & Handrick, R. (2002).** "Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates". *Annual Review Of Microbiology*, 56, 403–432.

**Jendrossek, Dieter, & Pfeiffer, D. (2014).** "New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)". *Environmental microbiology*, 16(8), 2357–73.

**Jiang, X., Ramsay, J. A., & Ramsay, B. A. (2006).** "Acetone extraction of mcl-PHA from *P. putida* KT2440". *Journal of microbiological methods*, 67(2), 212–9.

**Jung, K., Hazenberg, W., Prieto, M., & Witholt, B. (2001).** "Two-stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates)". *Biotechnology and bioengineering*, 72(1), 19–24.

**Kellerhals, M. B., Kessler, B., Witholt, B., Tchouboukov, A., & Brandl, H. (2000).** "Renewable long-chain fatty acids for production of biodegradable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) at laboratory and pilot plant scales". *Macromolecules*, 33(13), 4690–4698.

**Kessler, B., & Witholt, B. (2001).** "Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism". *Journal of Biotechnology*, 86(2), 97–104.

**Kim, Guk Jin, In Young Lee, Dae Keon Choi, Sung Chul Yoon, & Young Hoon Park . (1997).** "High cell density cultivation of *P. putida* BM01 using glucose" *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3, 221-224

**Kim, I. S., Shim, J. H., & Suh, Y. T. (2014).** "Changes in Membrane Fluidity and Fatty Acid Composition of *P. putida* CN T19 in Response to Toluene". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66:9, 1945-1950

**Koller, M., Salerno, A., Dias, M., & Reiterer, A. (2010).** "Modern Biotechnological Polymer Synthesis : A Review". *Food Technol. Biotechnol.* , 48(3), 255–269.

**Koller, M., Gasser, I., Schmid, F., & Berg, G. (2011).** "Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms". *Engineering in Life Sciences*, 11(3), 222–237.

**Koller, M., Niebelschütz, H., & Braunegg, G. (2013).** "Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass". *Engineering in Life Sciences*, 13(6), 549–562.

**Kunasundari, B. & Sudesh, K. (2011).** "Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates". *Express Polymer Letters*, 5(7), 620–634.

**Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., & Witholt, B. (1988).** "Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates". *Applied and environmental microbiology*, 54(12), 2924–32.

**Latour, X., & Lemanceau, P. (1998).** "Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes à oxydase positive". *Agronomie*. 17, 427-443.

**In Young Lee, Soo Wan Nam, Eun Soo Choi, Ho Nam Chang, & Young Hoon Park (1993).** "Production of Poly-Beta-Hydroxybutyrate and measurement of related enzyme-activities in *Alcaligenes eutrophus*". *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 5, 416-418

- Lee, S Y, Wong, H. H., Choi, J. I., Lee, S. H., Lee, S. C., & Han, C. S. (2000).** "Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *P. putida* under phosphorus limitation". *Biotechnology And Bioengineering*, 68(4), 466–470.
- Lee, S. H., Lee, S. Y., & Park, B. C.(2005).** "Cell Surface Display of Lipase in *P. putida* KT2442 Using OprF as an Anchoring Motif and Its Biocatalytic Applications". *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8581–8586.
- Lee, S. Y. (1996).** "Bacterial Polyhydroxyalkanoates". *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1-14
- Lee, Seoung Yong, & Rhee, J. S. (1994).** "Hydrolysis of Triglyceride by the Whole Cell of *P. putida* 3SK in Two-Phase Batch and Continuous Reactor Systems", *Enzyme Microb. Technol.*, 44, 437–443.
- Lemoigne (1926)** "Produits de deshydratation et de polymerization de l'acide  $\beta$ -oxybutyric", *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* 8 770–782.
- Liu, Y., Chen, T., Yang, M., Wang, C., Huo, W., Yan, D., Chen, J., Zhou, J., & Xing, J. (2014).** "Analysis of mixtures of fatty acids and fatty alcohols in fermentation broth". *Journal of chromatography A.*, 1323, 66–72.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999).** "Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates ): From DNA to Plastic". *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63(1), 21–53.
- Manangan, T., & Shawaphun, S. (2010).** "Quantitative extraction and determination of polyhydroxyalkanoate accumulated in *Alcaligenes latus* dry cells". *ScienceAsia.* 36, 199–203.
- Mantelatto, P. E., & Durao, N. A. S. (2013).** "Process for extracting and recovering polyhydroxyalkanoates (PHAs) from cellular biomass". United States Patent N°: US 8,357,508 B2 , Jan. 22, 2013.
- Marsudi, S., Unno, H., & Hori, K. (2008).** "Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*". *Applied microbiology and biotechnology*, 78(6), 955–61.
- Miura, T., Ishii, D., & Nakaoki, T. (2013).** "Production of Poly(3-hydroxyalkanoate)s by *P. putida* Cultivated in a Glycerol/Nonanoic Acid-Containing Medium". *Journal of Polymers and the Environment*, 21(3), 760–765.
- Mozejko, J., & Ciesielski, S. (2013).** "Saponified waste palm oil as an attractive renewable resource for mcl-polyhydroxyalkanoate synthesis". *Journal of bioscience and bioengineering*, 116(4), 485–92.
- Mozejko, J., & Ciesielski, S. (2014).** "Pulsed feeding strategy is more favorable to medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production from waste rapeseed oil". *Biotechnology progress*, 30(5), 1243–6.
- Muhr, A., Rechberger, E. M., Salerno, A., Reiterer, A., Malli, K., Strohmeier, K., Schober, S., Mittelbach, M., & Koller, M. (2013).** "Novel description of mcl-PHA biosynthesis by *Pseudomonas chlororaphis* from animal-derived waste". *Journal of biotechnology*, 165(1), 45–51.

Muhr, A., Rechberger, E. M., Salerno, A., Reiterer, A., Schiller, M., Kwiecień, M., Adamus, G., Kowalczyk, M., Strohmeier, K., Schober, S., Mittelbach, M., & Koller, M. (2013). "Biodegradable latexes from animal-derived waste: Biosynthesis and characterization of mcl-PHA accumulated by *Ps. citronellolis*". *Reactive and Functional Polymers*, 73(10), 1391–1398.

Muller, S., Bley, T., & Babel, W. (1999). "Adaptive responses of *Ralstonia eutropha* to feast and famine conditions analysed by flow cytometry". *Journal of Biotechnology*. 75, 81–97.

Neijssel, O. M., & Mattos, M. J. T. De. (1994). "MicroReview-The energetics of bacterial growth : a reassessment". *Molecular Microbiology*. 13(2), 179–182.

Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R. T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J., Timmis K. N., Düsterhöft A., Tümmeler B., & Fraser, C. M. (2002). "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *P. putida* KT2440". *Environmental microbiology*, 4(12), 799–808.

Pabai, F., Kerma, S., & Morin, A. (1995). "Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *P. putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11,889-877.

Poblete-Castro, I, Escapa, I. F., Jaeger, C., Puchalka, J., Lam, C. M. C., Schomburg, D., Prieto, M. A., Martins dos Santos, V. A. P. (2012). "The metabolic response of *P-putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-nutrient-limited growth: Highlights from a multi-level omics approach". *Microbial Cell Factories*; 11:34

Poblete-Castro, Ignacio, Binger, D., Oehlert, R., & Rohde, M. (2014). "Comparison of mcl-Poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different *P. putida* strains from crude glycerol: citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions". *BMC biotechnology*. 14(1),110.

Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2006). "Biogenesis and Structure of Polyhydroxyalkanoate Granules". Volume 1 of the series *Microbiology Monographs* pp 109-136. (ed.) Shively, J. M.

Preusting, H., Van Houten, R., Hoefs, A., Kool van Langenberghe, E., Favre-Bulle, O, & Witholt, B. (1993). "High cells density cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: growth and production of poly(3-hydroxyalkanoates) in two-liquid phase batch and fed-batch systems". *Biotechnology and Bioengineering*. 41(5): 550-6.

Preusting, H., Hazenberg, W., & Witholt, B. (1993). "Continuous production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans* in a high-cell-density, two-liquid-phase chemostat". *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 311–316.

Qi, Q., Steinbüchel, A., & Rehm, B. H. A. (1998). "Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* ( *fadR* ): inhibition of fatty acid L -oxidation by acrylic acid". *FEMS Microbiology Letters*. 167, 89–94.

- Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., & Roy, I. (2011).** "Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future". *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 72(3), 29–47.
- Ramsay, B. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P., & Ramsay, J. A. (1990).** "Production of Poly-(3-Hydroxybutyric-Co-3-Hydroxyvaleric) Acids". *Applied and environmental microbiology*, 56(7), 2093–2098.
- Rehm, B. H. A., & Mitsky, T. A. (2001).** "Role of Fatty Acid De Novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by *Pseudomonads*: Establishment of the Transacylase (PhaG) -Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*". *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 3102–3109.
- Ren, Q., de Roo, G., Ruth, K., Witholt, B., Zinn, M., & Thöny-Meyer, L. (2009).** "Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation?" *Biomacromolecules*, 10(4), 916–22.
- Russell, J. B. & Cook, G. M (1995).** "Energetics of Bacterial Growth: Balance of Anabolic and Catabolic Reactions". *Microbiological Reviews*, 59(1), 48–62.
- Russell, J. B. (2007).** "The energy spilling reactions of bacteria and other organisms". *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 13(1-3), 1–11.
- Schulz, H. (1991).** "Beta oxidation of fatty acids". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1081(2), 109–120.
- Schweizer, H. P., Jump, R., & Po, C. (1996).** "Structure and gene-polypeptide relationships of the region encoding glycerol diffusion *Pseudomonas aeruginosa*". *Microbiology*, 143, 1287–1297.
- Shang, L., Jiang, M., Yun, Z., Yan, H.-Q., & Chang, H.-N. (2008).** "Mass production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from hydrolyzed corn oil by fed-batch culture of *P. putida*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 2783–2787.
- Shen, L., Haufe, J., & Patel, M. K. (2009).** "Product overview and market projection of emerging bio-based plastics (PRO-BIP)". Group Science, Technology and Society (STS), Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation, Utrecht University commissioned by European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE, [www.epnoe.eu](http://www.epnoe.eu)) and European Bioplastics ([www.europeanbioplastics.org](http://www.europeanbioplastics.org)).
- Silva-Queiroz, S. R., Silva, L. F., Pradella, J. G. C., Pereira, E. M., & Gomez, J. G. C. (2009).** "PHA(MCL) biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *P. putida* strains show differences on monomer specificities". *Journal of biotechnology*, 143(2), 111–8.
- Sim, S. J., Snell, K. D., Hogan, S. A., Stubbe, J., Rha, C., & Sinskey, A. J. (1997).** "PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo". *Nature Biotechnology*, 15, 63-67
- Steinbüchel, A., & Lütke-Eversloh, T. (2003).** "Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms". *Biochemical Engineering Journal*, 16(2), 81–96.

- Steinbüchel, A., & Valentin, H. E. (1995).** "Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids- Mini Review". *FEMS Microbiology Letters*, 128, 219–228.
- Stubbe, J., & Tian, J. (2003).** "Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase". *Natural Product Reports*, 20(5), 445.
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000).** "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters". *Progress In Polymer Science*, 25(10), 1503–1555.
- Sun, Z., Ramsay, J. a, Guay, M., & Ramsay, B. (2007).** "Increasing the yield of MCL-PHA from nonanoic acid by co-feeding glucose during the PHA accumulation stage in two-stage fed-batch fermentations of *P. putida* KT2440". *Journal of biotechnology*, 132(3), 280–2.
- Thijssen, G. J. E. (1964).** "Fatty-Acid Accumulation By Acrylate Inhibition Of Beta-Oxidation In Alkanoxidizing *Pseudomonas*". *Biochimica et Biophysica Acta*, 84(2), 192–195
- Tortajada, M., Ferreira, L., & Prieto, M. A. (2013).** "Second-generation functionalized medium-chain-length polyhydroxyalkanoates : the gateway to high-value bioplastic applications". *International Microbiology*, 16: 1–15.
- Tripathi, L., Wu, L. P., Meng, D. C., Chen, J. C., & Chen, G. Q. (2013).** "Biosynthesis and Characterization of Diblock Copolymer of P(3-Hydroxypropionate)-block-P(4-hydroxybutyrate) from Recombinant *Escherichia coli*". *Biomacromolecules*, 14(3), 862–870.
- Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, a R., Keshavarz, T., Bucke, C., & Roy, I. (2007).** "Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV". *Journal of biotechnology*, 132(3), 251–8.
- Valentin, H. E., Broyles, D. L., Casagrande, L. A., Colburn, S. M., Creely, W. L., Delaquil, P. A., Felton H. M., Gonzalez K. A., Houmiel K. L., Lutke K., Mahadeo D. A., Mitsky T. A., Padgett S. R., Reiser S. E., Slater S., Stark D. M., Stock R. T., Stone D. A., Taylor N. B., Thorne G. M., Tran M., K. J. Gruys (1999).** "PHA production, from bacteria to plants". *International Journal of Biological Macromolecules* 25, 303–306
- Van Duuren, J. B. J. H., Puchałka, J., Mars, A. E., Bücker, R., Eggink, G., Wittmann, C., & Dos Santos, V. a P. M. (2013).** "Reconciling in vivo and in silico key biological parameters of *P. putida* KT2440 during growth on glucose under carbon-limited condition". *BMC biotechnology*, 13, 93.
- Waard, P. De, Van DerWal, H., Huijberts, G. N. M., & Eggink, G. (1993).** "Heteronuclear NMR Analysis of Unsaturated Fatty Acids in Poly(3-hydroxyalkanoates)". *The Journal of Biological Chemistry*, 268(1), 315–319.
- Walsh, M., O'Connor K., Babu R., Woods T., & Kenny S. (2015).** "Plant Oils and Products of Their Hydrolysis as Substrates for Polyhydroxyalkanoate Synthesis". *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 123–133.
- Westerhoff, H. V., Lolkema, J. S., Otto, R., & Hellingwerf, K. J. (1982).** "Non-equilibrium thermodynamics of bacterial growth the phenomenological and the mosaic approach". *Biochimica et Biophysica Acta*, 683, 181–220.

**Weusthuis, R.A., G.N.M. Huijberts and G. Eggink (1996).** "International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates" pp. 102-109. In: Eggink, G., A. Steinbüchel, Y. Poirier and B. Witholt (eds.). *NRC Research Press*, Ottawa, Canada

**Williams, S. G., Greenwood, J. A., Jones, C. W., & Le, L. (1994).** "The effect of nutrient limitation on glycerol uptake and metabolism in continuous cultures of *Pseudomonas aeruginosa*". *Microbiology*, 140, 2961–2969.

**Witholt, B., & Kessler, B. (1999).** "Perspectives of medium chain length a versatile set of bacterial bioplastics". *Current Opinion in Biotechnology*, 10:279-285

**Zhao, J., Li, S. P., Yang, F. Q., Li, P., & Wang, Y. T. (2006).** "Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Ziziphus jujuba* (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction". *Journal of chromatography. A*, 1108(2), 188–94.

**Zinn, M., Weilenmann, Hany, Schmid, & Egli, T. (2003).** "Tailored synthesis of Poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHB/HV) in *Ralstonia eutropha* DSM 428. *Acta Biotechnol.* 23, 309–316.

**Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001).** "Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(1), 5–21.

## **TABLES DES ANNEXES**

**ANNEXE A : Liste des réactions anaboliques du descripteur métabolique.....180**

**ANNEXE B : Liste des réactions cataboliques du descripteur métabolique.....182**

CONFIDENTIEL

## ANNEXE A : Liste des réactions anaboliques du descripteur métabolique

1 ammonia + 1 NADH + 1 pyruvate	→	1 alanine
4 ammonia + 5 ATP + 3 NADH + 1 NADPH + 1 acetyl-CoA + 1 $\alpha$ -ketoglutarate + 1 oxaloacetate + 1 CO <sub>2</sub>	→	1 fumarate + 1 acetate + 1 CoA + 1 arginine
2 ammonia + 2 ATP + 1 NADH + 1 oxaloacetate	→	1 asparagine
1 ammonia + 1 NADH + 1 oxaloacetate	→	1 aspartate
1 sulfur + 1 ammonia + 3 ATP + 4 NADPH + 1 acetyl-CoA + 1 glycerate-P	→	1 acetate + 1 CoA + 1 cysteine
1 ammonia + 1 NADH + 1 $\alpha$ -ketoglutarate	→	1 glutamate
2 ammonia + 1 ATP + 1 NADH + 1 $\alpha$ -ketoglutarate	→	1 glutamine
1 THF + 1 ammonia + 1 glycerate-P	→	1 methylene-THF + 1 glycine
1 methenyl-THF + 3 ammonia + 3 ATP + 1 oxaloacetate + 1 pentose-P	→	1 THF + 1 NADH + 1 fumarate + 1 histidine
1 ammonia + 2 ATP + 5 NADPH + 1 oxaloacetate + 1 pyruvate	→	1 CO <sub>2</sub> + 1 isoleucine
1 ammonia + 1 NADPH + 1 acetyl-CoA + 2 pyruvate	→	2 CO <sub>2</sub> + 1 CoA + 1 leucine
2 ammonia + 1 ATP + 2 NADH + 2 NADPH + 1 oxaloacetate + 1 pyruvate + 1 succinyl-CoA	→	1 CO <sub>2</sub> + 1 succinate + 1 CoA + 1 lysine
1 methyl-THF + 1 sulfur + 1 ammonia + 4 ATP + 1 NADH + 6 NADPH + 1 acetyl-CoA + 1 oxaloacetate + 1 glycerate-P + 1 succinyl-CoA	→	1 THF + 1 pyruvate + 1 acetate + 1 succinate + 2 CoA + 1 methionine
1 ammonia + 1 ATP + 1 NADH + 1 NADPH + 1 erythrose-P + 2 PEP	→	1 CO <sub>2</sub> + 1 phenylalanine
1 ammonia + 1 ATP + 3 NADPH + 1 $\alpha$ -ketoglutarate	→	1 proline
1 ammonia + 1 glycerate-P	→	1 serine
1 ammonia + 2 ATP + 2 NADH + 1 NADPH + 1 oxaloacetate	→	1 threonine
2 ammonia + 4 ATP + 1 NADH + 1 NADPH + 1 erythrose-P + 1 pentose-P + 2 PEP + 1 glycerate-P	→	1 pyruvate + 1 CO <sub>2</sub> + 1 glycerol-P + 1 tryptophane
1 ammonia + 1 ATP + 1 NADPH + 1 erythrose-P + 2 PEP	→	1 CO <sub>2</sub> + 1 tyrosine
0.1009 alanine + 0.0446 arginine + 0.0455 asparagine + 0.0455 aspartate + 0.0677 cysteine + 0.0386 glutamate + 0.0386 glutamine + 0.0992 glycine + 0.0449 histidine + 0.0333 isoleucine + 0.0579 leucine + 0.0457 lysine + 0.0175 methionine + 0.0256 phenylalanine + 0.1373 proline + 0.0325 serine + 0.0444 threonine + 0.0106 tryptophane + 0.0192 tyrosine + 4.324 ATP	→	<b>1 PROTEIN</b>
2 formyl-THF + 5 ammonia + 11 ATP + 4 NADH + 2 oxaloacetate + 1 pentose-P + 1 glycerate-P + 1 CO <sub>2</sub>	→	1 THF + 1 methyl-THF + 2 fumarate + 1 ATP
2 formyl-THF + 5 ammonia + 12 ATP + 2 NADH + 1 oxaloacetate + 1 pentose-P + 1 glycerate-P + 1 CO <sub>2</sub>	→	1 THF + 1 methyl-THF + 1 fumarate + 1 GTP
3 ammonia + 10 ATP + 1 NADH + 1 oxaloacetate + 1 pentose-P + 0.5 oxygen	→	1 CTP
2 ammonia + 7 ATP + 1 NADH + 1 oxaloacetate + 1 pentose-P + 0.5 oxygen	→	1 UTP
0.18 ATP + 0.3264 GTP + 0.3201 CTP + 0.1691 UTP + 0.4 ATP	→	<b>1 RNA</b>
2 formyl-THF + 5 ammonia + 11 ATP + 4 NADH + 2 oxaloacetate + 1 pentose-P + 1 glycerate-P + 1 CO <sub>2</sub>	→	1 THF + 1 methyl-THF + 1 NADPH + 2 fumarate + 1 dATP
2 formyl-THF + 5 ammonia + 12 ATP + 2 NADH + 1 oxaloacetate + 1 pentose-P + 1 glycerate-P + 1 CO <sub>2</sub>	→	1 THF + 1 methyl-THF + 1 NADPH + 1 fumarate + 1 dGTP
3 ammonia + 10 ATP + 1 NADH + 1 oxaloacetate + 1 pentose-P + 0.5 oxygen	→	1 NADPH + 1 dCTP
1 methylene-THF + 2 ammonia + 8 ATP + 1 NADH + 1 oxaloacetate + 1 pentose-P + 0.5 oxygen	→	1 THF + 1 NADPH + 1 dTTP
0.1691 dATP + 0.3201 dGTP + 0.3264 dCTP + 0.1844 dTTP + 1.4161 ATP	→	<b>1 DNA</b>
1 ATP + 1 glycerol	→	1 glycerol-P
1 ammonia + 1 glycerate-P	→	1 serine
7 ATP + 15 NADPH + 8 acetyl-CoA	→	8 CoA + 1 C16:0
8 ATP + 16 NADPH + 9 acetyl-CoA + 0.5 oxygen	→	9 CoA + 1 C18:1

4 ATP + 9 NADPH + 5 acetyl-CoA	→	5 CoA + 1 C10:0
1 ammonia + 1 glycerate-P	→	1 CO <sub>2</sub> + 1 ethanolamine
6 ATP + 13 NADPH + 7 acetyl-CoA	→	7 CoA + 1 C14:0
5 ATP + 11 NADPH + 6 acetyl-CoA	→	6 CoA + 1 C12:0
8 ATP + 17 NADPH + 9 acetyl-CoA	→	9 CoA + 1 C18:0
0.572 glycerol-P + 0.092 C18:0 + 1.174 C16:0 + 0.134 C10:0 + 0.2 C18:1 + 0.036 C14:0 + 0.364 C12:0 + 1.428 ethanolamine + 2 ATP	→	<b>1 PHOSPHOLIPIDS</b>
1 ATP + 1 glucose-P	→	1 equiv glucose
1 equiv glucose	→	<b>1 POLYSACCHARIDES</b>
7 ATP + 15 NADPH + 8 acetyl-CoA	→	8 CoA + 1 C16:33%
7 ATP + 15 NADPH + 8 acetyl-CoA + 0.5 oxygen	→	8 CoA + 1 C16:1 33%
8 ATP + 16 NADPH + 9 acetyl-CoA + 0.5 oxygen	→	9 CoA + 1 C18:1 33%
1 glycerol-P + 1 C16:33% + 1 C16:1 33% + 1 C18:1 33% + 2 ATP	→	<b>1 TRIGLYCERIDES</b>
1 ammonia + 1 ATP + 1 NADH + 1 acetyl-CoA + 1 fructose-P	→	1 CoA + 1 UDP-N-acetylglucosamine
1 ammonia + 2 ATP + 1 NADH + 1 NADPH + 1 acetyl-CoA + 1 fructose-P + 1 PEP	→	1 CoA + 1 UDP-N-amuramic
1 ammonia + 1 NADH + 1 pyruvate	→	1 alanine
2 ammonia + 1 ATP + 4 NADPH + 1 oxaloacetate + 1 pyruvate + 1 succinyl-CoA	→	1 succinate + 1 CoA + 1 diaminopimelate
1 ammonia + 1 NADH + 1 □-ketoglutarate	→	1 glutamate
2 ammonia + 1 ATP + 2 NADH + 2 NADPH + 1 oxaloacetate + 1 pyruvate + 1 succinyl-CoA	→	1 CO <sub>2</sub> + 1 succinate + 1 CoA + 1 lysine
1.00098911968348 UDP-N-acetylglucosamine + 0.999010880316518 UDP-N-amuramic + 2.16122650840752 alanine + 1.15529179030663 diaminopimelate + 1.14441147378833 glutamate + 0.127596439169139 lysine + 5 ATP	→	<b>1 PEPTYDOGLYCANE</b>
1 ATP + 1 glucose-P	→	1 UDP-glucose
1 ammonia + 1 glycerate-P	→	1 CO <sub>2</sub> + 1 CDP-ethanolamine
6 ATP + 11 NADPH + 7 acetyl-CoA	→	7 CoA + 1 OH-myristate
2 ATP + 1 pentose-P + 1 PEP	→	1 CMP KDO
1 ATP + 2 glucose-P	→	4 NADPH + 2 CO <sub>2</sub> + 1 glycerol-P + 1 NDP heptose
1 ammonia + 2 ATP + 1 fructose-P	→	1 TDP glucosamine
5 UDP-glucose + 2 CDP-ethanolamine + 6 OH-myristique + 3 CMP KDO + 3 NDP heptose + 3 TDP glucosamine	→	<b>1 LPS</b>
2 ammonia + 2 ATP + 3 NADPH + 1 acetyl-CoA + 1 □-ketoglutarate	→	1 acetate + 1 CoA + 1 ornithine
1 ornithine	→	<b>1 POLYAMINE</b>

## ANNEXE B : Liste des réactions cataboliques du descripteur métabolique

r0	402.10 <sup>-6</sup> THF + 64.10 <sup>-6</sup> methenyl-THF + 486.10 <sup>-6</sup> formyl-THF + 183.10 <sup>-6</sup> sulfur + 0.010 ammonia + 0.044 ATP + 5536.10 <sup>-6</sup> NADH + 0.010 NADPH + 3485.10 <sup>-6</sup> acetyl-CoA + 224.10 <sup>-6</sup> erythrose-P + 488.10 <sup>-6</sup> fructose-P + 261.10 <sup>-6</sup> glucose-P + 1000.10 <sup>-6</sup> α- ketoglutarate + 2276.10 <sup>-6</sup> oxaloacetate + 596.10 <sup>-6</sup> pentoses-P + 700.10 <sup>-6</sup> PEP + 1670.10 <sup>-6</sup> glycerate-P + 3168.10 <sup>-6</sup> pyruvate + 648.10 <sup>-6</sup> succinyl-CoA + 143.10 <sup>-6</sup> O <sub>2</sub> + 33.10 <sup>-6</sup> glycerol-P	→	1082.10 <sup>-6</sup> CO <sub>2</sub> + 356.10 <sup>-6</sup> acetate + 573.10 <sup>-6</sup> fumarate + 648.10 <sup>-6</sup> succinate + 4133.10 <sup>-6</sup> CoA + 815.10 <sup>-6</sup> methylene- THF + 136.10 <sup>-6</sup> methyl-THF + 1 g of catalytic biomass
r1	2 ATP + 1 CoA + 1 fatty acid	→	1 acyl-CoA
r2	3.735 CoA + 1 acyl-CoA	→	3.735 NADH + 3.735 acetyl-CoA + 3.695 FADH <sub>2</sub> + 1 hydroxyacyl-CoA
r3	7.95 CoA + 1 acyl-CoA	→	6.91 FADH <sub>2</sub> + 8.95 acetyl-CoA + 7.95 NADH
r4	1 ATP + 1 CoA + 1 acetate	→	1 acetyl-CoA
r5	1 R-3-hydroxyacyl -CoA	→	1 CoA + 1 PHAx
r6	1 acetyl-CoA + 1 oxaloacetate	→	1 CoA + 1 isocitrate
r7	1 isocitrate	→	1 NADH + 1 α-ketoglutarate + 1 CO <sub>2</sub>
r8	1 isocitrate	→	1 NADPH + 1 α-ketoglutarate + 1 CO <sub>2</sub>
r9	1 α-ketoglutarate + 1 CoA	→	1 NADH + 1 CO <sub>2</sub> + 1 succinyl-CoA
r10	1 succinyl-CoA	→	1 ATP + 1 succinate + 1 CoA
r11	1 succinate	→	1 fumarate + 1 FADH <sub>2</sub>
r12	1 fumarate	→	1 malate
r13	1 malate	→	1 NADH + 1 oxaloacetate
r14	1 oxaloacetate	↔	1 PEP + 1 CO <sub>2</sub>
r15	1 malate	→	1 NADPH + 1 pyruvate + 1 CO <sub>2</sub>
r16	1 pyruvate + 1 CoA	→	1 NADH + 1 acetyl-CoA + 1 CO <sub>2</sub>
r17	1 PEP	→	1 ATP + 1 pyruvate
r18	1 PEP	↔	1 glycerate-P
r19	1 ATP + 1 glycerate-P	↔	1 glycerate-1,3-diP
r20	1 NADH + 1 glycerate-1,3-diP	↔	1 triose-P
r21	2 triose-P	→	1 fructose-di-P
r22	1 fructose-di-P	→	1 fructose-P
r23	1 fructose-P	→	1 glucose-P
r24	1 glucose-P	→	1 NADPH + 1 gluconate-6-P
r25	1 gluconate-6-P	→	1 2-keto-3-deoxygluconate-6-P
r26	1 2-keto-3-deoxygluconate-6-P	→	1 pyruvate + 1 triose-P
r27	1 isocitrate	→	1 succinate + 1 glyoxylate
r28	1 acetyl-CoA + 1 glyoxylate	→	1 CoA + 1 malate
r29	1 gluconate-6-P	→	1 NADPH + 1 pentose-P + 1 CO <sub>2</sub>
r30	1 pentose-P	→	1 ribose-P
r31	1 pentose-P	→	1 xylulose-P
r32	1 ribose-P + 1 xylulose-P	→	1 triose-P + 1 sedoheptulose-P
r33	1 erythrose-P + 1 xylulose-P	→	1 fructose-P + 1 triose-P
r34	1 triose-P + 1 sedoheptulose-P	→	1 fructose-P + 1 erythrose-P
r35	1 ATP + 1 acetyl-CoA + 1 CO <sub>2</sub>	→	1 CoA + 1 Malonyl6ACP
r36	1 NADH + 1 triose-P	↔	1 glycerol-P
r37	1 THF + 1 NADPH + 1 CO <sub>2</sub>	→	1 formyl-THF
r38	1 methyl-THF	→	1 methylene-THF + 1 NADPH
r39	1 methylene-THF	→	1 methenyl-THF + 1 NADH
r40	1 methylene-THF	→	1 THF + 1 CO <sub>2</sub>

r41	1 NADH + 1 ATP ↔ 1 NADPH
r42	1 NADH + 0.5 oxygen → 6 proton
r43	0.5 oxygen + 1 FADH <sub>2</sub> → 3 proton
r44	3 proton → 1 ATP
r45	1 ATP →
r46	1 ATP + 1 Glycérol → 1 Glycérol-P
r47	1 Glycérol-P → 1 NADH + 1 triose-P
r48	2 NADPH + 1 Acétyl-CoA + 1 Malonyl-CoA → 1 CO <sub>2</sub> + 1 CoA + 1 Butyryl-ACP
r49	4 NADPH + 2 Malonyl-CoA + 1 Butyryl-ACP → 2 CO <sub>2</sub> + 1 Caprylyl-ACP
r50	1 NADPH + 1 Acétyl-CoA + 1 Caprylyl-ACP → 1 HO-Capryl-CoA
r51	1 HO-Capryl-CoA → 1 CoA + 1 PHA-C10

CONFIDENTIEL