



HAL
open science

Approche intégrée couplant procédé microbiologique et procédé séparatif in situ pour la production d'acide 3-hydroxypropionique par *Lactobacillus reuteri*

Grégoire Burgé

► **To cite this version:**

Grégoire Burgé. Approche intégrée couplant procédé microbiologique et procédé séparatif in situ pour la production d'acide 3-hydroxypropionique par *Lactobacillus reuteri*. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole doctorale ABIES (Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé), 2015. Français. NNT: . tel-01787709

HAL Id: tel-01787709

<https://agroparistech.hal.science/tel-01787709>

Submitted on 7 May 2018

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.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur en Biotechnologies délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialités : Génie Microbiologique et Bioprocédés

présentée et soutenue publiquement par

Grégoire BURGÉ

Le 18 décembre 2015

Approche intégrée couplant procédé microbiologique et procédé séparatif *in situ* pour la production d'acide 3-hydroxypropionique par *Lactobacillus reuteri*

Directeurs de thèse : **Pr. Henry-Éric SPINLER** et **Pr. Violaine ATHÈS**

Co-encadrants de thèse : **Dr. Claire SAULOU-BÉRIION** et **Dr. Marwen MOUSSA**

Jury

M. Frank DELVIGNE, Professeur, Gembloux Agro-BioTech, Université de Liège
M. Romain KAPEL, Maître de conférences (HDR), Université de Lorraine
M. Pascal DHULSTER, Professeur, Institut Charles Viollette, Université de Lille 1
M. Christophe LACROIX, Professeur, ETH Zürich
Mme Carole MOLINA-JOUVE, Professeur, INSA Toulouse
Mme Violaine ATHÈS, Professeur, AgroParisTech
M. Henry-Éric SPINLER, Professeur, AgroParisTech

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse
Directeur de thèse

« Le poète, c'est un scientifique de l'âme. Un imbécile qui essaye d'exprimer les mystères de l'existence. »

Julien Blanc-Gras, *Gringoland*,
Éditions Au Diable Vauvert (2005)

REMERCIEMENTS

« Sois reconnaissant envers tous, tous t'enseignent » (Bouddha)

Ce manuscrit est dédié à la mémoire de Daniel Thomas, Professeur émérite à l'Université de Technologie de Compiègne (UTC) et pionnier des biotechnologies en France, parti trop tôt. Il m'a transmis sa passion des sciences et sa foi en la recherche.

Je tiens à remercier en premier lieu Frank DELVIGNE, Professeur à Gembloux Agro-Bio Tech (Université de Liège) et Romain KAPEL, Maître de conférences à l'Université de Lorraine, d'avoir accepté de rapporter mon travail de recherche. J'adresse également mes remerciements à Carole MOLINA-JOUE, Professeur à l'INSA Toulouse, Christophe LACROIX, Professeur à l'ETH Zürich et Pascal DHULSTER, Professeur à l'Université Lille 1, pour leur participation au jury de cette thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Un grand merci également à Caroline RÉMOND, Professeur à l'URCA (Reims), Marie-Laure LAMELOISE, Professeur à AgroParisTech, Ivan MARC, Directeur de recherche au LRGP (Nancy) et Pascal DHULSTER (encore une fois !) pour leur présence dans mon comité de thèse. Je n'ai pas eu le privilège de vous côtoyer régulièrement mais vos commentaires, lors de nos rencontres, ont toujours constitué des outils précieux pour avancer.

Je voudrais ensuite remercier la Chaire en Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI), et à travers elle l'ensemble des collectivités locales (Reims métropole, le conseil général de la Marne et la région Champagne-Ardenne) d'avoir financé ce travail. Un grand merci au Professeur Florent ALLAIS, directeur de la Chaire, pour avoir cru en moi et en ce projet. Merci aussi et surtout pour ton amitié, pour ta confiance, ta disponibilité, ta grande réactivité ainsi que pour ton idée de synthétiser le 3-HPA par voie chimique ! Merci enfin pour les perspectives que tu m'offres, c'est un plaisir et une fierté de rejoindre (enfin !) l'équipe ! J'en profite pour remercier également tous les membres de la Chaire qui ont participé, de près ou de loin, à cette aventure : mes collègues microbiologistes (Tiphaine CLÉMENT, Julien COUVREUR et Mathilde GRANDCHAMP) ; chimistes (Amandine FLOURAT, Aurélien PÉRU et Fanny BRUNISSEN) et procédistes (Andreia TEIXEIRA et Gaëlle WILLIG) ainsi que tous les doctorants (Armando RÉANO, Abdus Samad JAUFURALLY, Thomas MARIÉ, Axel FAYET, Jimmy STOPINSKI et Stéphanie CONY). Merci à tous pour votre accueil, c'est toujours avec grand plaisir que je suis venu travailler et vous rendre visite, souvent autour d'une raclette ou d'une coupe de champagne !

Ce travail a été réalisé quasi-intégralement au sein du Laboratoire de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR GMPA) de l'INRA de Plaisir-Grignon, initialement sous la direction d'Isabelle SOUCHON puis de François BOUÉ, que je remercie pour leur accueil. Ils m'ont donné les moyens nécessaires de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements à Éric SPINLER, Professeur à AgroParisTech (Grignon), directeur de cette thèse, pour sa confiance, ses conseils (nombreux et avisés !) et son soutien. Merci aussi de m'avoir fait partager ta passion de la recherche et pour l'autonomie que tu m'as laissée pendant ces trois années, j'espère en avoir fait bon usage... Un immense merci à Violaine ATHÈS, Professeur à AgroParisTech (Grignon) et co-directrice de cette thèse, pour sa gentillesse, sa douceur, sa compréhension et sa disponibilité. Merci également pour nos nombreuses discussions et échanges, j'ai beaucoup appris grâce à toi.

Je n'oublie évidemment pas Claire SAULOU et Marwen MOUSSA, maîtres de conférences à l'UMR GMPA, et co-encadrants de choc de cette thèse, sans qui le travail accompli n'aurait pas été à la hauteur de ce qu'il est. Merci pour votre investissement et votre implication, notamment sur le terrain mais aussi dans les corrections de ce mémoire. Marwen, merci pour ton sourire et ta bonne humeur à toute épreuve. Merci aussi de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux des contacteurs à membrane ! Claire, un grand merci pour ton suivi au quotidien (depuis mon stage de fin d'étude !), pour tes encouragements et pour avoir réussi (du moins je crois !) à m'inculquer un peu de ta rigueur. Merci aussi d'avoir accepté de me confier la gestion de « ton » projet.

Un grand merci au Professeur Cristian TRÉLÉA pour sa gentillesse et son suivi régulier de mon avancée. Merci pour le temps que tu m'as consacré lorsque nous avons posé les bases d'un premier modèle de couplage production et extraction du 3-HP. Je regrette de ne pas avoir eu le temps de travailler plus longtemps avec toi sur ce projet.

Mes remerciements à la Team 3-HP ne seraient pas complets si je n'y associais pas Florian CHEMARIN (mon thésard !), doctorant recruté par la Chaire ABI pour poursuivre et approfondir mes travaux. Merci pour ton aide précieuse dans l'estimation des coefficients de transfert. On est très différents mais bien complémentaires au final ! Je pars tranquille, le projet 3-HP est entre de bonnes mains ! Et puis je continuerai à avoir un œil là-dessus depuis Reims...

Un immense merci à toute l'équipe analytique du GMPA (Brigitte POLLET, Armelle DÉLILE et Pascale LIEBEN), sans qui rien de tout ça n'aurait été possible. Merci de m'avoir

transmis le goût de la chimie analytique, d'avoir pris le temps de me former à l'utilisation des différents appareils (HPLC, GC-MS, LC-MS) et de m'avoir aidé à développer les méthodes de dosage du 3-HP et des ses acolytes en milieu de bioconversion. C'est réellement une chance de disposer d'une telle plateforme analytique au sein d'un laboratoire... Il en va de même pour l'atelier, toujours prêt à rendre service et tellement efficace ! Un grand merci les gars (Frédéric LECORNUE, David LÉVÊQUE, Jérôme BUSSIÈRE) !

Pour finir avec le GMPA, je voudrais remercier les membres de l'équipe BioMiP qui m'ont aidé de près ou de loin durant ces trois années, à commencer par les Professeurs Marielle BOUIX et Catherine BÉAL avec qui j'espère sincèrement avoir la chance de retravailler. Marielle, merci pour ton aide et tes conseils indispensables en cytométrie en flux ainsi que pour ton intérêt constant pour mes travaux de recherche. J'y associe bien évidemment Sarah GHORBAL, pour son assistance technique et pour son aide dans la mise au point de nombreuses méthodes de marquage. Catherine, merci pour tes explications du modèle de Zwietering-Gompertz et plus généralement pour tes conseils, toujours constructifs, et pour ta bienveillance. Mes remerciements d'adressent également à Jérôme DELETTRE et Stéphanie CÉNARD pour leur aide en fermentation et au CinAc, Séverine LAYEC pour son aide en bioinformatique, Éric DUGAT-BONY, Anne-Sophie SARTHOU (ma jumelle d'anniversaire), Thomas CATTENOZ (dit Pépé), David FOREST (dit Tonton), Steven LE FEUNTEUN, Caroline PÉNICAUD (miss chouquettes nutella), la Baronne (pour ses jeux de mots toujours au top) ainsi que tous les autres membres du GMPA pour leur bonne humeur quotidienne et pour leur contribution au bon déroulement de ma thèse. Pour terminer, je tenais aussi à remercier les membres du secrétariat (Laurence FRUCHART, Evelyne PHILIPPE, Thierry FEUGNET) qui m'ont toujours supporté avec le sourire, même quand je venais (souvent) les perturber en dehors des heures d'ouverture. Merci pour les innombrables chocolats, bonbons et autres friandises que vous m'avez offerts !

Last but not least, je n'oublie évidemment pas mes merveilleux stagiaires (Rana BOUNADER, Thomas MARIÉ, Ana-Karen SANCHEZ, Mariane KNIEST, Carolina OROZCO, Morad CHADNI) qui ont pleinement participé à ce projet, avec motivation, compétence, rigueur, bonne humeur. C'était un vrai plaisir de travailler avec vous, merci pour tout... Je vous dois beaucoup ! Je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos vies respectives, vous le méritez.

J'ai bien évidemment une grosse pensée pour mes collègues thésards, passés et présents. Merci à Nadège ADOUARD, ma femme de travail et « alter ego » féminin (il paraît que c'est moi qui le dis), pour son amitié, pour son courage, son soutien mais aussi ses knee-kicks. Merci encore de m'avoir secondé avec brio lors de l'organisation de notre journée scientifique sur le développement durable ! Merci à Guillaume FICHES (je n'ai toujours pas compris comment tu pouvais ne pas manger le midi...) de m'avoir initié à la dégustation du Cognac, pour les (nombreuses) bières partagées (parfois avec colorant bleu !) et pour sa mauvaise humeur légendaire. Merci à Maud LEPORTIER, qui ne sera pas restée très longtemps, mais suffisamment pour partager beaucoup de fous rires et pour être regrettée à son départ. Merci à Hélène VELLY de m'avoir si bien accueilli, et surtout supporté (malgré mon humour parfois douteux...) dans son bureau ! Merci à Julie MENEGHEL (dit Poulette) pour sa crédulité du début, pour avoir accepté de s'occuper de la chatte de ma mère (oui je sais), pour ses conseils musicaux (toujours bons) et surtout sa joie de vivre et son sourire. Surtout ne change pas. Merci à Solenne JOURDREN, la boulangère Versaillaise, pour sa bonne humeur, ses rendez-vous plomberie, ses réponses au Burger Quiz, son rire communicatif mais aussi et surtout pour ses connaissances en sommaire automatique ! Merci à Salma BEN HARB (je sais, je parle trop vite) pour sa gentillesse (pour ses pâtisseries tunisiennes aussi !). Merci à Thuy-Minh GIANG de m'avoir fait goûter (et aimer !) le chien et d'avoir enrichi ma collection de verres à bière depuis le Vietnam. Ils ne sont pas thésards mais c'est tout comme : merci aux deux Vincent, MONTCLUS et MATHIEU (Bibiche et Chaton). Vincent C. pour le taxi (enfin si on peut parler de voiture...), ses apéros terrasse-piscine, ses concours de pronostics, ses air-macarons et son air faussement naïf (pourquoi tu dis ça je comprends pas ?). Vincent B. pour ses apéros terrasse (sans piscine mais vachement biens quand même), pour sa volonté de sauver la planète, ses cours sur le café et ses tee-shirts rayés.

Et pour finir, comment ne pas remercier ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix et qui a toujours été présente dans les bons et les moins bons moments. C'est une chance de vous avoir et de pouvoir compter sur vous. Un merci tout particulier à maman pour ses relectures attentives du manuscrit ! Et pour terminer, mes plus gros remerciements sont pour Doudou, évidemment. Faire une thèse tous les deux en même temps ça pouvait paraître fou, se marier au milieu aussi, mais on s'en est plutôt bien sortis au final ! Merci de me supporter tous les jours depuis plus de 5 ans (et c'est pas fini !), merci de donner un sens à tout ce que je fais, merci de me rendre meilleur au quotidien (ça me rappelle une histoire de fût de chêne...), merci pour ta présence, ô combien précieuse et indispensable, à mes côtés, tout simplement.

RÉSUMÉ

La synthèse de produits chimiques à partir de ressources renouvelables est une préoccupation majeure qui contribue au développement de la bioéconomie. En effet, un intérêt croissant est porté à la production durable de molécules plateformes biosourcées, comme l'acide 3-hydroxypropionique (3-HP), un acide carboxylique hydroxylé. Le développement de procédés biotechnologiques de production du 3-HP se heurte à plusieurs verrous. La bactérie lactique *Lactobacillus reuteri* a été identifiée comme productrice naturelle de 3-HP à partir de glycérol (co-produit de l'industrie du biodiesel), mais avec de faibles productivité et titre, en raison des effets inhibiteurs de la molécule d'intérêt et de son intermédiaire métabolique, le 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA). Le rendement de production est quant à lui limité par la formation de co-produits, comme le 3-HPA et le 1,3-propanediol (1,3-PDO). L'intégration d'un procédé d'extraction in situ du 3-HP avec le système de bioconversion pourrait conduire à une diminution de l'inhibition et à une récupération en continu de la molécule ciblée. Pour cela, l'extraction réactive liquide-liquide assistée par contacteur à membrane a été identifiée comme une technique d'intérêt. Elle permet de mettre en œuvre une surface d'échange spécifique bien supérieure en comparaison aux procédés dispersifs usuels, empêche la formation d'une émulsion et permet de limiter le contact direct des cellules avec la phase organique extractante, potentiellement toxique.

Trois souches de *L. reuteri*, représentatives de la diversité intra-spécifique, ont d'abord été étudiées en fioles et leurs performances de croissance sur glucose et de bioconversion du glycérol en 3-HP ont été comparées. La souche DSM 17938, bonne consommatrice de glycérol et productrice de 3-HP, a été sélectionnée pour la suite du projet. Durant la bioconversion, une perte totale de la cultivabilité cellulaire, concomitante à une diminution de l'activité enzymatique des bactéries productrices a été observée. Des analyses spécifiques par cytométrie en flux ont alors révélé un impact délétère du 3-HPA et, dans une moindre mesure, du 3-HP uniquement en conditions acides. Dans le but d'optimiser les performances de production du 3-HP et de mieux en comprendre les déterminants métaboliques, la bioconversion a été mise au point en bioréacteur et un apport contrôlé de glycérol (mode "fed-batch") a été développé, permettant de diminuer l'accumulation de 3-HPA dans le milieu.

Concernant l'extraction du 3-HP, l'utilisation combinée de tri-octyl-amine (TOA) et d'Aliquat 336 dilués dans du n-décane a conduit à des performances élevées (rendement d'extraction maximum supérieur à 90 %) sur une gamme de conditions expérimentales compatibles avec la bioconversion (pH, concentration en 3-HP). Une synergie entre les deux amines extractantes a été mise en évidence. Le 3-HP est extrait de façon prédominante par rapport aux autres métabolites de la voie de bioconversion, confirmant la sélectivité du procédé de séparation choisi. Cependant, lorsque

l'extraction est réalisée sur un milieu réel de bioconversion, certains composés d'origine cellulaire sont suspectés de s'adsorber à l'interface entre les phases au niveau des pores de la membrane. Cet effet, combiné à la possible compétition entre le 3-HP et des composés (sels) également capables de réagir avec les extractants, a conduit à des limitations en termes de rendement, de cinétique d'extraction et de sélectivité.

A notre connaissance, ce travail constitue la première étude dédiée à la bioconversion extractive du 3-HP. Toutefois, ce nouveau procédé intégré montre encore de faibles performances (productivité, concentration finale, durée de production), en raison d'une inhibition importante des bactéries productrices par les métabolites de la voie de bioconversion et la phase organique extractante. Différentes pistes d'optimisation ont été suggérées pour surmonter les différents verrous identifiés.

Mots clés : procédé intégré, production biotechnologique, extraction *in situ*, état physiologique, acide 3-hydroxypropionique, *Lactobacillus reuteri*

ABSTRACT

Within the development of bioeconomy, there is an increasing drive towards the production of chemicals from renewable biomass-derived feedstock. In this context, interest in the sustainable production of biobased building blocks, such as the bifunctional 3-hydroxypropionic acid (3-HP), is growing. Among its various applications, the 3-HP can be used for the synthesis of biobased polymers and acrylic acid. The development of a biotechnological process to produce this platform chemical is a key issue. *Lactobacillus reuteri* is known as a natural producer of 3-HP from glycerol (by-product of biodiesel manufacturing industries) although at low yield and productivity, due to the inhibitory effects of the product and of its metabolic intermediate 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA), as well as the formation of 1,3-propanediol (1,3-PDO) as co-product. The integration of an *in situ* 3-HP extraction process to the bioconversion system could lead to a decrease in inhibition phenomena and to the continuous recovery of the targeted molecule. To this aim, the reactive liquid-liquid extraction assisted by a membrane contactor was considered in the present study. This technique shows a high specific surface area, unrivaled when compared to usual dispersive processes, without creating emulsion and limits the direct contact between bacteria and the organic phase.

First, three *L. reuteri* strains, representative of the intra-species diversity, were studied in flasks and compared in terms of growth performance on glucose and of 3-HP production using glycerol as substrate. The DSM 17938 strain, a good glycerol consumer and 3-HP producer, was then selected for the project. During bioconversion, a total loss in cultivability concomitant with a decrease of the cellular enzymatic activity was observed. Flow cytometry analyses revealed a great impact of 3-HPA and, to a lesser extent, of 3-HP only in acidic conditions. To optimize 3-HP production performances and further understand its metabolic determinants, bioconversion was set up in bioreactor with a controlled feeding in glycerol (fed-batch mode).

Concerning the 3-HP extraction, the use of a mixed extractants (tri-octyl-amine and Aliquat 336 in *n*-decanol) showed high performances over a wide range of experimental conditions (pH, 3-HP concentration), highlighting a synergistic effect. 3-HP was predominantly extracted over all the molecules of the bioconversion medium, confirming the selectivity of the extraction process studied. Nevertheless, when extraction was performed on a real bioconversion broth, some cell-originating compounds were suspected to adsorb to the interface between the two phases near the pores of the membrane. This effect, combined to the possible competition between 3-HP and other compounds able to react with the extractants, such as salts, led to limitations in the extraction performances and selectivity.

To our best knowledge, this work is the first one dedicated to the study of 3-HP extractive bioconversion. However, this new integrated process currently displays low performances (productivity, final product concentration, production duration) due to bacterial inhibition by the bioconversion metabolites and the extractant organic phase. Several optimization tracks have been suggested to overcome the identified locks.

Keywords : integrated process, biotechnological production, *in situ* extraction, physiological state, 3-hydroxypropionic acid, *Lactobacillus reuteri*

VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE

Liste des publications

G. Burgé, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler (2015 a) Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or Phospho-Ketolase pathway (PKP) and lactic acid production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains. *Journal of Microbiology*. 53:702–710.

DOI: 10.1007/s12275-015-5056-x

G. Burgé, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, B. Pollet, A. Flourat, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler (2015 b) Diversity of *Lactobacillus reuteri* strains in converting glycerol into 3-hydroxypropionic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 177:923–939.

DOI: 10.1007/s12010-015-1787-8

G. Burgé, A. Flourat, B. Pollet, H.E. Spinnler, F. Allais (2015 c) 3-Hydroxypropionaldehyde (3-HPA) quantification by HPLC using synthetic acrolein-free 3-hydroxypropionaldehyde system as analytical standard. *RSC Advances* 5:92619–92627.

DOI: 10.1039/C5RA18274C

M. Moussa, **G. Burgé**, F. Chemarin, R. Bounader, C. Saulou-Bérion, H.E. Spinnler, F. Allais, V. Athès (2015) Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*.

DOI: 10.1002/jctb.4813

G. Burgé, F. Chemarin, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.E. Spinnler, V. Athès (2016) Optimization of biobased 3-HP reactive extraction using hollow-fiber membrane contactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*.

DOI: 10.1002/jctb.4878

G. Burgé, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Chemarin, M. Kniest, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. 3-hydroxypropionic acid extractive bioconversion: study of inhibition phenomena during glycerol bioconversion, membrane assisted reactive extraction and their integrated process. (En cours).

Liste des communications

Communications orales

* : orateur

G. Burgé*, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. Production par voie microbienne et extraction *in situ* d'acide 3-hydroxypropionique : Apport de la cytométrie en flux dans l'étude de la biocompatibilité du procédé. 11ème congrès national de la Société Française de Microbiologie (SFM 11). 23–25 mars 2015, Paris, France.

M. Moussa*, **G. Burgé**, F. Chemarin, C. Saulou-Bérion, M. Chadni, H.E. Spinnler, F. Allais, V. Athès. Membrane-assisted reactive extraction of biobased 3-hydroxypropionic acid through an integrated process of extractive bioconversion. Euromembrane 2015. 6–10 septembre 2015, Aachen, Allemagne.

G. Burgé, C. Saulou-Bérion*, M. Moussa, F. Allais, H.E. Spinnler, V. Athès. Glycerol bioconversion for 3-hydroxypropionic acid production through an integrated process including *in situ* product recovery. 3rd European Congress of Applied Biotechnology (ECAB 3). 27 septembre – 1 octobre 2015, Nice, France.

G. Burgé*, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, M. Kniest, F. Chemarin, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. Caractérisation de l'inhibition liée à l'intégration de la production biotechnologique d'acide 3-hydroxypropionique à son extraction *in situ* assistée par contacteur membranaire. 19^{ème} congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie en Flux (AFC 19). 18–20 novembre 2015, Antibes, France (**Finaliste Prix jeune cytométriste 2015**)

Communications affichées

* : orateur

G. Burgé*, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. Biotechnological production of 3-hydroxypropionic acid: bioconversion of glycerol by three strains of *Lactobacillus reuteri*. 2nd International Symposium on Green Chemistry, renewable carbon and Eco-Efficient Processes (ISGC2). 21–24 mai 2013, La Rochelle, France.

G. Burgé*, M. Moussa, V. Athès, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.E. Spinnler. *In Situ* extraction of 3-hydroxypropionic acid assisted by membrane contactor. 4th International Congress on Green Process Engineering (GPE4). 7–10 avril 2014, Séville, Espagne.

G. Burgé, M. Moussa*, V. Athès, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.E. Spinnler. *In Situ* extraction of 3-hydroxypropionic acid assisted by membrane contactor. Intégration des membranes dans les bioprocédés (MEMPRO5). 9–11 avril 2014, Toulouse, France.

G. Burgé*, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. Integrated approach coupling microbiological process and *in situ* product recovery for the production of 3-hydroxypropionic acid by *Lactobacillus reuteri*. 10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses (ESBES10 and IFIBIOP6). 7–10 septembre 2014, Lille, France. (**Prix ESBES du meilleur poster**)

M. Moussa*, **G. Burgé**, C. Saulou-Bérion, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. Reactive extraction of 3-HP acid using tertiary and quaternary amines in decanol and comparison with its isomer 2-HP acid. 10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses (ESBES10 and IFIBIOP6). 7–10 septembre 2014, Lille, France.

G. Burgé*, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. Production par voie microbienne et extraction *in situ* d'acide 3-hydroxypropionique : Vers un procédé intégré couplant procédés "upstream" et "downstream". 11ème congrès national de la Société Française de Microbiologie (SFM 11). 23–25 mars 2015, Paris, France.

G. Burgé, F. Chemarin*, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, F. Allais, H.E. Spinnler, V. Athès. 3-hydroxypropionic acid production and extraction starting from glycerol: contribution of process engineering in an ecodesign approach. 3rd International Symposium on Green Chemistry (ISGC3). 3–7 mai 2015, La Rochelle, France.

G. Burgé*, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. Production par voie microbienne et extraction *in situ* d'acide 3-hydroxypropionique : Vers un procédé intégré couplant procédés "upstream" et "downstream". 20ème Club des Bactéries Lactiques (CBL 20). 17–19 juin 2015, Lille, France.

G. Burgé*, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. Production par voie microbienne de l'acide 3-hydroxypropionique couplée à son extraction réactive *in situ* par contacteur membranaire : Impact sur l'état physiologique de *Lactobacillus reuteri*. 20ème Club des Bactéries Lactiques (CBL 20). 17–19 juin 2015, Lille, France.

F. Chemarin*, M. Moussa, **G. Burgé**, Florent Allais, Violaine Athès. Reactive liquid-liquid extraction and back-extraction of bio-based 3-hydroxypropionic acid: towards the implementation of an integrated process of extractive bioconversion. 10th European Congress of Chemical Engineering (ECCE10). 27 septembre – 1 octobre 2015, Nice, France.

G. Burgé, M. Moussa, C. Saulou-Bérion, M. Kniest, F. Chemarin, F. Allais, V. Athès, H.E. Spinnler. Caractérisation de l'inhibition liée à l'intégration de la production biotechnologique d'acide 3-hydroxypropionique à son extraction *in situ* assistée par contacteur membranaire. 19^{ème} congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie en Flux (AFC 19). 18–20 novembre 2015, Antibes, France.

SYMBOLES

ΔC^0 :	force motrice initiale (mol.m^{-3})
ΔC :	force motrice au temps t (mol.m^{-3})
ΔP_c :	pression critique dans un contacteur à membrane (Pa)
γ :	tension interfaciale entre deux fluides (N.m^{-1})
τ :	temps caractéristique (s)
θ_c :	angle de contact critique entre un matériau et deux liquides ($^\circ$)
μ :	taux de croissance (h^{-1})
A :	aire interne des pores (m^2)
C_{aq}^0 :	concentration initiale de soluté en phase aqueuse (mol.m^{-3})
C_{aq} :	concentration de soluté en phase aqueuse au temps t (mol.m^{-3})
C_{org}^0 :	concentration initiale de soluté en phase organique (mol.m^{-3})
k :	coefficient de transfert global (m.s^{-1})
K_D :	coefficient de distribution
$\text{pH}_{V_{\text{max}}}$:	pH à V_{max}
Q_{aq} :	débit de phase aqueuse ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$)
Q_{org} :	débit de phase organique ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$)
r :	rayon des pores de la membrane (m)
R_{aq} :	résistance au transfert de matière côté aqueux
R_{membrane} :	résistance au transfert dans la membrane du contacteur
R_{org} :	résistance au transfert côté organique
R_T :	résistance totale au transfert de matière
t :	temps (s)
t_g :	temps de génération (h)
T_g :	température de transition vitreuse ($^\circ\text{C}$)
T_m :	température de fusion ($^\circ\text{C}$)
t_{pH} :	temps nécessaire pour atteindre une valeur de pH donnée (h)
t_r :	temps de rétention (min)
$t_{V_{\text{max}}}$:	temps nécessaire pour atteindre V_{max} (h)
V_{aq} :	volume de phase aqueuse à l'intérieur des fibres du contacteur (m^3)
V_{max} :	vitesse maximale d'acidification (h^{-1})
V_{org} :	volume de phase organique dans la calandre du contacteur (m^3)
$Y\%$:	pourcentage d'extraction de l'acide en phase organique

ABRÉVIATIONS

1,2-PDO :	1,2-propanediol
1,3-PDO :	1,3-propanediol
2-HP :	Acide 2-hydroxypropionique
3-HB :	Acide 3-hydroxybutyrique
3-HP :	Acide 3-hydroxypropionique
3-HPA :	3-hydroxypropionaldéhyde
4-HB :	Acide 4-hydroxybutyrique
6PG :	6-phosphogluconate
ABC :	<i>ATP Binding Cassette</i>
ABI :	Agro-Biotechnologies Industrielles
AcCoA :	Acétyl coenzyme A
AcP :	Acétyl phosphate
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNr :	ADN ribosomique
ATCC :	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP :	Adénosine Triphosphate
BCEF :	2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5-(and-6)-carboxyfluoresceine
BNICE :	<i>Biochemical Network Integrated Computational Explorer</i>
CAS :	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CEBB :	Centre Européen en Biotechnologies et Bioéconomie
cF :	Carboxyfluorescéine
cFDA :	Carboxyfluorescéine diacétate
cFDA-SE :	Carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester
cF-SE :	Carboxyfluorescéine succinimidyl ester
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CoA :	Coenzyme A
DHAP :	Dihydroxyacétone phosphate
DHE :	Dihydroéthidium
DSM :	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</i>
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DMSP :	Diméthylsulfopropionate
DO :	Densité Optique
DoE :	<i>Department of Energy</i>

EHEC :	Entéro-Hémorragique <i>E. coli</i>
ETEC :	Entéro-Toxigénique <i>E. coli</i>
EMP :	<i>Embden-Meyerhof Pathway</i>
ERCM :	Extraction Réactive par Contacteur à Membrane
ERLL :	Extraction Réactive Liquide-Liquide
ESI-MS :	<i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i>
F6P :	Fructose-6-phosphate
F :	Fluorescéine
FAO :	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FBP :	Fructose-1,6-bisphosphate
FDA :	Fluorescéine Diacétate
fpm :	Force proton motrice
FSC :	<i>Forward-angle Light Scatter</i>
G6P :	Glucose-6-phosphate
GAP :	Glyceraldéhyde-3-phosphate
GC-MS :	<i>Gas Chromatography-Mass spectrometry</i>
GMPA :	Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires
G.R.A.S. :	<i>Generally recognized as safe</i>
H ₂ DcFDA :	Dichlorodihydrofluorescéine
HE :	Hydroéthidine
HPLC :	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSP :	<i>Heat Shock Proteins</i>
IARC :	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IEA :	<i>International Energy Agency</i>
INRA :	Institut National de la Recherche Agronomique
IP :	Iodure de Propidium
IR :	Infrarouge
ISPR :	<i>In Situ Product Recovery (Removal)</i>
IUPAC :	<i>International union of pure and applied chemistry</i>
LAB :	<i>Lactic Acid Bacteria</i>
MI :	Mac Ilvaine
MIBK :	<i>Methyl-Isobutyl-Ketone</i>
MIP :	<i>Molecular Imprinted Polymer</i>
MRS :	de Man Rogosa et Sharp
NAD :	Nicotinamide Adénine Dinucleotide

OGM :	Organisme Génétiquement Modifié
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PA :	Polyamide
PBS :	<i>Potassium Buffered Saline</i>
PC :	Préculture
PE :	Polyéthylène
PFA :	Polytétrafluoroéthylène-co-perfluorovinyléther
pH :	Potentiel hydrogène
pHe :	pH extracellulaire
pHi :	pH intracellulaire
pKa :	constante de dissociation d'un acide
PKP :	<i>Phospho Ketolase Pathway</i>
PLA :	<i>PolyLactic Acid</i>
PO :	Polyoléfine
PP :	Polypropylène
PPB :	<i>Potassium Phosphate Buffer</i>
ppm :	Partie par million
PTFE :	Polytétrafluoroéthylène
PVDF :	Polyvinylidène fluoride
R5P :	Ribulose-5-phosphate
RI :	<i>Refractive Index</i>
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS :	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm :	<i>Raw per minute</i>
SSC :	<i>Side-angle Light Scatter</i>
TDA :	Tridodécylamine
TOPO :	Triocylphosphine oxyde
TOA :	Triocylamine
TBP :	Tributylphosphate
TMS :	Triméthylsilyle
UDO :	unité de DO
UMR :	Unité Mixte de Recherche
UV :	Ultra-Violet
X5P :	Xylulose-5-phosphate

MICRO-ORGANISMES

<i>A. ambivalens</i> :	<i>Acidianus ambivalens</i>
<i>A. brierleyi</i> :	<i>Acidianus brierleyi</i>
<i>A. faecalis</i> :	<i>Alcaligenes faecalis</i>
<i>A. brasilense</i> :	<i>Azospirillum brasilense</i>
<i>B. amaracrylus</i> :	<i>Bacillus amaracrylus</i>
<i>B. coagulans</i> :	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>B. subtilis</i> :	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. fragilis</i> :	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>B. thetaiotaomicron</i> :	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
<i>B. vulgatus</i> :	<i>Bacteroides vulgatus</i>
<i>B. adolescentis</i> :	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>B. bifidum</i> :	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>B. breve</i> :	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>B. catenulatum</i> :	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>
<i>B. longum</i> :	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>C. aurantiacus</i> :	<i>Chlorofexus aurantiacus</i>
<i>C. freundii</i> :	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>C. butyricum</i> :	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>C. clostridioforme</i> :	<i>Clostridium clostridioforme</i>
<i>C. difficile</i> :	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. tyrobutyricum</i> :	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
<i>C. aerofaciens</i> :	<i>Colinsella aerofaciens</i>
<i>C. necator</i> :	<i>Cupriavidus necator</i>
<i>D. phaseolorum</i> :	<i>Diaporthe phaseolorum</i>
<i>E. faecium</i> :	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. biforme</i> :	<i>Eubacterium biforme</i>
<i>E. eligens</i> :	<i>Eubacterium eligens</i>
<i>K. pneumoniae</i> :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. acidophilus</i> :	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. bulgaricus</i> :	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>L. casei</i> :	<i>Lactobacillus casei</i>

<i>L. collinoides</i> :	<i>Lactobacillus collinoides</i>
<i>L. delbrueckii</i> :	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>L. fermentum</i> :	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>L. fructivorans</i> :	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
<i>L. helveticus</i> :	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>L. homohiochi</i> :	<i>Lactobacillus homohiochi</i>
<i>L. plantarum</i> :	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. reuteri</i> :	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>L. rhamnosus</i> :	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>L. salivarius</i> :	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>L. lactis</i> :	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. fallax</i> :	<i>Leuconostoc fallax</i>
<i>L. innacua</i> :	<i>Listeria innacua</i>
<i>L. ivanovii</i> :	<i>Listeria ivanovii</i>
<i>M. betulinum</i> :	<i>Melanconium betulinum</i>
<i>M. sedula</i> :	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>P. polymixa</i> :	<i>Paenibacillus polymixa</i>
<i>P. phaseoli</i> :	<i>Phomopsis phaseoli</i>
<i>P. pentosaceus</i> :	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>P. denitrificans</i> :	<i>Pseudomonas denitrificans</i>
<i>R. eutropha</i> :	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>R. productus</i> :	<i>Ruminococcus productus</i>
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. kluyveri</i> :	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>S. enterica</i> :	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. typhi</i> :	<i>Salmonella typhi</i>
<i>S. typhimurium</i> :	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>S. sonnei</i> :	<i>Shigella sonnei</i>
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. lactis</i> :	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>S. salivarius</i> :	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. metallicus</i> :	<i>Sulfolobus metallicus</i>
<i>V. cholerae</i> :	<i>Vibrio cholerae</i>

ENZYMES

AldH :	aldéhyde déshydrogénase	3-HPA → 3-HP
DhaB :	glycérol déshydratase	glycérol → 3-HPA
DhaD :	glycérol déshydrogénase	glycérol → DHA
DhaK :	dihydroxyacétone kinase	DHA → DHAP
DhaLKM :	dihydroxyacétone kinase	DHA → DHAP
DhaR :	facteur de réactivation de DhaB	
DhaT :	1,3-propanediol oxydoréductase	3-HPA → 1,3-PDO
GDH :	glycérol déshydratase	glycérol → 3-HPA
GldA :	glycérol déshydrogénase	glycérol → DHA
GlpD :	glycérol phosphate déshydrogénase	glycérol-3P → DHAP
GlpF :	glycérol symporteur (transporteur)	glycérol _{ext} → glycérol _{int}
GlpK :	glycérol kinase	glycérol → glycérol-3P
GlpR :	facteur de régulation de l'utilisation de glycérol	
KGSADH :	α-cétoglutarique semialdéhyde désyhdogénase	3-HPA → 3-HP
LdhA :	lactate déshydrogénase	pyruvate → lactate
PduCDE :	diol déshydratase	glycérol → 3-HPA
PduF :	transporteur du glycérol	glycérol _{ext} → glycérol _{int}
PduL :	phosphotransacylase	3-HP-CoA → 3-HP-P
PduP :	propionaldéhyde déshydrogénase	3-HPA → 3-HP-CoA
PduQ :	1,3-propanediol oxydoréductase	3-HPA → 1,3-PDO
PduW :	propionate kinase	3-HP-P → 3-HP
PhaC :	polyhydroxylalkanoate synthase	3-HP-CoA → poly(3-HP)
PSALDH :	semialdéhyde déshydrogénase	3-HPA → 3-HP
PuuC :	aldéhyde déshydrogénase	3-HPA → 3-HP
NOX :	NADH oxydase	
YqhD :	alcool déshydrogénase / aldéhyde réductase	3-HPA → 1,3-PDO

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART	10
Introduction : la bioconversion extractive, un sujet de recherche d'intérêt croissant	10
1 – Production biotechnologique de 3-HP : limites et enjeux	13
1.1 Le 3-HP, un synthon d'intérêt industriel	13
1.1.1 Le 3-HP : un isomère de l'acide lactique aux propriétés physico-chimiques intéressantes	13
1.1.2 Le 3-HP : de nombreuses applications potentielles	14
1.1.2.1 Le 3-HP comme molécule plateforme	14
1.1.2.2 Le 3-HP comme précurseur d'acide acrylique biosourcé	15
1.1.2.3 Synthèse de polymères bio-sourcés à base de 3-HP	18
1.2 Production de 3-HP : intérêts de la voie biotechnologique par rapport à la voie chimique	20
1.2.1 Synthèse de 3-HP par voie chimique : réactions décrites et verrous rencontrés	20
1.2.2 Synthèse de 3-HP par voie biotechnologique : des espoirs mesurés.....	22
1.2.2.1 Voies naturelles : diversité des voies de synthèse.....	23
1.2.2.2 Voies OGM : diversité de substrats	26
1.2.2.3 Voies hypothétiques : l'apport des technologies <i>in silico</i>	30
1.3 <i>Lactobacillus reuteri</i> : une bactérie lactique naturellement productrice de 3-HP.....	31
1.3.1 Caractéristiques et intérêts des bactéries lactiques.....	31
1.3.2 Caractéristiques générales de <i>Lactobacillus reuteri</i>	32
1.3.2.1 <i>L. reuteri</i> : une bactérie connue et isolée de nombreux écosystèmes.....	32
1.3.2.2 <i>L. reuteri</i> : une bactérie probiotique déjà commercialisée	33
1.3.3 Production biotechnologique du 3-HP : une stratégie en deux étapes	34
1.3.3.1 Croissance sur milieu carboné : métabolisme hétéro-fermentaire	34
1.3.3.2 Bioconversion du glycérol en 3-HP : un système complexe.....	36
1.3.3.2.1 Voie de bioconversion du glycérol en 3-HP chez <i>L. reuteri</i>	36
1.3.3.2.2 Le glycérol, une source de carbone disponible et prometteuse.....	37
1.3.3.2.3 Le 3-HPA, intermédiaire métabolique de la voie du 3-HP	40
1.3.3.2.4 Le 1,3-PDO, une molécule d'intérêt déjà valorisée	45
1.4 Enjeux pour une bioconversion optimisée du glycérol en 3-HP	48

1.4.1 Disponibilité des cofacteurs et synthèse de vitamine B12	48
1.4.2 Inhibition et toxicité provoquées par le substrat et les métabolites.....	49
1.4.2.1 Inhibition et toxicité du 3-HPA : un stress connu et en partie caractérisé	50
1.4.2.2 Inhibition et toxicité provoquées par le 3-HP : deux effets potentiels à discriminer (molécule et pH).....	53
1.4.2.3 Évaluation de l'état physiologique des bactéries productrices par fluorescence	55
1.4.2.3.1 Evaluation de l'intégrité membranaire : une estimation de la mortalité cellulaire.....	56
1.4.2.3.2 Mesure de l'activité estérasique : une estimation de la viabilité cellulaire	57
1.4.2.3.3 Estimation du stress oxydatif : détection de l'anion superoxyde OH ⁻	57
1.4.2.3.4 Estimation du pH intracellulaire	59
Résumé de la première partie :.....	60
2 – Extraction sélective <i>in situ</i> des acides organiques en milieu aqueux	61
2.1 Extraction <i>in situ</i> de molécules d'intérêt.....	61
2.1.1 Impact de l'ISPR.....	61
2.1.2 Choix de la technique d'ISPR en fonction de la molécule à extraire.....	62
2.1.3 Configurations possibles de l'ISPR	64
2.2 Procédés de séparation pour la récupération des acides carboxyliques	67
2.2.1 Précipitation aux sels de calcium	67
2.2.2 Distillation extractive.....	67
2.2.3 Chromatographie d'échange d'ions	67
2.2.4 Électrodialyse.....	68
2.2.5 Extraction liquide/liquide réactive	69
2.3 Extraction liquide-liquide réactive	72
2.3.1 Propriétés et critères de choix des molécules extractantes.....	72
2.3.2 Propriétés et critères de choix du diluant	76
2.3.3 Récupération de l'acide et régénération de l'extractant (back-extraction ou désextraction)	78
2.3.4 Impact de la phase organique extractante	80
2.3.4.1 Toxicité générale des solvants et extractants organiques.....	80
2.3.4.2 Toxicité à l'échelle moléculaire (<i>Molecular level toxicity</i>).....	82
2.3.4.3 Toxicité par contact direct entre phases (<i>Phase level toxicity</i>)	83
2.4 Extraction liquide-liquide assistée par contacteur à membrane	84
2.4.1 Applications de l'extraction en contacteur à membrane	84
2.4.2 Principe et mise en œuvre de l'extraction liquide-liquide à membrane	85

2.4.2.1 Principe de l'extraction liquide-liquide à membrane	85
2.4.3 Transfert de matière dans les contacteurs membranaires.....	88
2.4.3.1 Profil de concentration et résistance au transfert	88
2.4.3.2 Détermination du coefficient de distribution apparent K_D	89
2.4.5 Utilisation de contacteurs membranaires en fermentations extractives	93
Résumé de la deuxième partie :	96
3 – Problématique, hypothèses de travail et objectifs de la thèse.....	97
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	102
1 – Bioconversion du glycérol en 3-HP par voie microbienne.....	102
1.1 Bactéries et milieu de culture	102
1.1.1 Souches de <i>Lactobacillus reuteri</i> mises en œuvre et analyses bioinformatiques développées pour leur comparaison.....	102
1.1.2 Milieu de culture utilisé	103
1.2 Obtention de la biomasse	104
1.2.1 Protocole général de réalisation des cultures	104
1.2.2 Réalisation des pré-cultures	105
1.2.3 Croissances en flacons Schott	106
1.2.3.1 Evaluation de la cinétique et du rendement de croissance	106
1.2.3.2 Production de biomasse pour la bioconversion en flacons Schott	106
1.2.4 Croissances en bioréacteur	107
1.2.4.1 Équipements utilisés et paramètres contrôlés.....	107
1.2.4.2 Inoculation du bioréacteur.....	108
1.3 Bioconversion du glycérol par <i>L. reuteri</i>	109
1.3.1 Protocole général de réalisation des bioconversions.....	109
1.3.2 Récolte et lavage des bactéries.....	109
1.3.3 Bioconversion en mode « batch »	110
1.3.3.1 Bioconversions en flacon Schott.....	110
1.3.3.2 Bioconversions en bioréacteur	111
1.3.3.2.1 Équipements utilisés et mesures réalisées	111
1.3.3.2.2 Mise en œuvre des bioconversions.....	111
1.3.4 Bioconversion en mode discontinu alimenté (mode « fed-batch »).....	112
1.3.4.1 Équipements utilisés et suivi des bioconversions	112

1.3.4.2 Réalisation d'une bioconversion avec apport contrôlé de glycérol (mode « fed-batch »)	113
1.4 Analyses effectuées à l'échelle de la population bactérienne	113
1.4.1 Correspondances entre les différentes mesures de la concentration bactérienne.....	113
1.4.2 Analyse de la cultivabilité cellulaire et détermination de la masse sèche.....	114
1.4.3 Analyse de la cinétique d'acidification des milieux de croissance et de bioconversion.....	114
1.4.3.1 Principe et descripteurs de l'activité acidifiante	114
1.4.3.2 Dispositif expérimental	115
1.4.3.3 Protocole de mesure	116
1.4.4 Étude de l'impact du 3-HP sur la croissance de <i>L. reuteri</i>	116
1.4.4.1 Système expérimental	117
1.4.4.2 Protocole de mesure	117
1.4.4.3 Stress appliqué : protocole et plans de plaques.....	118
1.4.5 Analyse et dosage des constituants des milieux de croissance et de bioconversion	119
1.4.5.1 Identification de la nature des constituants du milieu par GC-MS	119
1.4.5.1.1 Système expérimental	119
1.4.5.1.2 Préparation des échantillons.....	120
1.4.5.1.3 Analyse des résultats	122
1.4.5.2 Dosage des constituants du milieu par HPLC.....	122
1.4.5.2.1 Système expérimental	122
1.4.5.2.2 Préparation des échantillons.....	123
1.4.5.2.3 Analyse des résultats	124
1.4.5.3 Analyse par RMN C ¹³	125
1.4.5.3.1 Système expérimental	125
1.4.5.3.2 Préparation des échantillons.....	125
1.4.5.3.3 Analyse des résultats	125
1.5 Analyses effectuées à l'échelle de la cellule unique par cytométrie en flux.....	125
1.5.1 Détection de la fluorescence de cellules uniques par cytométrie en flux.....	126
1.5.1.1 Système expérimental	126
1.5.1.2 Acquisition et analyse des données.....	127
1.5.2 Marquages des cellules	127
1.5.2.1 Viabilité et mortalité cellulaire.....	128
1.5.2.2 Stress oxydatif.....	129
1.5.2.3 pH intracellulaire.....	130

2 – Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP assistée par contacteur à membrane.....	132
2.1 Préparation des phases organiques et des phases aqueuses modèles	132
2.1.1 Préparation des phases aqueuses modèles et réelles	132
2.1.2 Préparation des phases organiques d'extraction	132
2.1.3 Mesure des viscosités des phases organiques	133
2.1.3.1 Système expérimental	133
2.1.3.2 Protocole de mesure	133
2.1.3.3 Analyse des résultats	134
2.2 Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP en ampoules à décanter	135
2.2.1 Extraction réactive en mode non dispersif	135
2.2.2 Extraction réactive en mode dispersif	136
2.2.3 Caractérisation des performances de l'extraction	136
2.2.3.1 Rendement d'extraction en phase organique	136
2.2.3.2 Coefficient de distribution apparent K_D	137
2.3 Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP en contacteur membranaire	137
2.3.1 Présentation et mise en œuvre de l'installation expérimentale d'extraction liquide-liquide à membrane.....	137
2.3.1.1 Description du pilote : le contacteur membranaire Liqui-Cel® X50	137
2.3.1.2 Fonctionnement de l'installation expérimentale	138
2.3.1.3 Nettoyage du module	139
2.3.2 Suivi cinétique de l'extraction	141
3 – Intégration de la production par voie microbienne et de l'extraction <i>in situ</i> du 3-HP	142
3.1 Description du système intégré	142
3.2 Mise en œuvre du procédé intégré	144
3.2.1 Stabilisation de l'interface entre phase aqueuse et phase organique.....	144
3.2.2 Initiation de la bioconversion et début de l'extraction	145
3.3 Déroulement des expériences	145
3.3.1 Suivi de la composition de la phase aqueuse	145
3.3.2 Suivi de la cinétique d'extraction en phase organique	145
3.4 Etude de l'impact du procédé intégré sur l'état physiologique de <i>L. reuteri</i>	146

3.4.1 Impact des métabolites de la voie de biosynthèse.....	146
3.4.2 Impact de la circulation des bactéries dans le module	146
3.4.3 Impact de la fraction soluble de la phase organique extractante (<i>molecular level toxicity</i>).....	147
3.4.4 Impact du contact direct entre phase aqueuse et phase organique (<i>phase level toxicity</i>).....	147
4 – Synthèse chimique, caractérisation et dosage du 3-HPA	149
4.1 Contexte et objectifs de l'étude	149
4.2 3-Hydroxypropionaldehyde (3-HPA) quantification by HPLC using synthetic acrolein-free 3-hydroxypropionaldehyde system as analytical standard.....	150
4.3 Conclusion et perspectives de l'étude	160

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION..... 162

1 – Bioconversion du glycérol en 3-HP par voie microbienne.....	162
1.1 Croissance sur glucose et utilisation des voies métaboliques chez <i>L. reuteri</i>	162
1.1.1 Contexte et objectifs de l'étude.....	162
1.1.2 Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or Phospho-Ketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse <i>Lactobacillus reuteri</i> strains.....	163
1.1.3 Conclusion et perspectives de l'étude	175
1.2 Bioconversion du glycérol en 3-HP par <i>L. reuteri</i> et impact sur l'état physiologique des bactéries productrices	176
1.2.1 Contexte et objectifs de l'étude.....	176
1.2.2 Diversity of <i>Lactobacillus reuteri</i> strains in converting glycerol into 3-hydroxypropionic acid.....	177
1.2.3 Optimisation de la bioconversion : mise en œuvre en bioréacteur et conduite en mode "fed-batch"	198
1.2.4 Etude de l'inhibition induite par le 3-HP sur <i>L. reuteri</i>	203
1.2.5 Conclusion et perspectives de l'étude	208
2 – Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP	210
2.1 Impact de la composition de la phase organique sur l'extraction réactive du 3-HP	210
2.1.1 Contexte et objectifs de l'étude.....	210
2.1.2 Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid	211
2.1.3 Conclusion et perspectives de l'étude	222
2.2 Optimisation de l'ERCM du 3-HP sur milieu modèle et réel de bioconversion.....	223
2.2.1 Contexte et objectifs de l'étude.....	223

2.2.2 Optimization of biobased 3-hydroxypropionic acid reactive extraction assisted by hollow-fiber membrane contactor using tri-n-octyl-amine and Aliquat 336 in <i>n</i> -decanol.....	224
2.2.3 Conclusion et perspectives de l'étude	233
3 – Intégration de la production par voie microbienne et de l'extraction réactive <i>in situ</i> du 3-HP	234
3.1 Contexte et objectifs de l'étude	234
3.2 3-hydroxypropionic acid extractive bioconversion: study of inhibition phenomena during glycerol bioconversion, membrane assisted reactive extraction and their integrated process	235
3.3 Conclusion et perspectives de l'étude	256
CHAPITRE IV : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	258
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	270
ANNEXES	305
ANNEXE I : Résultats de l'analyse bibliographique par recherche de mots clefs dans la base de données <i>Web of Knowledge</i>	306
ANNEXE II : Métabolisme du glycérol chez <i>K. pneumoniae</i> et <i>E. coli</i>	307
ANNEXE III : Résumé des études portant sur la fermentation extractive d'acides organiques entre 2003 et 2014	309
ANNEXE IV : Liste des acides organiques séparés par extraction réactive recensés dans la littérature	313
ANNEXE V : Tableau de synthèse des différentes valeurs de K_D reportées dans la littérature dans le cas de l'acide lactique en fonction du diluant et des extractants utilisés	315
ANNEXE VI : Protocole d'utilisation du bioréacteur Sétric 7L.....	317
ANNEXE VII : Protocole d'utilisation du bioréacteur Sartorius Biostat A plus	322

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART

Figure I.0.1 : Nombre de publications dans la littérature en réponse à la recherche de différents mots clefs (précisés sur le graphique) au 02 septembre 2015	12
Figure I.1.1 : Molécule d'acide 3-hydroxypropionique	13
Figure I.1.2 : Le 3-HP, une molécule plateforme à la base de nombreuses applications potentielles	14
Figure I.1.3 : Principaux groupes industriels travaillant sur la production d'acide acrylique biosourcé en utilisant le 3-HP comme intermédiaire.	15
Figure I.1.4 : Voie schématique de production de l'acide acrylique biosourcé décrite par Cargill et Novozymes. Le glucose est d'abord extrait de la biomasse (amidon de maïs) par des procédés enzymatiques avant d'être converti en 3-HP par une souche d' <i>E. coli</i> optimisée par ingénierie métabolique. Le 3-HP est finalement purifié et converti en acide acrylique par voie chimique (déshydratation)	16
Figure I.1.5 : Schéma général du procédé de production d'acide acrylique biosourcé par l'association d'OPX Biotechnologies, Evonik Industries et DOW	17
Figure I.1.6 : Voie de bioconversion du glycérol en poly(3-HP) chez <i>E. coli</i> OGM	18
Figure I.1.7 : Modifications des propriétés thermo-physiques du copolymère poly(3-HB-co-3-HP) en fonction du pourcentage de 3-HP présent. Les températures de transition vitreuse (T _g), de fusion (T _m), la cristallinité et l'enthalpie de fusion sont exprimées en fonction du pourcentage de 3-HP	20
Figure I.1.8 : Différentes voies de synthèse chimique conduisant au 3-HP et principaux inconvénients	22
Figure I.1.9 : Voies métaboliques pour la production de 3-HP à partir du glycérol, incluant les voies CoA-dépendantes et CoA-indépendantes	24
Figure I.1.10 : Le 3-HP comme intermédiaire métabolique chez <i>C. aurantiacus</i> (a), <i>M. sedula</i> (b), <i>A. faecalis</i> (c) et voie de dégradation de la pyrimidine trouvée chez les bactéries et levures	25
Figure I.1.11 : Voies métaboliques pour la production de 3-HP à partir du glucose	29
Figure I.1.12 : Photographie de <i>L. reuteri</i> au microscope électronique à balayage	32
Figure I.1.13 : Exemples de produits à vertus probiotiques contenant <i>L. reuteri</i>	33
Figure I.1.14 : Métabolisme du glucose chez <i>L. reuteri</i>	35
Figure I.1.15 : Voie de bioconversion du glycérol en 3-HP chez <i>L. reuteri</i>	37
Figure I.1.16 : Molécule de glycérol	37
Figure I.1.17 : Principales provenances du glycérol avant (1999) et après (2009) l'explosion de la production mondiale de biodiésel	39
Figure I.1.18 : Dérivés possibles à partir du glycérol	40

Figure I.1.19 : Molécule de 3-HPA	40
Figure I.1.20 : Composition détaillée du système 3-HPA	41
Figure I.1.21 : Dérivés possibles à partir du 3-HPA	42
Figure I.1.22 : Structures chimiques de la carbohydrazide et de la semicarbazide	44
Figure I.1.23 : Molécule de 1,3-PDO	45
Figure I.1.24 : Dérivés possibles à partir du 1,3-PDO	46
Figure I.1.25 : Evolution de la concentration en 3-HPA et de la cultivabilité cellulaire sur milieu gélosé (exprimée en UFC/mL) au cours de la bioconversion du glycérol par <i>L. reuteri</i> et en fonction de la concentration cellulaire initiale	51
Figure I.1.26 : Evaluation de l'effet inhibiteur du 3-HPA (10 mM ajoutés au milieu de culture) produit par 4 souches de <i>L. reuteri</i> (ATCC 55730, ATCC 6475, ATCC 4659 et ATCC 5289) sur la croissance de différents micro-organismes pathogènes	52
Figure I.1.27 : Evaluation de l'activité antibactérienne du 3-HP	54
Figure I.1.28 : Exemples de paramètres cellulaires évalués à l'aide de marqueurs fluorescents physiologiques et taxonomiques	56
Figure I.1.29 : Mode de fonctionnement du marqueur iodure de propidium (IP)	56
Figure I.1.30 : Mode de fonctionnement du marqueur carboxyfluorescéine diacétate (cFDA)	57
Figure I.1.31 : Mode de fonctionnement du marqueur dichlorodihydrofluorescéine (H ₂ DcFDA), ici noté DCFH-DA et exemples de marqueurs utilisés pour la détection des différents ROS existant.	58
Figure I.2.1 : Arbre de décision pour la sélection de la technique ISPR à adopter en fonction de la volatilité et de la charge de l'acide	63
Figure I.2.2 : Contribution totale de chaque catégorie de produit extrait par ISPR entre 2003 et 2014	64
Figure I.2.3 : Configurations possibles en ISPR	66
Figure I.2.4 : Nombre d'articles répertoriés dans la littérature entre 2003 et 2014 en fonction de la configuration ISPR adoptée	66
Figure I.2.5 : Principe de l'extraction liquide-liquide réactive d'un acide organique par utilisation d'un extractant dilué dans un solvant organique	73
Figure I.2.6 : Principe de la récupération de l'acide et régénération de l'extractant	79
Figure I.2.7 : Schéma de principe de l'extraction liquide-liquide à membrane. La pression plus élevée appliquée côté phase non mouillante permet la stabilisation de l'interface	86
Figure I.2.8 : Principaux avantages et inconvénients de l'utilisation des contacteurs à membranes	88

Figure I.2.9 : a) Représentation schématique du contacteur Liqui-Cel® (2,5 × 8, fibres X50 en polypropylène hydrophobe) et b) Profil de concentration en soluté au voisinage d'une membrane hydrophobe	89
Figure I.2.10 : Coefficients de transfert de matière obtenus en contacteur membranaire liquide-liquide avec deux types de membranes : hydrophobe (polypropylène) et hydrophile (cellulose régénérée)	90
Figure I.2.11 : Montage expérimental du couplage fermentation et extraction liquide-liquide réactive assistée par contacteurs à membrane dans le cas de la production d'acide butyrique par <i>C. butyricum</i> à partir de glucose	97
Figure I.2.12 : Montage expérimental du couplage fermentation et extraction liquide-liquide réactive assistée par contacteurs à membrane dans le cas de la production d'acide propionique par <i>Propionibacterium acidipropionici</i> à partir de lactose	98
Figure I.3.1 : Schéma général détaillé du procédé intégré couplant bioconversion du glycérol par <i>L. reuteri</i> et extraction réactive liquide-liquide <i>in situ</i> du 3-HP produit en contacteur à membrane	103

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure II.1.1 : Dendrogramme des différentes souches de <i>L. reuteri</i> séquencées, construit sur le site du NCBI	105
Figure II.1.2 : Schéma général des protocoles d'obtention de la biomasse pour : a) la réalisation d'une bioconversion en flacon Scott, b) la réalisation d'une bioconversion en bioréacteur	108
Figure II.1.3 : Protocoles d'inoculation des cultures pour : a) une croissance de 8 h (i.e. une journée) permettant un suivi de croissance ou la réalisation ultérieure d'une seconde phase de croissance en bioréacteur, et b) une croissance de 16 h (i.e. une nuit) permettant la récolte des bactéries et l'inoculation d'une bioconversion en flacons Schott (pour un suivi sur la journée)	110
Figure II.1.4 : Photographie du bioréacteur Sétric (Sétric Génie Industriel, Toulouse, France)	111
Figure II.1.5 : Protocole de lancement de la croissance en bioréacteur	112
Figure II.1.6 : Protocoles de récolte et lavages préalables à la bioconversion a) en flacon Schott, b) en bioréacteur	113
Figure II.1.7 : Photographie du fermenteur Biostat® A plus (Sartorius Stedim, Aubagne, France)	114
Figure II.1.8 : Photographie du fermenteur Biolafitte Tryton _i (Pierre Gérin Technologies – Biolafitte, Mauze, France)	115
Figure II.1.9 : Schéma simplifié du dispositif CinAc®	118
Figure II.1.10 : Système Bioscreen utilisé pour la mesure de la croissance de <i>L. reuteri</i>	120
Figure II.1.11 : Plan de plaque utilisé pour le test de toxicité du 3-HP au cours de la croissance de <i>L. reuteri</i> sur milieu MRS supplémenté en glucose	121

Figure II.1.12 : Schéma d'ensemble d'un chromatogramme en phase gazeuse (GC)	122
Figure II.1.13 : Schéma de synthèse des phases d'extraction et de concentration des produits de la bioconversion avant injection en GC-MS	124
Figure II.1.14 : Spectres de masse des dérivés TMS du glycérol, du 3-HP et du 1,3-PDO, obtenus après analyses en GC-MS. Les temps de rétention sont indiqués pour chaque molécule	125
Figure II.1.15 : a) Système Bactiflow utilisé pour les analyses effectuées par cytométrie en flux. Évaluation de b) la granularité par le système SSC et c) la taille des cellules par le système FSC	129
Figure II.1.16 : Principe de la focalisation des cellules devant le laser au sein de la cellule d'analyse	130
Figure II.1.17 : Cytogramme obtenu par cytométrie en flux après double marquage cFDA – IP	132
Figure II.1.18 : Cytogramme obtenu par cytométrie en flux après marquage au DHE d'un mélange constitué de 50 % de bactéries stressées (10 min à 80 °C) et de 50 % de bactéries fraîches	133
Figure II.1.19 : Courbe étalon pour la mesure du pH intracellulaire d'un échantillon cellulaire prélevé lors d'un test d'inhibition par le 3-HP sur <i>L. reuteri</i> DSM 17938	134
Figure II.2.1 : Photographie du viscosimètre Contraves Rheomat 115 utilisé pour les mesures de viscosité des phases organiques extractantes testées	136
Figure II.2.2 : Exemples de rhéogrammes obtenus pour les trois composants purs de la phase organique extractante. Décanol, TOA et Aliquat 336 correspondent bien à des liquides de type Newtonien	137
Figure II.2.3 : Protocole d'extraction réactive en mode non dispersif en ampoules à décanter	139
Figure II.2.4 : Schéma du contacteur membranaire Liqui-Cel utilisé pour l'extraction réactive du 3-HP	141
Figure II.2.5 : Schéma de l'installation expérimentale d'extraction liquide-liquide du 3-HP assistée par contacteur à membrane	142
Figure II.2.6 : Protocoles de nettoyage du contacteur en cas d'encrassement organique	144
Figure II.3.1 : a) Photographie du montage expérimental du procédé intégré couplant conversion du glycérol en 3-HP en bioréacteur et extraction liquide-liquide réactive du 3-HP assistée par contacteur membranaire b) Schéma du procédé intégré	146
Figure II.3.2 : Protocole de stabilisation de l'interface entre phase aqueuse et phase organique lors du couplage entre bioconversion bactérienne du glycérol et extraction du 3-HP par contacteur membranaire. Des vannes trois voies permettent de modifier les entrée et sortie de la phase aqueuse	147
Figure II.3.3 : Schéma du montage expérimental pour la détermination de la <i>phase level toxicity</i> en flacons Schott	151

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Figure III.1.1 : Impact du pH sur les performances de bioconversion du glycérol (200 mM soient 18,2 g.L⁻¹) par *L. reuteri* DSM 17938 (10¹⁰ UFC.mL⁻¹) en mode « batch » en bioréacteur (100 rpm, 37°C) 201

Figure III.1.2 : Comparaison des performances de bioconversion de *L. reuteri* DSM 17938 en modes « batch » (concentration initiale en glycérol égale à 22,8 g.L⁻¹) et « fed-batch » (apport de 0,5 g.h⁻¹ de glycérol) à une concentration cellulaire de 2.10¹⁰ UFC.mL⁻¹, pH 5, 37°C, 250 rpm 203

Figure III.1.3 : Influence du débit d'apport de glycérol lors d'une bioconversion en mode « fed-batch » par la souche DSM 17938 (2.10¹⁰ UFC.mL⁻¹, pH 5, 37°C, 250 rpm) 204

Figure III.1.4 : Influence de l'ajout de 3-HP entre 0 et 5 g.L⁻¹ dans le milieu de culture MRS sur la cinétique de croissance bactérienne de trois souches de *L. reuteri* 207

Figure III.1.5 : Evaluation de la production de ROS sous forme d'anion superoxyde (O₂⁻) par *L. reuteri* DSM 17938, après marquage au dihydroéthidium (DHE) et détection par en cytométrie en flux, suite à la mise en contact des bactéries pendant 30 minutes avec différentes concentrations en 3-HP 210

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART

Tableau I.1.1 : Principales caractéristiques et propriétés physico-chimiques du 3-HP	13
Tableau I.1.2 : Micro-organismes producteurs naturels de 3-HP	26
Tableau I.1.3 : Synthèse des différentes études portant sur la production de 3-HP à partir du glycérol en utilisant des micro-organismes recombinants	28
Tableau I.1.4 : Résumé des 7 voies de synthèse du 3-HP à partir du glucose proposées par Cargill	30
Tableau I.1.5 : Principales caractéristiques et propriétés physico-chimiques du glycérol	38
Tableau I.1.6 : Principales caractéristiques et propriétés physico-chimiques du 3-HPA	41
Tableau I.1.7 : Principales caractéristiques et propriétés physico-chimiques du 1,3-PDO	45
Tableau I.1.8 : Activité antimicrobienne du 3-HPA contre différentes familles de bactéries	50
Tableau I.1.9 : Marqueurs permettant l'estimation du pHi et micro-organismes testés	59
Tableau I.2.1 : Bénéfices et impacts potentiels de l'ISPR en mode batch	61
Tableau I.2.2 : Comparaison des différentes techniques d'extraction des acides carboxyliques trouvées dans la littérature à travers l'exemple de l'acide lactique	71
Tableau I.2.3 : Avantages et inconvénients des différents types de molécules extractantes	72
Tableau I.2.4 : Principales caractéristiques physico-chimiques de quelques diluants utilisés pour l'extraction réactive de l'acide lactique référencées dans la littérature	78
Tableau I.2.5 : Toxicité de différents solvants contre différentes bactéries lactiques	81
Tableau I.2.6 : <i>Molecular level toxicity</i> de différentes combinaisons de solvants et extractants contre deux lactobacilles	83
Tableau I.2.7 : <i>Phase level toxicity</i> de différentes combinaisons de solvants et d'extractants contre deux lactobacilles	84
Tableau I.2.8 : Etudes mentionnant l'utilisation de contacteurs à membranes poreuses pour l'extraction réactive de l'acide lactique (2-HP)	94
Tableau I.2.9 : Exemples d'ERCM d'acides carboxyliques et phase organique extractante utilisée	96
Tableau I.2.10 : Comparaison des propriétés physico-chimiques des deux isomères (2-HP et 3-HP)	99

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau II.1.1 : Composition du milieu MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) utilisé pour la croissance de <i>L. reuteri</i>	106
Tableau II.1.2 : Résultats des corrélations entre densité optique (DO) à 600 nm et concentration cellulaire (exprimée en nombre de cellules.mL ⁻¹ , ou en g.L ⁻¹ ou en UFC.mL ⁻¹) pour le dénombrement des bactéries correspondant aux trois souches de <i>L. reuteri</i> utilisées dans cette étude	116
Tableau II.1.3 : Temps de rétention (en min) des molécules dosées par HPLC en fonction des deux détecteurs utilisés (RI : <i>Refractive Index</i> ; UV : Ultra Violet à 210 nm)	127
Tableau II.2.1 : Pureté des différents composants de la phase organique et composition de l'Aliquat 336 données par le fournisseur	135
Tableau II.1.2 : Résultats des mesures de viscosité des différentes phases organiques extractantes	138
Tableau II.2.3 : Dimensions caractéristiques du contacteur membranaire Liqui-Cel® X50 utilisé	140

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La prise de conscience au niveau mondial de l'épuisement des ressources naturelles remonte au début des années 1970. Cette problématique s'est d'abord concentrée sur l'énergie, puis sur les hydrocarbures en tant que sources de carbone. A l'heure actuelle et au niveau mondial, plus de 80 % des ressources énergétiques proviennent de gisements fossiles : pétrole (31 %), charbon (29 %), gaz naturel (21 %)¹. Si on ajoute à ces gisements fossiles pourvoyeurs de dioxyde de carbone (CO₂) les matières premières de l'énergie nucléaire (uranium, thorium), la part des énergies non renouvelables atteint 87 %. Les 13 % restants sont donc fournis par les énergies dites renouvelables : hydroélectricité, géothermie, énergie éolienne, énergie solaire (photovoltaïque et thermique) et biomasse, dans une plus faible mesure¹. Cette tendance ne devrait pas changer dans les décennies à venir, notamment en raison de l'augmentation de la consommation de charbon en Chine et de la production américaine croissante de gaz de schiste². Cependant, les réserves de pétrole et gaz naturel risquent d'être largement consommées avant la fin du XXI^{ème} siècle et le charbon d'ici deux ou trois siècles². Concernant la France, même si la répartition est différente (20 % de l'énergie fournis par le nucléaire et 67 % par les combustibles fossiles), la part de renouvelable n'est également que de 13 %³.

L'utilisation massive des ressources fossiles pour produire de l'énergie a nécessairement eu un impact important sur les prix liés à ses autres usages et notamment ceux de l'industrie chimique. Depuis quelques décennies, les recherches concernant la transformation de la biomasse à l'échelle industrielle sont cependant en mesure d'offrir des produits de substitution dans les trois grands domaines d'application des dérivés du pétrole (carburants et combustibles pour 92 %, matériaux et revêtements routiers pour 3 %, pétrochimie, lubrifiants et autres pour 5 %)⁴. L'essor de cette nouvelle industrie repose notamment sur les progrès scientifiques et technologiques effectués dans les domaines de la chimie du végétal, des biotechnologies microbiennes pour

¹ International Energy Agency - Key World Energy Statistics 2014, p6 - octobre 2014.

² <https://www.terra-symbiosis.org> (consulté en septembre 2015)

³ <https://www.lenergieenquestions.fr> (consulté en septembre 2015)

⁴ http://www.esso.fr/Europe-French/PA/about_que_raffinage_baril.aspx (consulté en septembre 2015)

l'industrie (biotechnologies "blanches") et du génie des procédés ainsi que sur leur mise à l'échelle industrielle.

Dans les pays développés, plus de 100 000 produits chimiques sont utilisés quotidiennement dans des domaines très variés (hygiène, santé, habillement, habitat, transport...) ⁵. Mais cette situation doit aujourd'hui faire face à plusieurs défis majeurs ⁶. En effet, la chimie de synthèse s'est développée en grande partie à partir des ressources minières d'hydrocarbures. Aujourd'hui, l'usage incontournable de carburants liquides et gazeux pour la production énergétique a conduit à une raréfaction de ces réserves fossiles. Par ailleurs, le réchauffement climatique observé est, au moins en partie, lié à l'activité humaine et à la combustion des énergies fossiles déstockées. La montée des préoccupations écotoxicologiques a ainsi conduit à une réflexion concernant la transition d'une économie basée sur l'utilisation des ressources de carbone fossile à celle basée sur l'emploi des ressources renouvelables. La chimie durable ou chimie "verte" est ainsi devenue un axe prioritaire de recherche et développement. Si, en 2011, 90 % des produits chimiques étaient encore pétrosourcés, les estimations à l'horizon 2030 montrent que 25 à 30 % des principales molécules de la chimie pourraient être issues du carbone renouvelable ⁷. Preuve de cette transition, 12 des 15 premières entreprises chimiques mondiales ont une activité de production ou de recherche concernant l'exploitation des sources de carbone renouvelables (BASF, Dow Chemical, Bayer, Dupont...) ⁸. Au niveau français, le développement de la chimie du végétal, une des composantes de la chimie verte, apparaît également comme une priorité, figurant notamment parmi les sept ambitions principales du rapport de la commission Innovation 2030 ⁹.

⁵ European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances. OJC (1990)
<http://esis.jrc.ec.europa.eu/> (consulté en septembre 2015)

⁶ Les molécules biosourcées, Institut Carnot 3BCAR, 2^{ème} forum Recherche Industrie (2014)

⁷ Chimie du carbone vert renouvelable. L'agriculture de demain sera-t-elle en mesure de remplacer les produits pétroliers dans les domaines de la chimie, des matériaux et de l'énergie. Jean-François Morot-Gaudry et Jean-Claude Pernollet (2013)

⁸ Tullo AH, C&EN Northeast news bureau, Global Top 50 : C&EN's 2013 survey

⁹ Un principe et sept ambitions pour l'innovation. Rapport de la commission Innovation 2030 présidée par Anne Lauvergeon (2013)

Une interrogation a cependant vu le jour et suscite de nombreuses inquiétudes, celle de la compétition pour les terres arables, l'utilisation des surfaces pour les bioproduits ne pouvant se faire au détriment de l'alimentation. Ainsi, comme l'a expliqué le directeur général de la FAO, José Graziano da Silva, le 16 janvier 2015 lors du Forum mondial pour l'alimentation et l'agriculture, le modèle de développement agricole intensif basé sur les intrants, très consommateur d'énergie et générateur de pollutions, suivi au cours des 40 dernières années, n'est plus viable. Un changement de paradigme est donc nécessaire en matière de production alimentaire, notamment en travaillant à une transition généralisée et globale vers des systèmes agricoles et des pratiques de gestion des terres durables, ce qui passe par une utilisation plus efficace des ressources naturelles, respectant l'usage alimentaire des récoltes tout en valorisant leur part non alimentaire.

Aujourd'hui, les défis que doit relever l'agriculture sont donc nombreux. Sa vocation première est évidemment de nourrir les habitants de la planète : plus de 7 milliards en 2015, entre 8 et 11 milliards à l'horizon 2050, peut être 16 milliards à la fin du siècle¹⁰. Mais l'un de ses rôles est également de fournir une alternative possible au carbone fossile par l'intermédiaire de la biomasse qu'elle est en mesure de produire. Outre la production de biocarburants de première ou deuxième génération, cette biomasse peut également servir de base pour la synthèse d'intermédiaires chimiques permettant ainsi de substituer un nombre important de molécules issues de l'industrie pétrochimique. C'est dans ce contexte que le Department of Energy américain (DoE) a établi en 2004 (Werpy and Petersen 2004) une liste de 12 molécules prioritaires (ramenée à 10 en 2010 ; Bozell and Petersen 2010) à produire à partir de la biomasse (cf. tableau ci-dessous). Ces molécules plateformes, ou synthons, sont ensuite susceptibles d'être converties en un grand nombre de produits chimiques d'intérêt.

¹⁰ <https://esa.un.org/unpd/wpp> (consulté en septembre 2015)

2004	2010
Acides dicarboxyliques	Acide succinique
Acide 2,5 furan dicarboxylique	Acides furaniques
Acide 3-hydroxy propionique	Acide et aldéhyde hydroxypropionique
Glycérol	Glycérol et dérivés
Sorbitol	sorbitol
Xylitol/arabinitol	xylitol
Acide lévulinique	Acide lévulinique
Acide aspartique	
Acide glucarique	
Acide glutamique	
Acide itaconique	
3-hydroxybutyrolactone	
	paraffines
	Acide lactique
	éthanol

Liste des molécules plateformes identifiées par le Department of Energy américain comme prioritaires à synthétiser à partir de la biomasse, établie en 2004 et revue en 2010.

Outre le développement d'une agro-industrie, l'essor de la bioéconomie repose également sur le développement des régions à partir de leurs avantages spécifiques (compétences, ressources agricoles, localisation géographique)⁵. C'est dans ce cadre qu'un Centre Européen en Biotechnologies et Bioéconomie (CEBB) a été créé sur le pôle agro-industriel de Reims-Pomacle-Bazancourt grâce à un financement de la région Champagne-Ardenne, du conseil général de la Marne et de Reims métropole. Les collectivités locales, aux côtés des structures d'enseignement et de recherche concernées (AgroParisTech, École Centrale Paris, Néoma Business School, Université de Reims), soulignent leur volonté de mener une politique commune pour approfondir leur engagement vers la valorisation non-alimentaire des agro-ressources par l'emploi des biotechnologies blanches. Cette initiative contribue à préparer la société à affronter de grands défis à un niveau global, comme la raréfaction des énergies fossiles et le passage à une économie circulaire (production des biens et des services en limitant la consommation et le gaspillage des matières premières), tout en contribuant au développement des entreprises et de l'emploi au niveau local. C'est dans ce contexte qu'est née en 2012 la Chaire en Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI), sous l'impulsion d'AgroParisTech et grâce au financement de ces collectivités locales, à proximité du site de la bioraffinerie de Pomacle-Bazancourt, près de Reims. Du fait de son expertise en microbiologie, génie des procédés et chimie verte, la chaire ABI est en mesure de répondre, à son échelle, aux défis que représente la mutation d'une économie basée sur

l'exploitation du pétrole et des ressources minérales vers la bioéconomie, basée sur l'utilisation des ressources animales et végétales.

En ce qui concerne le choix de molécules bio-sourcées comme objets d'étude dans le cadre de ce projet, une analyse stratégique, dont la démarche s'inspire de celle du DoE, a été conduite par AgroParisTech (projet ProdExBio¹¹ financé par le conseil scientifique d'AgroParisTech en 2011). Elle visait à identifier les molécules plateformes d'intérêt sur le plan économique et pour lesquelles des compétences scientifiques mobilisables au sein d'AgroParisTech et des UMR de l'INRA concernées en Ile de France et en région Champagne-Ardenne constituaient un atout pour lever les verrous existants. Cette analyse a ainsi conduit à travailler sur l'acide 3-hydroxypropionique, synthon d'intérêt dont la production à partir de ressources renouvelables est limitée par les connaissances actuelles sur les procédés de bioconversion et de séparation.

C'est dans ce contexte que le projet de thèse portant sur une « approche intégrée couplant procédé microbiologique et procédé séparatif *in situ* pour la production d'acide 3-hydroxypropionique », qui vise à valoriser le glycérol issu de la production de biodiesel et à produire par voie biotechnologique l'une des 12 molécules plateformes identifiée par le DoE, a vu le jour au sein de l'Unité Mixte de Recherche « Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires » (UMR 782 GMPA INRA-AgroParisTech, Thiverval-Grignon), avec l'appui financier et scientifique de la Chaire ABI.

Ce manuscrit présente en quatre chapitres principaux l'ensemble des travaux effectués dans le cadre de ce projet de thèse.

Un **état de l'art** est présenté dans le Chapitre 1. Il traitera dans une **première partie** de l'obtention de l'acide 3-hydroxypropionique (3-HP) par voie biotechnologique puis, dans une **deuxième partie**, de différentes méthodes permettant l'extraction *in situ* d'acides organiques en milieux biologiques. Les contraintes et limites de chaque méthode seront discutées et l'intérêt de l'extraction liquide-liquide réactive assistée par contacteur à membrane sera détaillé. En fin de chapitre, la **problématique**, les **hypothèses de travail** ainsi que les **objectifs principaux** de ce travail de thèse seront explicités et illustrés sur la base du schéma général du procédé intégré couplant production microbienne et extraction *in situ* mis en œuvre dans le cadre de la thèse.

¹¹ Projet ProdExBio : "**P**roduction et **E**xtraction de molécules **B**iosourcées"

Le Chapitre 2 sera consacré aux différents **protocoles opératoires et matériels** utilisés dans ce projet. A la fin de ce chapitre, la **publication n°1** détaillera la mise au point de la **synthèse chimique** d'un des produits de la voie de bioconversion, le 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA), ainsi que sa **caractérisation** et la **validation d'une nouvelle méthode de dosage par HPLC**.

Le Chapitre 3 présentera les **résultats principaux** obtenus dans le cadre de ce projet. La **partie 1** traitera de la **croissance bactérienne (publication n°2)** et de la **bioconversion du glycérol en 3-HP (publication n°3)** par trois souches de *L. reuteri*. La réalisation de ces étapes en bioréacteurs (**batch et fed-batch**) et l'étude de l'impact du 3-HP sur **l'état physiologique** des bactéries productrices seront également présentées. Dans la **deuxième partie**, la **formulation de la phase extractante** appropriée pour l'extraction réactive du 3-HP est présentée, ainsi que la comparaison des **performances d'extraction** avec celles atteintes pour son isomère de position (acide lactique ou 2-HP) (**publication n°4**). **L'optimisation de cette extraction** à l'aide d'un contacteur liquide-liquide à membrane et **l'influence de la composition du milieu** (comparaison milieu modèle et milieu réel de bioconversion) sont également détaillées (**publication n°5**). La **partie 3** présentera les résultats des premiers travaux sur le **procédé intégré couplant bioconversion microbienne et procédé séparatif in situ** pour la production de 3-HP, en se focalisant sur **l'impact du couplage des procédés sur l'état physiologique** de *L. reuteri* (**publication n°6**).

Le Chapitre 4 permettra, dans une **conclusion générale**, de reprendre et de **discuter** l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce projet et d'ouvrir sur les **perspectives de travail**.

Pour résumer, la structure générale du manuscrit de thèse est présentée dans le schéma ci-dessous. L'articulation des différents chapitres et parties qui le constituent est ainsi détaillée en fonction du champ disciplinaire mobilisé (génie microbiologique, génie des procédés séparatifs, chimie organique et analytique).

Chapitre 1 : État de l'art

Partie 1 : Production biotechnologique de 3-HP : limites et enjeux

Partie 2 : Extraction sélective *in situ* des acides organiques en milieu aqueux

Partie 3 : Problématique, hypothèses de travail et objectifs de la thèse
Schéma général détaillé du procédé intégré bioconversion-extraction

Partie 1 : Bioconversion du glycérol en 3-HP par voie microbienne

Partie 2 : Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP assistée par contacteur à membrane (ERCM)

Partie 4 : Synthèse, caractérisation et dosage du 3-HPA
(Publication n°1)

Partie 3 : Intégration de la production par voie microbienne et de l'extraction *in situ* du 3-HP

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

Partie 1 : Bioconversion du glycérol en 3-HP par voie microbienne

1.1 Croissance sur glucose et utilisation des voies métaboliques par *L. reuteri* (Publication n°2)

1.2 Bioconversion du glycérol en 3-HP par *L. reuteri* et impact sur l'état physiologique sur les bactéries productrices (Publication n°3)

Partie 2 : Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP

2.1 Impact de la composition de la phase organique sur l'extraction réactive du 3-HP (Publication n°4)

2.2 Optimisation de l'ERCM du 3-HP sur milieu modèle et réel de bioconversion (Publication n°5)

Partie 3 : Intégration de la production par voie microbienne et de l'extraction *in situ* du 3-HP : impact sur l'état physiologique de *L. reuteri* (Publication n°6)

CHAPITRE I :

ÉTAT DE L'ART

CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART

Introduction : la bioconversion extractive, un sujet de recherche d'intérêt croissant

Les acides organiques constituent un groupe clé des molécules plateformes pouvant être synthétisées par transformation de la biomasse (Sauer *et al.* 2008). Celle-ci se définit comme « la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture, y compris les substances végétales et animales issues de la terre et de la mer, de la sylviculture et des industries connexes, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et ménagers » (article L211-2 du code de l'énergie¹²). La biomasse végétale constitue donc une importante réserve d'énergie. On distingue ainsi la biomasse lignocellulosique (bois, paille, résidus verts...), la biomasse riche en sucre et en amidon (betterave, canne à sucre, blé, maïs...) et la biomasse oléagineuse (colza, soja, tournesol...).

La voie microbienne constitue d'ailleurs une méthode incontournable de production de ces acides organiques. Les acides carboxyliques sont généralement produits par fermentation de glucides ou de leurs dérivés (éthanol par exemple), le plus souvent par l'intermédiaire de micro-organismes. On peut citer, comme principaux exemples d'acides organiques produits industriellement par voie microbiologique : l'acide lactique (150 000 T/an), l'acide acétique (190 000 T/an), l'acide citrique (1 600 000 T/an), l'acide gluconique (87 000 T/an) ou encore l'acide succinique (15 000 T/an) qui vise à remplacer l'acide maléique actuellement produit à partir de carbone d'origine fossile (Sauer *et al.* 2009). Du point de vue de la répartition géographique, l'essentiel de la production est localisée en Asie (Mushashino, Yxing, RZBC, BBKA, Jindan), même si l'on trouve aussi des sites de production en Europe (Purac, Galactic, Jungbunzlauer, ARD) et sur le continent Américain (ADM, Cargill, Bioamber). Ces procédés doivent remplir trois critères principaux : efficacité, rentabilité, fiabilité. Les tendances actuelles comprennent la volonté de produire des acides organiques bio-sourcés et l'amélioration des procédés actuels (augmentation de la pureté du produit final). A cette fin, deux alternatives existent, la production par voie microbiologique et par voie biocatalytique ; et trois points de départ sont envisageables (biomasse riche en sucre, oléagineuse, ou lignocellulosique). Toutefois,

¹² <http://www.legifrance.gouv.fr/> (consulté en septembre 2015)

l'acidité naturelle de ces molécules tendant à ralentir puis arrêter la fermentation, le pH est ajusté par ajout d'une base pour retarder ces phénomènes et augmenter le titre en acide atteint dans le milieu de fermentation. La plupart des acides organiques produits le sont donc sous forme de sels. Le principal problème réside dans le fait que le produit d'intérêt est en solution avec de nombreux contaminants (co-produits, sels, protéines, biomasse...) qu'il va falloir éliminer par des étapes d'extraction et de purification. Les procédés de fermentation constituent donc des alternatives intéressantes, mais leur développement industriel est parfois limité par des coûts de purification élevés. Les procédés de séparation et de purification peuvent en effet représenter entre 20 et 50 % des coûts d'investissement et de fonctionnement d'une bioraffinerie par exemple (Ramaswamy *et al.* 2013). La production par voie microbiologique d'acides organiques constitue ainsi une approche prometteuse pour l'obtention de molécules plateformes d'intérêt à partir de carbone renouvelable. Bien que certains acides soient déjà largement produits à l'échelle industrielle, conduisant à une connaissance approfondie des processus de production microbienne, l'utilisation de nouveaux micro-organismes pour la production de nouvelles molécules d'intérêt semble possible. Néanmoins, le passage à l'échelle industrielle et les contraintes technico-économiques que cela impose nécessitent encore des améliorations dans le cas de certaines molécules (Sauer *et al.* 2008).

Actuellement, deux grandes approches d'optimisation de la production par voie microbienne sont étudiées. La première consiste en l'optimisation de micro-organismes par ingénierie métabolique. L'objectif est de réaliser une amélioration dirigée de la synthèse du produit d'intérêt, par la modification de voies métaboliques existantes ou l'introduction de nouvelles voies métaboliques au sein d'un micro-organisme « hôte », afin de parvenir à une production à rendement maximal, à productivité maximale et à titre élevé. La seconde approche est la maîtrise du bioprocédé, tant en aval (« downstream ») qu'en amont (« upstream »). La réalisation d'un système couplant production et extraction permet ainsi d'augmenter titre, productivité et rendement (Lye and Woodley 1999, Stark and von Stockar 2004, Van Hecke *et al.* 2014), et de limiter la toxicité des métabolites produits par les micro-organismes (Boyaval *et al.* 1994). Plusieurs types de couplage ont été étudiés et décrits dans la littérature pour la production d'acides organiques (acide lactique, Xavier *et al.* 1995 ; acide propionique, Jin and Yang 1998 ; acide butyrique, Wu and Yang 2003). Dans le cadre de ce projet, on ne s'intéressera qu'à cette seconde voie d'optimisation, avec la mise au point d'une approche de type ISPR (« *In Situ Product Recovery* »).

L'évolution du nombre de publications et du nombre de citations au cours des 20 dernières années en réponse à une recherche basée sur certains mots clefs dans la base de données « Web of Science » confirme l'intérêt croissant tant de la molécule cible, l'acide 3-hydroxypropionique (3-HP), que de la problématique d'extraction ou encore de l'approche ISPR (Annexe 1). Ainsi, si l'on s'intéresse au nombre de publications parues, on constate que le 3-HP et sa production par voie microbienne restent très peu étudiés au regard des acides carboxyliques en général et notamment de son isomère, l'acide lactique (Figure I.0.1). En revanche, aucun travail concernant l'extraction du 3-HP ou sa production par une approche ISPR n'a été répertorié.

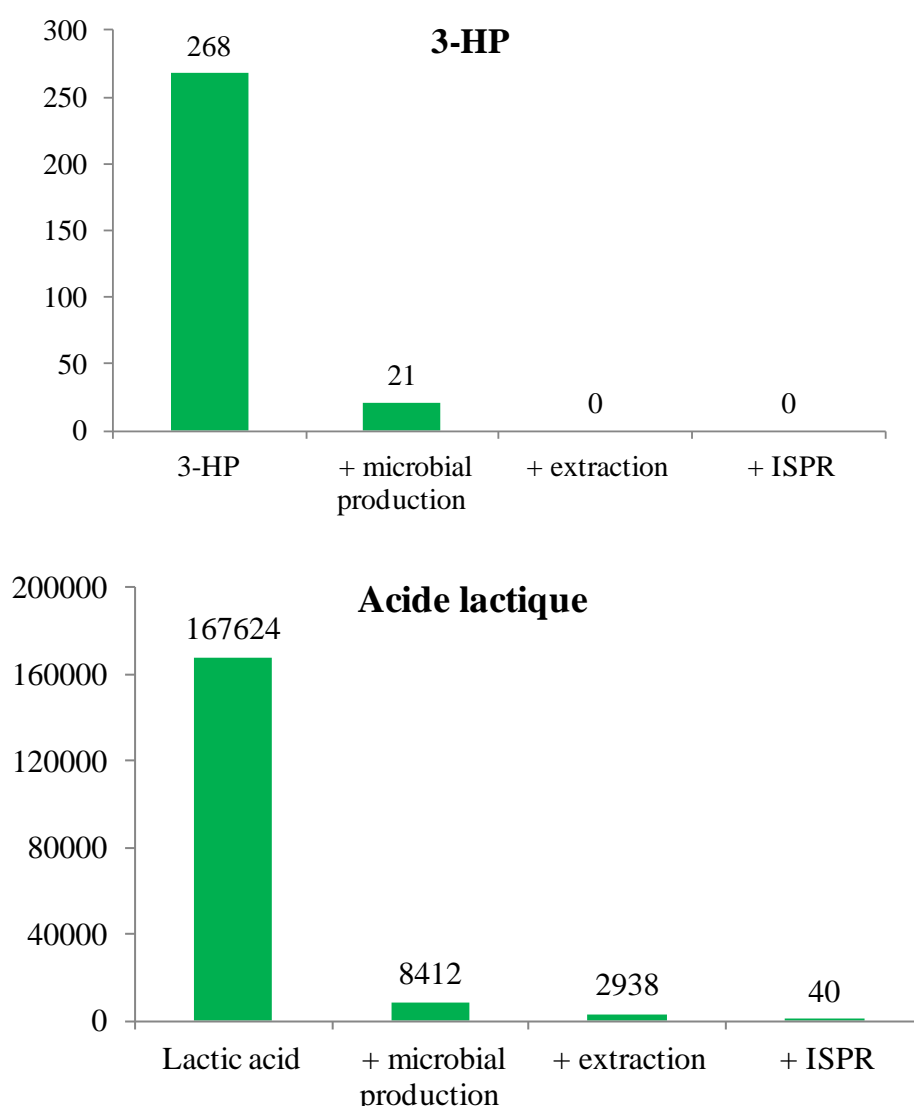


Figure II.0.1 : Nombre de publications dans la littérature en réponse à la recherche de différents mots clefs (précisés sur le graphique) au 02 septembre 2015 (source : Web of science)

1 – Production biotechnologique de 3-HP : limites et enjeux

1.1 Le 3-HP, un synthon d'intérêt industriel

1.1.1 Le 3-HP : un isomère de l'acide lactique aux propriétés physico-chimiques intéressantes

Différentes appellations existent pour cette molécule, notamment : acide 2-déoxyglycérique, acide éthylène lactique, acide hydracrylique, acide β -hydroxypropionique, acide β -lactique, mais sa dénomination la plus usuelle est acide 3-hydroxypropanoïque ou 3-hydroxypropionique, dont l'anion est appelé 3-hydroxypropionate. Le 3-HP est un acide carboxylique hydroxylé en position β , à trois carbones non chiraux, isomère de position de l'acide lactique (acide 2-hydroxypropionique, 2-HP) et qui présente une réactivité importante du fait de la présence de ses deux groupements fonctionnels (Figure I.1.1). Ses principales propriétés physico-chimiques sont résumées dans le tableau I.1.1. Preuve de son importance, une étude parue en 2008 prévoyait un volume de production possible estimé à 3,6 millions de tonnes, bien loin devant les autres acides organiques potentiellement produits à partir de la biomasse (acides levulinique, succinique, itaconique, Sauer *et al.* 2007).

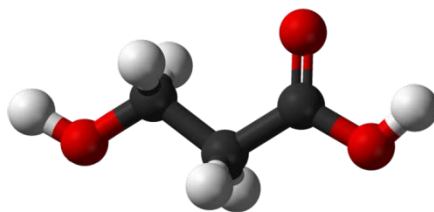


Figure I.1.1 : Molécule d'acide 3-hydroxypropionique

Tableau I.1.1 : Principales caractéristiques et propriétés physico-chimiques du 3-HP

Formule chimique	C ₃ H ₆ O ₃
Numéro CAS	503-66-2
pKa	4,51
Masse molaire	90,08 g.mol ⁻¹
Densité	1,08
Log K_{o/w} (Hydrophobicité)*	-0,89
Solubilité dans l'eau (25°C)*	10 ⁶ mg.L ⁻¹
Constante de Henry (Volatilité)*	2,66.10 ⁻¹¹ atm.m ⁻³ /mol

* Valeurs estimées par l'intermédiaire de l'EPI SuiteTMestimation, développé par Syracuse Research corporation (SRC) et l'U.S. Environmental Protection Agency (copyright 2000).

1.1.2 Le 3-HP : de nombreuses applications potentielles

Le groupement acide du 3-HP peut être réduit en alcool ou en aldéhyde et converti en une grande variété d'esters, d'amides et en leurs dérivés. Le groupement alcool peut être transformé en acide par oxydation ou converti en composés insaturés par déshydratation (Corma *et al.* 2007). Le 3-HP constitue également un produit de départ intéressant pour la production de propiolactone, polyesters et oligomères par des réactions de cyclisation et polymérisation (Della Pina *et al.* 2011).

1.1.2.1 Le 3-HP comme molécule plateforme

Le 3-HP peut être dérivé en une large gamme de produits chimiques normalement d'origine pétrolière, tels que l'acide acrylique ou l'acrylamide par déshydratation, le 1,3-propanediol (1,3-PDO) par réduction, le méthyl acrylate par estérification, l'acide malonique par oxydation, la propiolactone par cyclisation ou encore être à la base de la formation de polymères (Figure I.1.2).

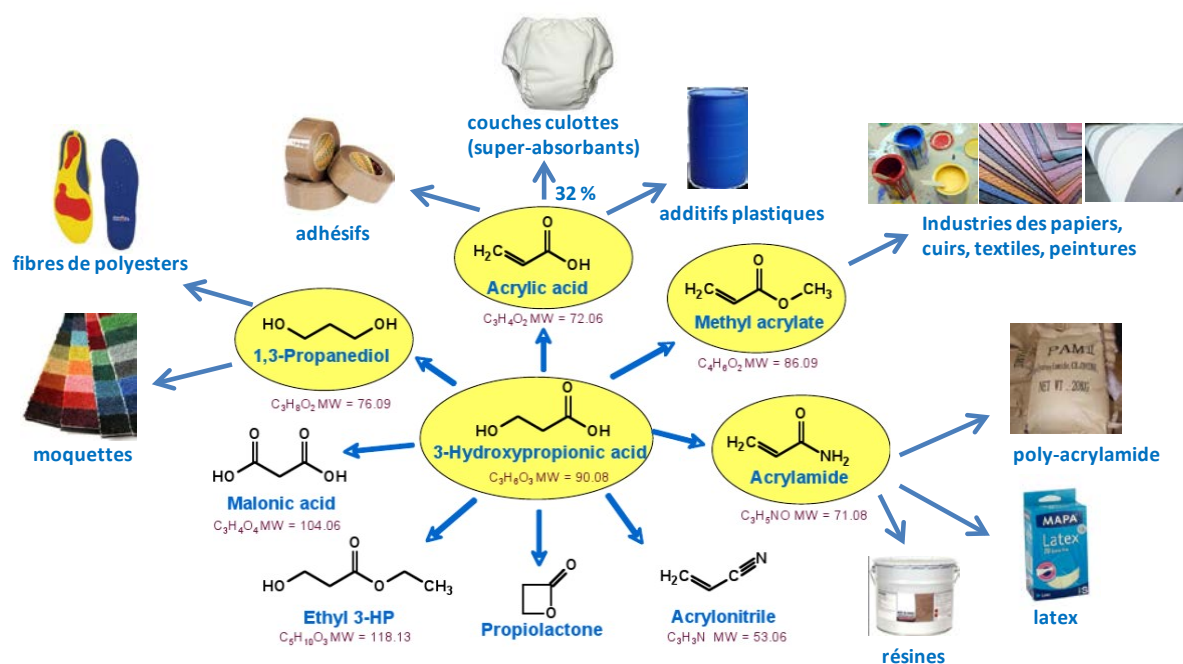


Figure I.1.2 : Le 3-HP, une molécule plateforme à la base de nombreuses applications potentielles

Le 1,3-PDO représente un monomère d'intérêt pour la synthèse de polymères : couplé avec l'acide téréphtalique, il conduit à la formation de polytriméthylène téréphtalate, très utilisé dans la fabrication des fibres et résines (Saxena *et al.* 2009, Kaur *et al.* 2012). Pour l'instant produit majoritairement par voie pétrochimique (Shell et Degussa process, Saxena *et al.* 2009), l'augmentation de sa production par voie biotechnologique contribuerait à une diminution de l'usage des ressources fossiles. L'obtention d'acide malonique et de ses dérivés constitue aussi un débouché important de la production de 3-HP, par oxydation sélective du groupement alcool

(Corma *et al.* 2007). La β -propiolactone est également une molécule d'intérêt qui, bien que toxique, est un désinfectant utilisé pour remplacer le formaldéhyde.

Le 3-HP peut aussi être utilisé en tant qu'agent de réticulation lors de la polymérisation, comme lubrifiant pour les métaux ou en tant qu'agent antistatique pour les textiles (Gokarn *et al.* 2007).

1.1.2.2 Le 3-HP comme précurseur d'acide acrylique biosourcé

Parmi les différents dérivés du 3-HP, l'acide acrylique représente la principale cible pour les industriels. Il constitue un produit chimique à forte valeur ajoutée, largement utilisé pour des applications dans les domaines des colles, du textile, de la peinture, des revêtements, des résines, etc. Cet acide constitue également une molécule de départ intéressante pour la synthèse de polymères utilisés dans les domaines des absorbants, des textiles, des adhésifs et des produits d'étanchéité. Le marché potentiel pour l'acide acrylique biosourcé est évalué à plus de 2 millions de tonnes annuelles (Della Pina *et al.* 2011). Actuellement, il est presque exclusivement produit par oxydation du propylène, issu du raffinage du pétrole brut. Plus de la moitié de la production d'acide acrylique annuelle est utilisée pour fabriquer de l'acide acrylique glacial, permettant d'obtenir des super-absorbants utilisés dans les couches culottes. Le reste de la production est utilisé pour synthétiser des acrylates, composants de fibres acryliques, de revêtements, de peintures et d'encre¹³.

Devant l'importance considérable que constitue le marché de l'acide acrylique et les enjeux autour de l'épuisement des réserves fossiles, plusieurs consortiums (Figure I.1.3) travaillent à la production d'acide acrylique biosourcé en utilisant le 3-HP comme intermédiaire chimique à cette synthèse.



Figure I.1.3 : Principaux groupes industriels travaillant sur la production d'acide acrylique biosourcé en utilisant le 3-HP comme intermédiaire.

¹³ Acrylic Acid Market Report, 2007, <http://fr.marketpublishers.com>

Parmi ces différents regroupements, le plus connu est le partenariat engagé depuis 2008 entre Cargill et Novozymes. Ils sont rejoints en 2012 par la compagnie BASF, l'un des leaders de l'industrie de la chimie, qui quitte cependant le projet début 2015, malgré l'achèvement de plusieurs objectifs scientifiques et économiques : production de 3-HP à l'échelle pilote en 2013 et conversion du 3-HP en acide acrylique glacial et autres polymères super absorbants courant 2014¹⁴. La voie schématique de production de l'acide acrylique réalisée par Cargill et Novozymes est décrite sur la Figure I.1.4.

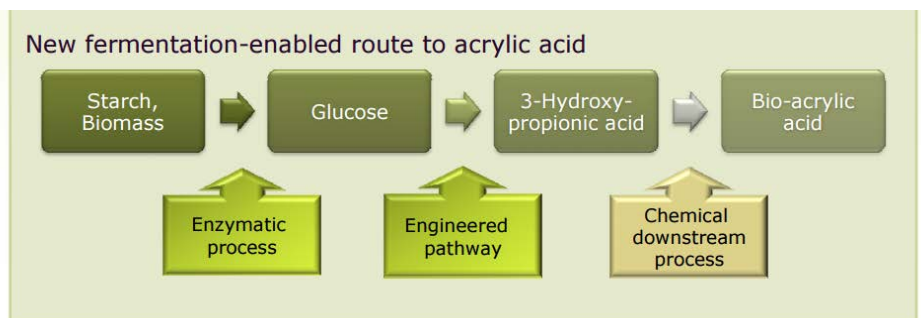


Figure I.1.4 : Voie schématique de production de l'acide acrylique biosourcé décrite par Cargill et Novozymes. Le glucose est d'abord extrait de la biomasse (amidon de maïs) par des procédés enzymatiques avant d'être converti en 3-HP par une souche d'*E. coli* optimisée par ingénierie métabolique. Le 3-HP est finalement purifié et converti en acide acrylique par voie chimique (déshydratation)³

Autre projet d'importance, celui porté par la coopération entre OPX Biotechnologies (production de molécules biosourcées par voie microbienne), Evonik Industries (l'un des leaders de la chimie de spécialité) et la compagnie chimique DOW (leader de la production d'acide acrylique pétro-sourcé aux États-Unis). Le passage du procédé de fabrication de l'acide acrylique à partir de la biomasse en passant par le 3-HP (Figure I.1.5) à une échelle pilote de démonstration a été mené à bien et la première usine opérationnelle de production est prévue pour 2017-2018. La première commercialisation est quant à elle estimée pour le courant de l'année 2016¹⁵.

Initialement focalisée sur la production de produits biosourcés en C4, la compagnie Metabolix travaille actuellement sur la production de molécules en C3 et notamment sur celle de l'acide acrylique depuis 2011. L'objectif annoncé est de développer et commercialiser une nouvelle voie de production d'acide acrylique et d'esters acryliques biosourcés dans le but de devenir compétitif au niveau des prix avec la production de molécules à partir de réserves fossiles

¹⁴ <https://www.cargill.com> et <https://www.novozymes.com> (consultés en août 2015)

¹⁵ <https://www.opxbio.com> (consulté en août 2015)

en se basant sur un baril de pétrole à 90 dollars. Contrairement aux autres projets en cours, l'intermédiaire est le poly-3-hydroxypropanoate ou poly(3-HP), produit par fermentation et directement converti en acide acrylique par l'intermédiaire d'un procédé chimique de thermolyse sélective nommé FAST (*fast-acting, selective thermolysis*). Depuis 2012, la modification de micro-organismes par ingénierie métabolique et le passage à l'échelle pilote (20-30 L) ont été successivement menés à bien. Metabolix est actuellement à la recherche de partenaires pour le passage à une échelle industrielle¹⁶.

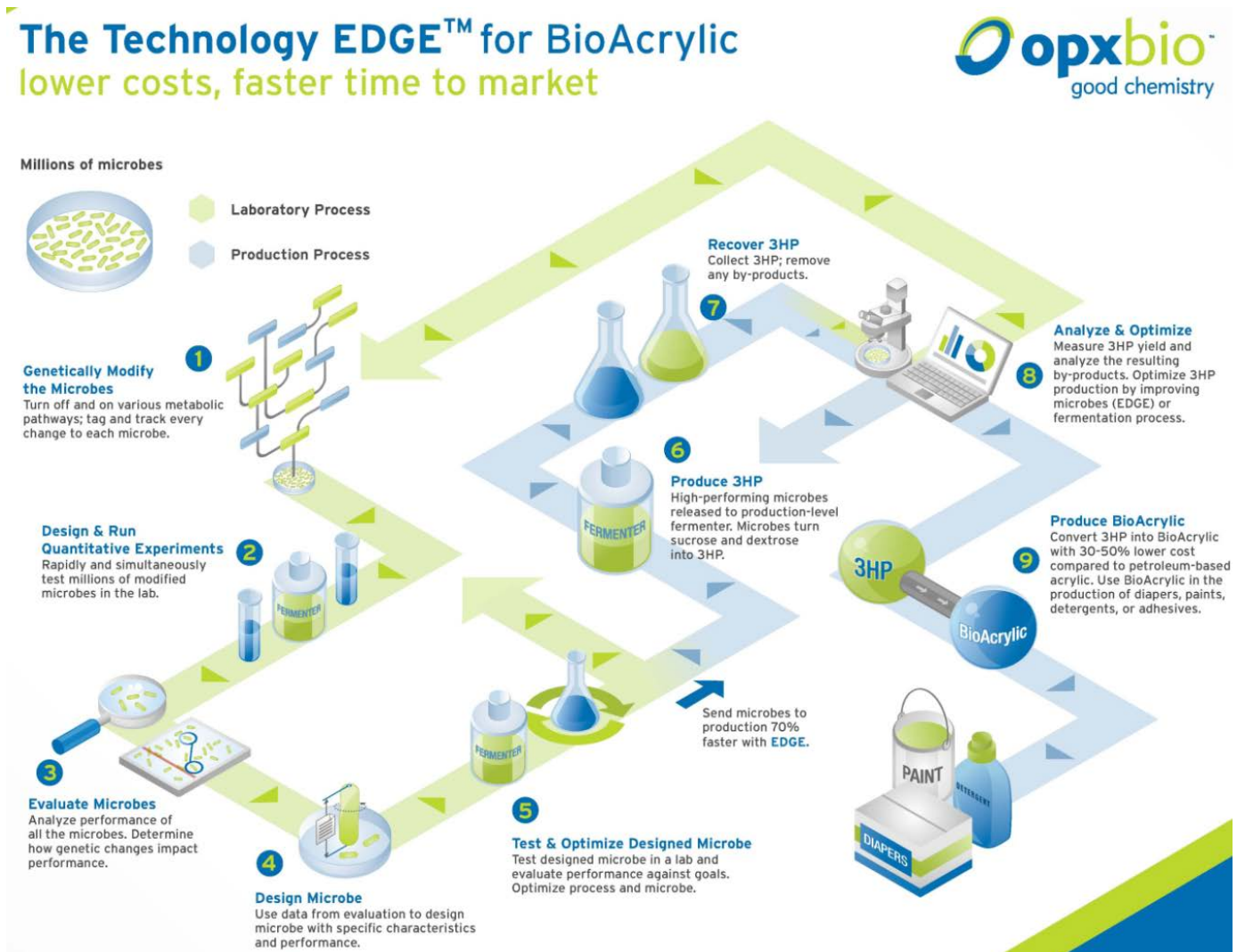


Figure I.1.5 : Schéma général du procédé de production d'acide acrylique biosourcé par l'association d'OPX Biotechnologies, Evonik Industries et DOW⁴

¹⁶ <https://www.metabolix.com> (consulté en août 2015)

1.1.2.3 Synthèse de polymères bio-sourcés à base de 3-HP

L'existence d'une fonction acide carboxylique et d'un groupement hydroxyle confère au 3-HP une réactivité chimique permettant de l'utiliser comme monomère pour la formation de polyesters. Des polymères de 3-HP pourraient ainsi être employés en tant que bioplastiques (Andreeßen and Steinbüchel 2010, Andreeßen *et al.* 2010, Tripathi *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013). Il est également possible de produire des bio-polymères de 3-HP biodégradables qui pourraient remplacer à terme les polymères d'origine pétrochimique (par exemple dans le domaine des biomatériaux chirurgicaux). Un polymère de 3-HP présente des caractéristiques physiques intéressantes, parmi lesquelles un point de fusion compris entre 170 et 184°C (175°C dans le cas de l'acide polylactique ou PLA, Garlotta 2002), c'est à dire une bonne stabilité à la chaleur (Andreeßen and Steinbüchel 2010). De plus, en comparaison aux autres polymères existants, de type poly(L-lactide), poly(D-lactide) et poly(D,L-lactide), le poly(3-HP) ne possède pas de chaîne latérale méthylée qui pourrait affaiblir la liaison hydrogène intermoléculaire par encombrement stérique, et donc influencer la résistance des matériaux (Zhu *et al.* 2004).

Andreeßen *et al.* (2010) ont réussi à convertir le glycérol en thermoplastique poly(3-HP). Pour cela, les gènes de l'enzyme glycérol déshydrogénase (DhaB) de *Clostridium butyricum*, de la propionaldéhyde déshydrogénase (PduP) de *Salmonella enterica* et la polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC1) de *Ralstonia eutropha* ont été exprimés chez un recombinant *E. coli* (Figure I.1.6). Le poly(3-HP) est alors accumulé à 11.98 % m/m (1,42 g.L⁻¹) au cours d'une fermentation en fed-batch en trois étapes. Le même travail a été réalisé avec les gènes *dhaB* de *Klebsiella pneumoniae*, *pduP* de *Salmonella typhimurium* et *phaC1* de *Cupriavidus necator* également chez un recombinant *E. coli* (Wang *et al.* 2013), conduisant à une accumulation maximale de 10,1 g.L⁻¹ de poly(3-HP).

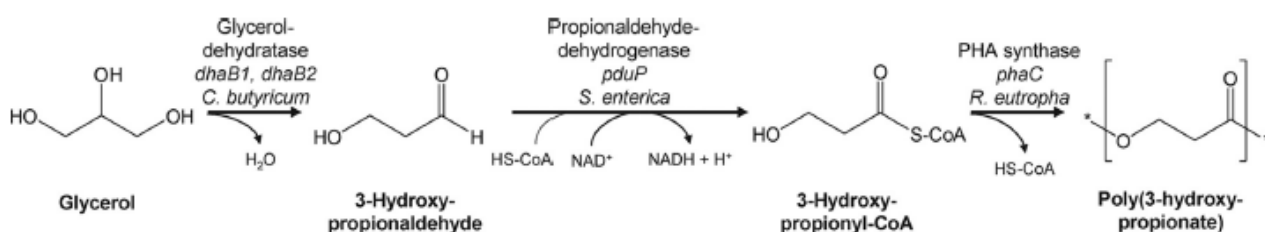


Figure I.1.6 : Voie de bioconversion du glycérol en poly(3-HP) chez *E. coli* OGM (Andreeßen *et al.* 2010).

Certains homo-polyesters, comme le poly(3-hydroxybutyrate) ou poly(3-HB), déjà utilisés comme bioplastiques, présentent souvent une structure très cristalline et cassante, ce qui limite certaines de leurs applications. Andreeßen et Steinbüchel (2010) se sont focalisés sur différents polyesters contenant des monomères de 3-HP. Ils se sont ainsi intéressés à la synthèse de l'homo-polyester poly(3-HP) ainsi que des co-polyesters poly(3-HB-co-3-HP), poly(3-HP-co-3-HB-co-3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate), poly(4-HB-co-3-HP-co-lactate) et poly(3-HB-co-3-HP-co-4-HB-co-lactate), puis ont comparé leurs propriétés physico-chimiques et thermiques, notamment de résistance à la chaleur. Ils ont par exemple montré que l'incorporation de monomères de 3-HP dans le copolymère poly(3-HB-co-3-HP) permettait de réduire sa cristallinité ainsi que sa température de transition vitreuse : celle-ci passe ainsi de + 4°C à - 19°C lorsque la fraction de 3-HP augmente de 0 à 100 %. De plus, l'ajout de 3-HP à des concentrations molaires comprises entre 60 et 70 % induit une diminution du point de fusion du co-polymère. Par exemple, l'incorporation d'unités de 3-HP à hauteur de 67 % permet de réduire la température de fusion du poly(3-HB) de 177°C à 44°C par rapport à un poly(3-HB) sans monomère de 3-HP (Figure I.1.7). De même, la dégradation de poly(3-HB-co-3-HP) augmente avec le pourcentage de 3-HP, ce qui pourrait s'avérer être un avantage pour des applications en chirurgie (Shimamura *et al.* 1994, Ichikawa *et al.* 1996). Pour résumer, l'homopolymère poly(3-HP) présente des propriétés intéressantes de ductilité, rigidité et résistance ; intégré au sein de copolymères, le 3-HP abaisse la température de transition vitreuse et la température de fusion mais augmente la dégradabilité par les enzymes (Andreeßen et Steinbüchel, 2010).

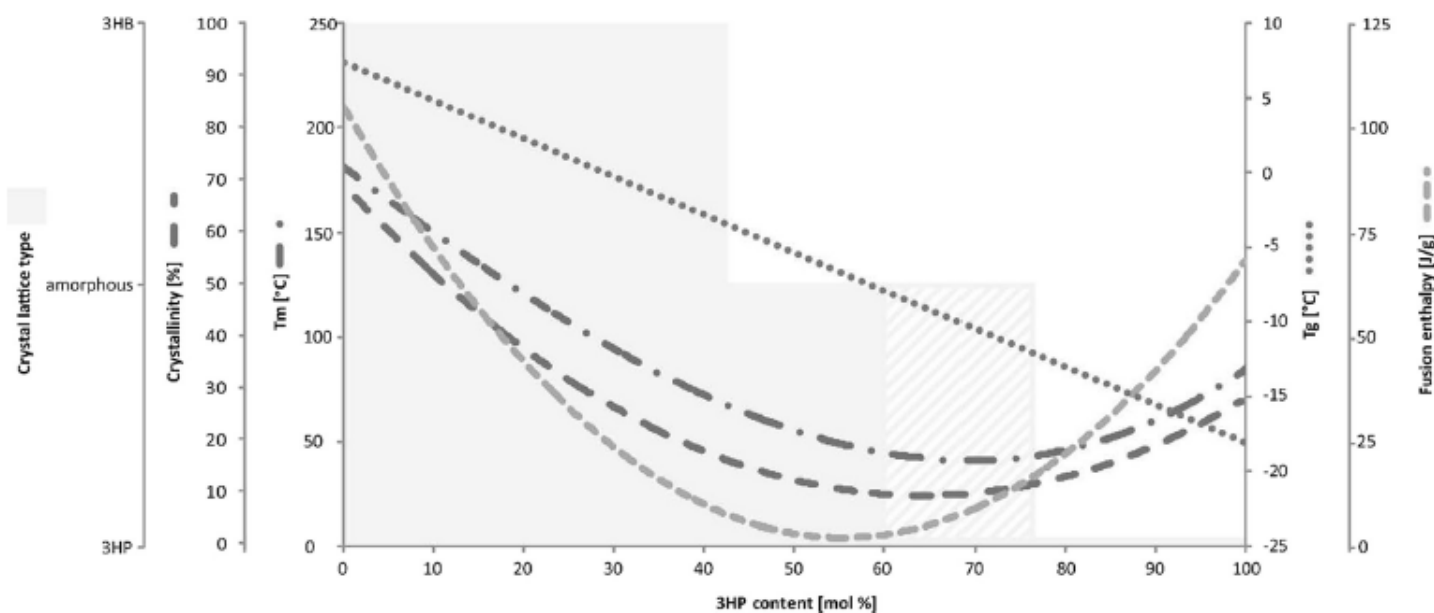


Figure I.1.7 : Modifications des propriétés thermo-physiques du copolymère poly(3-HB-co-3-HP) en fonction du pourcentage de 3-HP présent. Les températures de transition vitreuse (Tg), de fusion (Tm), la cristallinité et l'enthalpie de fusion sont exprimées en fonction du pourcentage de 3-HP (Andreeßen and Steinbüchel 2010).

Plus récemment, Tripathi *et al.* (2013) se sont intéressés à l'étude des propriétés physico-chimiques des polymères suite à l'incorporation de motifs poly(3-HP) et poly(4-HB) produits par *E. coli*. Ces auteurs ont conclu à la synthèse possible d'un nouvel élastomère thermoplastique ultra résistant grâce aux propriétés du poly(3-HP) et élastique grâce à celles du poly(4-HB). Récemment, des polymères poly(3-HP) et poly(3-HB-co-3-HP) ont même été synthétisés directement à partir du glucose par une souche *E. coli* modifiée (Meng *et al.* 2015).

1.2 Production de 3-HP : intérêts de la voie biotechnologique par rapport à la voie chimique

1.2.1 Synthèse de 3-HP par voie chimique : réactions décrites et verrous rencontrés

Malgré ses nombreuses applications potentielles, le 3-HP est une molécule qui tarde encore à émerger sur le plan industriel. Une baisse importante des coûts est encore nécessaire pour assurer la compétitivité des dérivés issus du 3-HP synthétisé par voie chimique par rapport aux composés actuellement utilisés, d'origine pétrochimique. Le 3-HP peut notamment être synthétisé chimiquement par polymérisation de type « ring opening » à partir de β -propiolactone (Gresham *et al.* 1948, Baba *et al.* 1992, Yamashita *et al.* 1996) ou par diverses autres approches, mais toutes

posent des problèmes (procédé trop coûteux, toxicité de la réaction, disponibilité trop faible du substrat ; Figure I.1.8).

Ainsi, la production de 3-HP à partir de β -propiolactone (Long and Purchase 1950, Weissermel and Arpe 1997) est extrêmement dangereuse du fait du caractère cancérigène de la molécule de départ (IARC 1999). L'hydratation de l'acide acrylique par catalyse acide notamment (Meng *et al.* 2004) a été envisagée compte tenu de la faible génération de co-produits. Mais l'acide acrylique pétro-sourcé soulève des problèmes environnementaux, auxquels s'ajoute une augmentation régulière de son prix de vente depuis quelques années, ce qui en fait un matériau de départ inadapté (Della Pina *et al.* 2011). Le 3-hydroxypropionitrile (éthylène cyanohydrine), molécule plateforme dérivée de l'éthylène et de la chlorure constitue un autre point de départ possible pour la synthèse chimique de 3-HP. Mais les faibles rendements de réaction et la toxicité des co-produits générés (cyanure de sodium notamment) en font une méthode de préparation adaptée à l'échelle du laboratoire mais pas à l'échelle industrielle (Della Pina *et al.* 2011). L'oxydation d'alcools ou d'aldéhydes conduit facilement à l'acide carboxylique correspondant dans des conditions douces, et permet également d'obtenir le 3-HP à partir de 1,3-PDO ou de 3-HPA. Mais une fois encore, la faible disponibilité des matières premières, leur origine fossile, le coût et la complexité de la réaction sont autant de freins à un passage à une production en grand volume. La méthode décrite comme la plus intéressante est la synthèse catalytique du 3-HP à partir d'alcool allylique, qui passe par l'oxydation d'alcools aliphatiques et aromatiques primaires ou secondaires (Bergman *et al.* 2008, Arceo *et al.* 2009, Della Pina *et al.* 2008). En présence de catalyseur Or et de NaOH, le 3-HP est formé de manière concomitante à la production d'acide acrylique et d'acide glycérique dans des proportions qui dépendent des conditions initiales, notamment de la température et du ratio NaOH/alcool allylique (Della Pina *et al.* 2009). Bien que prometteuse, cette approche nécessite l'utilisation de catalyseurs performants et d'utilisation coûteuse (Della Pina *et al.* 2009).

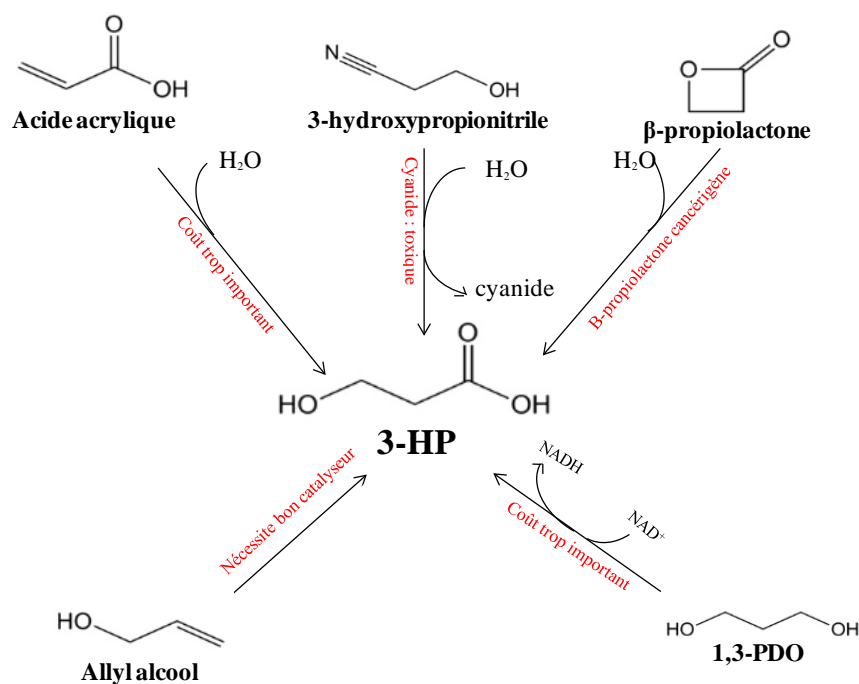


Figure I.1.8 : Différentes voies de synthèse chimique conduisant au 3-HP et leurs principaux inconvénients

Malgré l'importance que revêt le 3-HP, cette molécule est à l'heure actuelle uniquement fabriquée par un petit nombre de producteurs et disponible commercialement sous forme de solution aqueuse à 30 % (Luo *et al.* 2011a) au prix très élevé (52 € le g chez Sigma-Aldrich¹⁷, 92 € les 10 g chez TCI-Europe¹⁸). Le prix de cette molécule est dû au coût important des matières premières et du procédé de synthèse, ainsi que des problèmes environnementaux rencontrés lors de sa synthèse, ce qui limite encore son utilisation pour des marchés de masse.

1.2.2 Synthèse de 3-HP par voie biotechnologique : des espoirs mesurés

Ces problématiques de prix, de complexité et d'impact environnemental du procédé de synthèse et d'épuisement des ressources fossiles pourraient être en partie levées par la synthèse de 3-HP bio-sourcé. En comparaison à la production de molécules d'intérêt par voie pétrochimique, les procédés biotechnologiques présentent plusieurs avantages : possibilité d'utiliser des sources renouvelables de carbone, production des molécules au cours d'un cycle fermé du carbone, réactions généralement stéréospécifiques.

¹⁷ <http://www.sigmaaldrich.com/france.html> (consulté en octobre 2015)

¹⁸ <http://www.tcichemicals.com> (consulté en octobre 2015)

Les premières études concernant spécifiquement la production par voie biotechnologique de 3-HP remontent aux années 2000, avec le développement de souches recombinantes de *K. pneumoniae* (Zhu *et al.* 2009, Ashok *et al.* 2011, Luo *et al.* 2011b, Luo *et al.* 2012, Wang *et al.* 2013, Ashok *et al.* 2013a et b) ou *E. coli* (Raj *et al.* 2008, Raj *et al.* 2009, Raj *et al.* 2010, Rathnasingh *et al.* 2009, Kwak *et al.* 2013, Kim *et al.* 2014, Jung *et al.* 2014, Jung *et al.* 2015) utilisant le glycérol et/ou le glucose comme substrat de départ. Récemment, des travaux portant sur des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* (Chen *et al.* 2014) ont vu le jour du fait des nombreux avantages offerts par une production basée sur ce système (plus grande tolérance aux faibles pH, métabolisme bien connu et outils d'ingénierie métabolique disponibles). Cependant, des travaux ont également établi que certains micro-organismes du genre *Lactobacillus* et notamment *L. reuteri* (Talarico *et al.* 1988) et *L. collinoides* (Garai-Ibabe *et al.* 2008) pouvaient produire naturellement du 3-HP par bioconversion du glycérol, mais avec des performances moindres en termes de rendement, titre et productivité (Kumar *et al.* 2013a, Dishisha *et al.* 2014). Par ailleurs, le 3-HP apparaît comme intermédiaire dans plusieurs voies métaboliques présentes chez les levures comme chez les bactéries (Figure I.1.9, Valdehuesa *et al.* 2013). Il peut être également produit par des champignons endophytes, leur conférant un pouvoir nématocide (Schwarz *et al.* 2004, Sebastianes *et al.* 2012).

1.2.2.1 Voies naturelles : diversité des voies de synthèse

En 1960, Sobolov et Smiley rapportent une co-production de 3-HP (1,23 mmol) et 1,3-PDO (1,18 mmol) en utilisant le glycérol comme substrat de départ, avec des cellules immobilisées d'une souche de *Lactobacillus* appelée 208-A (Sobolov and Smiley, 1960). Talarico *et al.* (1988) et Garai-Ibabe *et al.* (2008) obtiennent des résultats similaires avec des souches de *L. reuteri* et *L. collinoides*. Plusieurs études se sont ensuite intéressées à la bioconversion du glycérol en 3-HP par *L. reuteri* (Yasuda *et al.* 2007, Dishisha *et al.* 2014), avec des résultats intermédiaires en termes de concentration finale en produit (10,6 g.L⁻¹, Dishisha *et al.* 2014).

En fonction des micro-organismes, on distingue deux voies métaboliques naturelles de bioconversion du glycérol en 3-HP, selon qu'elle est CoA-dépendante ou -indépendante (Figure I.1.9, Kumar *et al.* 2013a). Par la voie CoA-dépendante, quatre étapes sont nécessaires pour cette conversion : glycérol → 3-HPA → 3-HP-CoA → 3-HP-P → 3-HP et l'une d'elles génèrent de l'ATP (1 mole d'ATP/mole de 3-HP synthétisé). Dans ce cas, tous les gènes codant pour les enzymes de la voie sont exprimés au sein d'un même opéron appelé pdu (« propanediol utilisation »). Dans la voie CoA-indépendante, le glycérol est d'abord transformé en 3-HPA par

une glycérol déshydratase vitamine B12-dépendante (DhaB ou GDH selon les espèces) puis directement oxydé en 3-HP par une aldéhyde déshydrogénase NAD⁺-dépendante (AldH). Contrairement à la voie CoA-dépendante, il n'y a pas de génération d'ATP. Dans tous les cas, l'aldéhyde déshydrogénase nécessite la présence de NAD⁺ comme co-facteur, qui doit être régénéré par la réduction du 3-HPA en 1,3-PDO ou par une chaîne de transport d'électrons.

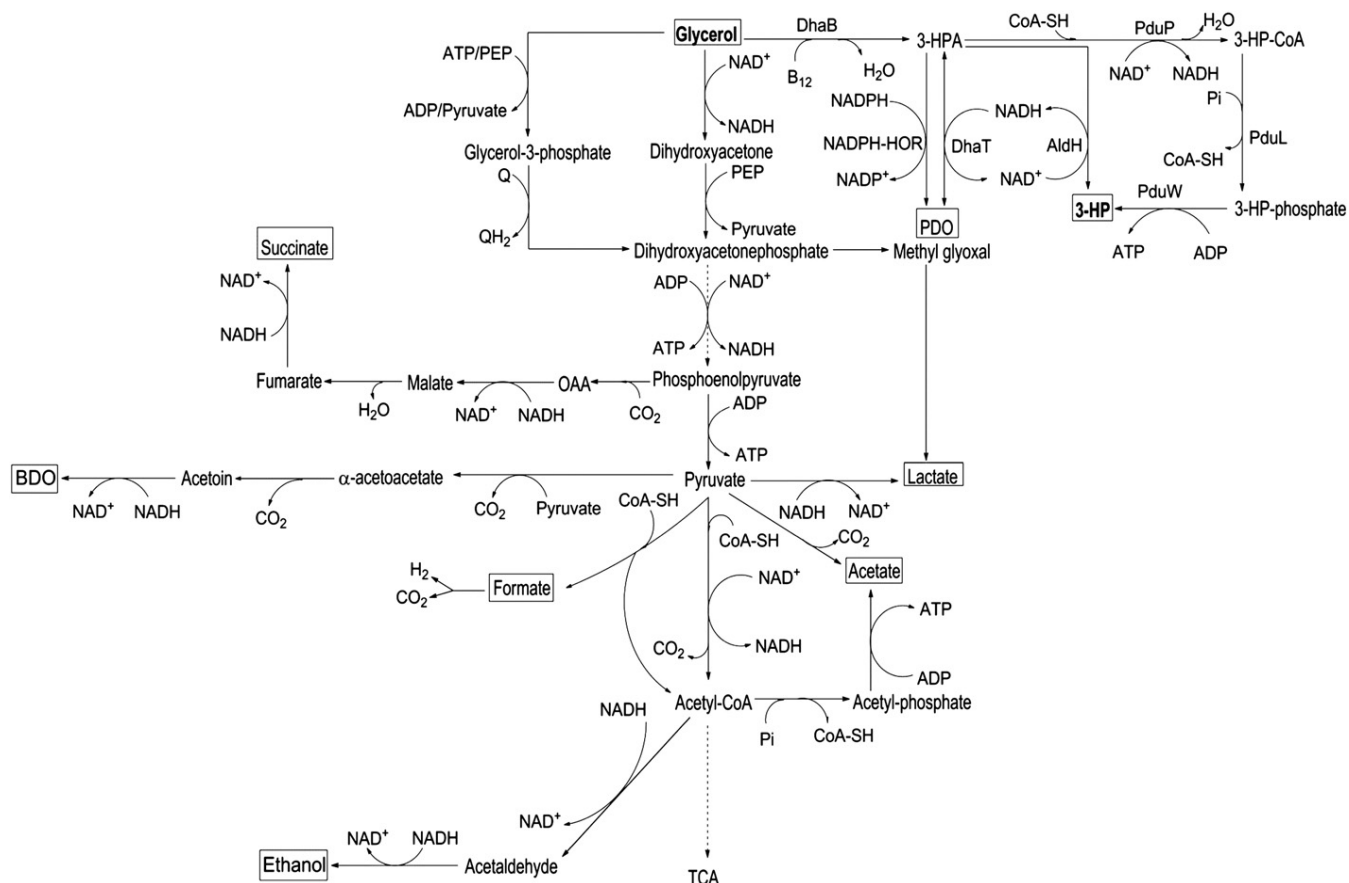


Figure I.1.9 : Voies métaboliques pour la production de 3-HP à partir du glycérol, incluant les voies CoA-dépendantes et CoA-indépendantes (Kumar *et al.* 2013a). Les pointillés indiquent des étapes multiples.

Le 3-HP comme intermédiaire métabolique a d'abord été observé chez l'eubactérie phototrophe thermophile *Chloroflexus aurantiacus*, en tant qu'intermédiaire au sein d'un cycle de l'assimilation autotrophe du CO₂ (Holo 1989). Ce cycle a également été retrouvé plus tard chez différents micro-organismes tels que *Acidianus brierleyi*, *Metallosphaera sedula*, *Acidianus ambivalens* et *Sulfolobus metallicus* (Hügler *et al.* 2003). Le cycle du 3-HP a été complètement élucidé chez *C. aurantiacus* en 2009 (Zarzycki *et al.* 2009, Figure I.1.10a) de manière concomitante au cycle 3-HP/4-HB chez *Metallosphaera sedula* (Berg *et al.* 2007, Figure I.1.10b). Le 3-HP est aussi connu pour être un produit de dégradation du diméthylsulfopropionate (DMSP)

chez *Alcaligenes faecalis* (Ansele *et al.* 1999, Figure I.1.10c) et de la pyrimidine chez les levures et les bactéries (Loh *et al.* 2006, Kim *et al.* 2010, Figure I.1.10d). Enfin, certains micro-organismes peuvent transformer l'acide acrylique en 3-HP (*Geotrichum sp.* et *Trichoderma sp.*, Dave *et al.* 1996) mais avec de faibles rendements (4,8 % v/v chez *Byssoschlamys sp.*, Takamizawa *et al.* 1993).

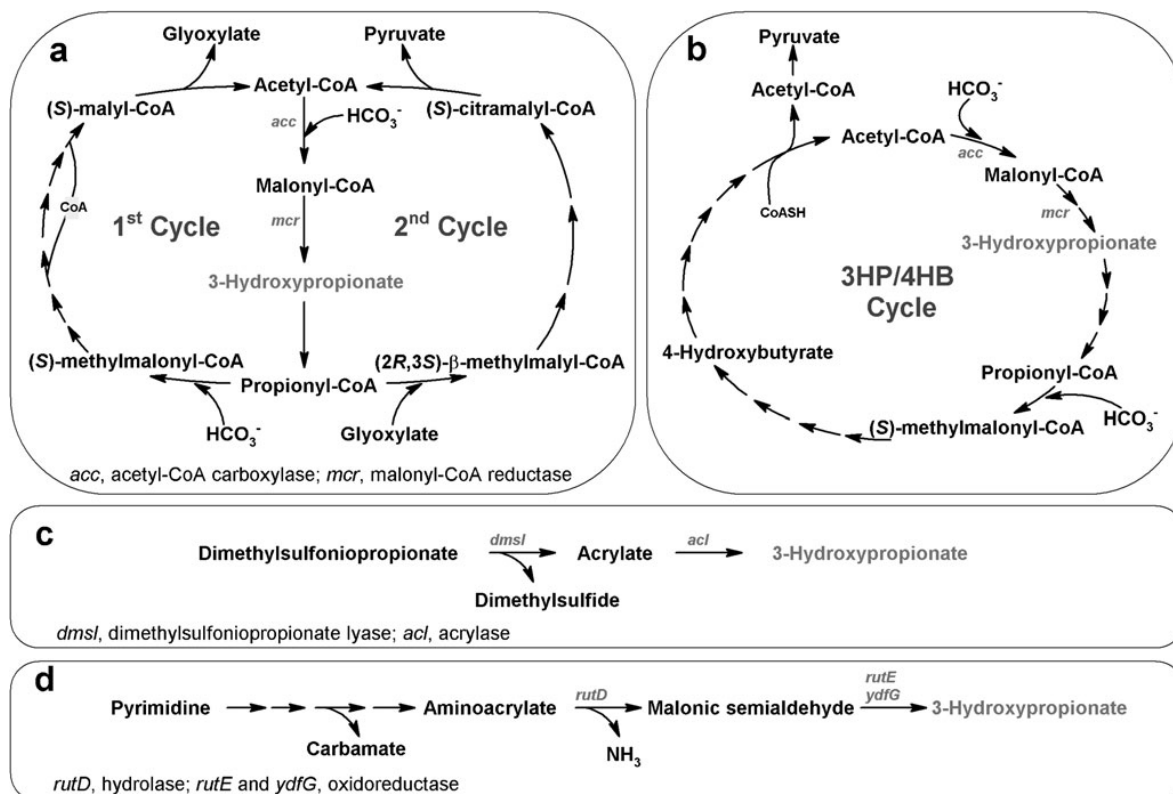


Figure I.1.10 : Le 3-HP comme intermédiaire métabolique chez *C. aurantiacus* (a), *M. sedula* (b), *A. faecalis* (c) et voie de dégradation de la pyrimidine trouvée chez les bactéries et levures (Valdehuesa *et al.* 2013).

A partir du filtrat de culture de plusieurs champignons endophytes isolés d'organes de plantes cultivées hors-sol, Schwarz *et al.* (2004) réussissent à extraire du 3-HP. En se basant sur des analyses des ADNr 18S et 28S, *Phomopsis phaseoli* (isolé sur les feuilles d'un arbre tropical) et quatre souches de *Melanconium betulinum* (isolées de brindilles) ont été identifiées comme producteurs. Plus récemment (Sebastianes *et al.* 2012), un autre champignon a été isolé dans la mangrove brésilienne et également identifié en tant que producteur potentiel : *Diaporthe phaseolorum*. Cependant, les voies de synthèse du 3-HP chez ces micro-organismes n'ont pas encore été élucidées. Le tableau I.1.2 récapitule les principaux organismes producteurs naturels de 3-HP connus à ce jour.

Tableau I.1.2 : Micro-organismes producteurs naturels de 3-HP (d'après Kumar *et al.* 2013a)

Micro-organisme	Voie métabolique	Substrat	Référence
Procaryotes			
<i>Lactobacillus</i> 208-A	Métabolisme du glycérol	Glycérol	Sobolov et Smiley (1960)
<i>L. collinoides</i>	Métabolisme du glycérol	Glycérol	Garai-Ibabe <i>et al.</i> (2008)
<i>L. reuteri</i>	Métabolisme du glycérol	Glycérol	Talarico <i>et al.</i> (1988)
<i>A. faecalis</i>	Métabolisme de l'acide acrylique	Diméthylsulfopropionate	Ansede <i>et al.</i> (1999)
<i>C. aurantiacus</i>	Cycle du 3-HP	Acétyl-CoA et CO ₂	Zarzycki <i>et al.</i> (2009)
<i>M. sedula</i>	Cycle 3-HP / 4-HB	Acétyl-CoA et CO ₂	Berg <i>et al.</i> (2007)
Eucaryotes			
<i>Geotrichum sp.</i>	Métabolisme de l'acide acrylique	Acide acrylique	Dave <i>et al.</i> (1996)
<i>Trichoderma sp.</i>	Métabolisme de l'acide acrylique	Acide acrylique	Dave <i>et al.</i> (1996)
Champignons endophytes	Non connu	Non connu	Schwarz <i>et al.</i> (2004)
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Catabolisme de l'uracile	Uracile	Andersen <i>et al.</i> (2008)

1.2.2.2 Voies OGM : diversité de substrats

Pour optimiser les performances de la production par voie biotechnologique (titre, rendement, productivité) et ainsi envisager une production commerciale de 3-HP, des approches par ingénierie métabolique ont été développées. En effet, aucun des micro-organismes producteurs naturels de 3-HP n'est pour l'instant capable d'atteindre de telles performances. Dans ce contexte, différentes stratégies de production du 3-HP à partir du glycérol et/ou du glucose ont été envisagées.

Il y a quelques années, l'augmentation rapide de la production de biodiésel a permis de disposer d'une quantité importante de glycérol à faible coût. L'utilisation de celui-ci comme substrat de départ pour la production de molécules d'intérêt par voie microbienne a donc été étudiée et testée (da Silva *et al.* 2009, Pagliaro *et al.* 2009, Dobson *et al.* 2012, Ciriminna *et al.* 2014). Parmi ces molécules figure en bonne place le 3-HP (Kumar *et al.* 2013a, Dishisha *et al.* 2014). Plusieurs études mettant en œuvre des micro-organismes modifiés génétiquement et utilisant du glycérol comme substrat de départ pour la production de 3-HP ont ainsi été répertoriées, conduisant à des résultats intéressants en termes de rendement et de titre. Ces travaux portent principalement sur l'utilisation de souches d'*E. coli* et *K. pneumoniae* modifiées et utilisent majoritairement la voie CoA-indépendante. Les principaux résultats en termes de production de 3-HP sont résumés dans le tableau I.1.3.

Raj *et al.* (2008) ont ainsi développé un recombinant *E. coli* exprimant la DhaB (glycérol déshydratase) de *K. pneumoniae* et l'AldH (aldéhyde déshydrogénase) d'*E. coli*, conduisant à une production de 3-HP à 0,58 g.L⁻¹ en fioles et 2,5 g.L⁻¹ en bioréacteur. En jouant sur le taux d'expression de ces deux gènes et en optimisant les conditions opératoires de mise en œuvre des souches obtenues, les résultats sont meilleurs (4,4 g.L⁻¹ en fioles et 31 g.L⁻¹ avec un fed-batch de glycérol et en bioréacteur, Raj *et al.* 2009). Des travaux ultérieurs (Rathnasingh *et al.* 2009) ont montré qu'en remplaçant l'AldH de *E. coli* par l' α -cétoglutarique semialdéhyde déshydrogénase (KGSADH) d'*Azospirillum brasilense*, la production de 3-HP était encore améliorée dans les mêmes conditions (38,7 g.L⁻¹, fed-batch de glycérol en bioréacteur) du fait de la diminution de l'accumulation de l'intermédiaire toxique 3-HPA. Plus récemment (Kwak *et al.* 2013) ont développé un autre recombinant *E. coli* mais avec des niveaux de production moins intéressants (14,3 g.L⁻¹ de 3-HP, fed-batch de glycérol en bioréacteur). Les derniers travaux portant sur l'utilisation de recombinants *E. coli* pour la production de 3-HP ont montré des résultats très intéressants en fed-batch, notamment en optimisant le transport du glycérol et le flux métabolique vers la molécule d'intérêt et en réduisant l'accumulation du 3-HPA (42,1 g.L⁻¹, Jung *et al.* 2014 ; 57 g.L⁻¹, Kim *et al.* 2014).

Si l'utilisation d'*E. coli* recombinant pour la production de 3-HP s'avère efficace, l'auxotrophie pour la vitamine B12, nécessaire au fonctionnement de la glycérol déshydratase constitue un problème pour envisager une production à l'échelle industrielle. D'autres études ont ainsi été menées, sur des micro-organismes naturellement producteurs de vitamine B12 en absence d'oxygène (*K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium* et *L. reuteri* par exemple, Kumar *et al.* 2013a). Différents recombinants *K. pneumoniae* ont été développés, conduisant à des niveaux de production du 3-HP à partir de glycérol comparables à ceux atteints avec *E. coli* modifiée (3,77 g.L⁻¹, Wang *et al.* 2012 ; 11,3 et 22,7 g.L⁻¹, Kumar *et al.* 2012 et 2013b ; 24,4 g.L⁻¹, Huang *et al.* 2012 ; 16 g.L⁻¹, Ko *et al.* 2012 ; 22 et 28 g.L⁻¹, Ashok *et al.* 2013a et b). A ce jour, le niveau le plus élevé de 3-HP obtenu par une de ces constructions de *K. pneumoniae* (48,9 g.L⁻¹, Huang *et al.* 2013) permet d'espérer un futur passage à l'échelle industrielle. Cependant, la présence de co-produits (acide lactique et 1,3-PDO principalement) risque de poser problème lors des étapes de purification et le caractère pathogène du micro-organisme utilisé (Lawlor *et al.* 2005) constitue un verrou majeur.

Des travaux se sont également intéressés à l'optimisation de *L. reuteri* par ingénierie métabolique (Dishisha *et al.* 2014), permettant l'obtention de 3-HP à partir de glycérol à un niveau

intermédiaire à ceux décrits précédemment (environ 20 g.L⁻¹, Tableau I.1.3). Bien que les résultats ne soient pas encore équivalents à ceux obtenus à partir des recombinants *E. coli* ou *K. pneumoniae*, l'utilisation de *L. reuteri* comme bactérie hôte présente des avantages certains : statut G.R.A.S. du micro-organisme producteur, capacité de synthèse de la vitamine B12, utilisation du glycérol uniquement comme accepteur d'électrons et non pas comme substrat pour la croissance (diminuant ainsi la génération de co-produits).

Tableau I.1.3 : Synthèse des différentes études portant sur la production de 3-HP à partir du glycérol en utilisant des micro-organismes recombinants.

Micro-organisme hôte	Gènes impliqués	[3-HP] (g.L ⁻¹)	Référence
<i>E. coli</i>	<i>dhaB, aldH</i>	2,5	Raj <i>et al.</i> (2008)
<i>E. coli</i>	<i>dhaB, aldH</i>	31	Raj <i>et al.</i> (2009)
<i>E. coli</i>	<i>dhaB, KGSADH</i>	38,7	Rathnasingh <i>et al.</i> (2009)
<i>E. coli</i>	<i>dhaB, dhaR, aldH</i>	14,3	Kwak <i>et al.</i> (2013)
<i>E. coli</i>	<i>glpK, glpF, ΔglpR</i>	42,1	Jung <i>et al.</i> (2014)
<i>E. coli</i>	<i>ΔglpK, ΔyqhD, dhaB, dhaR, PSALDH</i>	57	Kim <i>et al.</i> (2014)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>ΔdhaD, aldHk</i>	2,07	Luo <i>et al.</i> (2011b)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>dhaB, aldH</i>	3,77	Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>dhaB, KGSADH</i>	11,3	Kumar <i>et al.</i> (2012)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>dhaB, aldHk</i>	24,4	Huang <i>et al.</i> (2012)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>dhaB, ΔdhaT, KGSADH</i>	16	Ko <i>et al.</i> (2012)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>dhaB, Δldha, KGSADH</i>	22,7	Kumar <i>et al.</i> (2013b)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>ΔdhaT, ΔyqhD, puuC, dhaB</i>	28	Ashok <i>et al.</i> (2013a)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>ΔglpK, ΔdhaT, puuC</i>	22,5	Ashok <i>et al.</i> (2013b)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>dhaB, aldH</i>	48,9	Huang <i>et al.</i> (2013)
<i>L. reuteri</i>	Opéron <i>pdu</i>	20	Dishisha <i>et al.</i> (2014)

Plusieurs études et brevets portent sur une production de 3-HP à partir de glucose (Marx *et al.* 2007, Liao *et al.* 2007, Henry *et al.* 2010, Gokarn *et al.* 2012, Jung *et al.* 2015). Celui-ci est en effet plus disponible et moins coûteux que le glycérol, mais les voies métaboliques mises en œuvre sont différentes (Figure I.1.11). Pour être actives biologiquement, ces voies doivent être équilibrées du point de vue des co-facteurs d'oxydoréduction et générer de l'ATP durant la

production de 3-HP. Si ce n'est pas le cas, la consommation des substrats carbonés va servir à maintenir la balance rédox et la production d'ATP, augmentant ainsi la synthèse de co-produits non désirés (Straathof *et al.* 2005). Parmi les sept voies décrites par Cargill, toutes sont équilibrées pour les cofacteurs rédox mais certaines ne produisent pas d'ATP, voire en consomment (Tableau I.1.4).

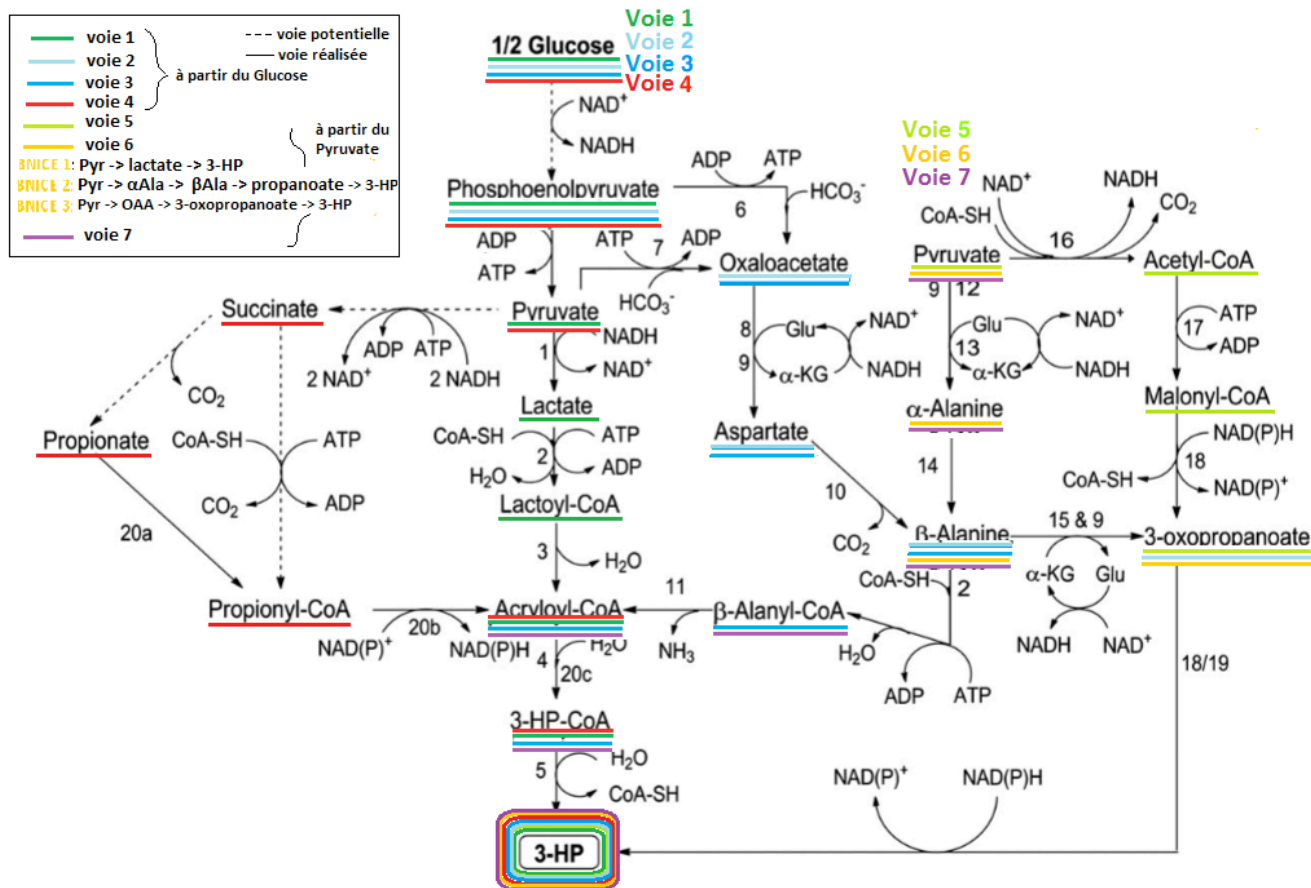


Tableau I.1.4 : Résumé des 7 voies de synthèse du 3-HP à partir du glucose proposées par Cargill (d'après Henry *et al.* 2010, Kumar *et al.* 2013a)

Voie étudiée	Micro-organisme hôte	Thermodynamique	Référence
Voie 1	<i>E. coli</i>	Défavorable	Mcgall <i>et al.</i> (2004)
Voie 2	<i>E. coli</i>	Favorable	Liao <i>et al.</i> (2007)
Voie 3	<i>E. coli</i>	Favorable	Liao <i>et al.</i> (2007)
Voie 4	Hypothétique	Défavorable	Gokarn <i>et al.</i> (2012)
Voie 5	<i>E. coli</i>	Défavorable	Rathnasingh <i>et al.</i> (2012)
Voie 6	Non précisé	Favorable	Liao <i>et al.</i> (2007)
Voie 7	Non précisé	Défavorable	Jiang <i>et al.</i> (2009)
BNICE* 1 à 3	<i>E. coli</i>	Favorable	Henry <i>et al.</i> (2010)

*BNICE : *Biochemical Network Integrated Computational Explorer*

Parmi les voies productrices d'ATP, la voie 6 est thermodynamiquement favorable (Tableau I.1.4) et est considérée comme la plus prometteuse en termes de rendement et de titre (Jiang *et al.* 2009, Henry *et al.* 2010). Récemment, un brevet déposé par OPXBIO décrit l'utilisation d'une souche *E. coli* génétiquement modifiée capable de produire du 3-HP à partir du glucose à une concentration finale et un rendement élevés (48 g.L⁻¹, 0,53 g/g ; Straathof, 2014). Une souche d'*E. coli*, capable de convertir de manière simultanée le glucose et le xylose en 3-HP via le métabolisme du glycérol, a également été développée (29.7 g.L⁻¹, 0,36 g/g, Jung *et al.* 2015).

1.2.2.3 Voies hypothétiques : l'apport des technologies *in silico*

Auparavant, l'approche de type ingénierie métabolique pour la production d'une molécule d'intérêt reposait uniquement sur des réactions biochimiques et des composés existants, disponibles dans les bases de données comme KEGG ou BRENDA. Depuis, plusieurs approches computationnelles ont été suggérées pour surmonter les difficultés rencontrées. Parmi ces approches, le BNICE (*Biochemical Network Integrated Computational Explorer*) a été utilisé par Henry *et al.* (2010) pour générer une nouvelle série de voies métaboliques théoriquement aussi intéressantes que la voie 6 proposée par Cargill (Figure I.1.11 et Tableau I.1.4). Le BNICE génère ainsi toutes les voies métaboliques possibles entre un substrat de départ et une molécule cible. La nouvelle voie la plus courte proposée par cette méthode (BNICE 1) ne comprend ainsi que deux étapes en partant du pyruvate et donne le rendement de production théorique le plus élevé (2 moles/mole de glucose) et une concentration intracellulaire attendue de l'ordre de 1 mM (Henry *et al.* 2010). Les deux autres voies décrites dans cette étude (BNICE 2 et 3 ; Figure I.1.11 et Tableau

I.1.4) sont similaires à la voie 6 à l'exception d'un intermédiaire métabolique, le 3-oxopropanoate, remplacé par le propenoate. Les rendements théoriques obtenus sont identiques à celui de la voie BNICE 1, mais la concentration intracellulaire théorique attendue est supérieure (8,3 mM ; Henry *et al.* 2010).

Même si le glucose constitue un substrat de départ moins cher et plus abondant que le glycérol, son utilisation comme source de carbone pour la production de 3-HP par voie synthétique n'aboutit pas encore à un rendement et à un titre aussi élevés que ceux obtenus à partir de glycérol.

1.3 *Lactobacillus reuteri* : une bactérie lactique naturellement productrice de 3-HP

1.3.1 Caractéristiques et intérêts des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB : *Lactic Acid Bacteria*) sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes qui ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.* 1994). Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de bactéries à Gram-positif qui ont comme point commun la conversion rapide de carbohydrates en acide lactique, conduisant à une acidification de leur environnement. Elles sont catalase-négatives, non sporulées, non-mobiles et sont préférentiellement anaérobies tout en étant aéro-tolérantes et acidophiles (Schleifer and Ludwig 1995, Krämer 1997).

En raison de leur forte croissance, de leur taux d'acidification élevé et de leur forte tolérance à un environnement acide, les bactéries lactiques constituent généralement la flore dominante dans l'alimentation traditionnelle et les produits alimentaires fermentés, où elles contribuent à l'arôme, au goût, à la texture et favorisent donc la qualité organoleptique des aliments. Elles prolongent également la durée de conservation des aliments (qualité sanitaire), en abaissant le pH par la production d'acide lactique notamment, et en produisant des composés antimicrobiens et des bactériocines (Hansen 2002).

D'autre part, ces bactéries constituent, pour la plupart d'entre elles, la population naturelle de l'appareil gastro-intestinal humain et ont un effet bénéfique potentiel sur l'hôte, l'effet probiotique (Ahrne *et al.* 1998). Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent des avantages pour la santé de l'hôte par une diversité de mécanismes (FAO / OMS, 2002). L'activité des bactéries probiotiques comprend

notamment la modulation de la flore intestinale par la production de composés antimicrobiens ou la consommation de métabolites particuliers. En outre, certains probiotiques adhèrent à la muqueuse et stimulent la production de mucus, ce qui renforce la muqueuse et la barrière épithéliale. Utilisées depuis des millénaires pour les transformations alimentaires (yaourts, fromages) et non-alimentaires (production d'acide lactique), la plupart des bactéries lactiques sont généralement reconnues comme sans danger (statut G.R.A.S.).

1.3.2 Caractéristiques générales de *Lactobacillus reuteri*

1.3.2.1 *L. reuteri* : une bactérie connue et isolée de nombreux écosystèmes

L. reuteri est une bactérie à Gram-positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elle est présente dans une grande variété de niches écologiques (levain, viande, produits laitiers) et dans le tractus gastro-intestinal, ainsi que le tractus urogénital humain et animal (Lindgren and Dobrogosz 1990, Rodriguez *et al.* 2003, Valeur *et al.* 2004, Jin *et al.* 2007, Van Coillie *et al.* 2007).

Les cellules peuvent être observées seules, par paires ou en petits groupes de trois à cinq, sous la forme de chaînettes (Figure I.1.12). Leur morphologie a notamment été décrite par Kandler *et al.* (1980) : de type bâtonnet, de taille comprise entre 0,7-1,0 μm par 2,0-5,0 μm , avec des extrémités arrondies (Figure I.1.12).

La température optimale de croissance de *L. reuteri* se situe entre 35 et 38°C. Elle peut se développer jusqu'à 45°C mais sa croissance est inhibée à 15°C. Son pH optimal de croissance est compris entre 6,0 et 6,8 mais elle peut croître à des pH initiaux compris entre 5,0 et 7,5. *L. reuteri* est capable de fermenter un grand nombre de carbohydrates, notamment le glucose, le fructose, l'arabinose, le ribose, le saccharose, le lactose, le maltose, le raffinose (Kandler *et al.* 1980).



Figure I.1.12 : Photographie de *L. reuteri* au microscope électronique à balayage¹⁹

¹⁹ www.futurasciences.com (consulté en août 2015)

1.3.2.2 *L. reuteri* : une bactérie probiotique déjà commercialisée

La production de composés antimicrobiens par les bactéries lactiques, et parmi eux les bactériocines, est primordiale pour leur activité probiotique et la conservation des aliments notamment (Cotter *et al.* 2005). Dans les années 1980, Walter Dobrogosz et son équipe découvrent que *L. reuteri* produit une substance antibiotique à large spectre, appelée reuterine ou 3-HPA (Talarico *et al.* 1988, Talarico and Dobrogosz 1989). Cette molécule inhibe la croissance de certaines bactéries pathogènes à Gram-négatif (des genres *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*) et à Gram-positif (des genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*) et se révèle également efficace contre les levures, champignons, virus et protozoaires (Axelsson *et al.* 1989, Rodriguez *et al.* 2003, Cleusix *et al.* 2007). En 2008, de nouvelles recherches ont montré que ce composé antimicrobien améliorerait la capacité du tractus gastro-intestinal à inhiber la croissance d'*E. coli* (Cleusix *et al.* 2008). La reuterine a également été beaucoup étudiée et utilisée pour son rôle dans le domaine de la conservation des aliments (Arqués *et al.* 2004, Arqués *et al.* 2011, Montiel *et al.* 2014) et pour sa biocompatibilité avec les tissus biologiques (Chen *et al.* 2002 et 2004, Sung *et al.* 2002 et 2003).

Les souches DSM 20016, ATCC 55730 et ATCC 53608 possèdent ainsi des propriétés probiotiques (Casas and Dobrogosz, 2000, Valeur *et al.* 2004, Savino *et al.* 2007) et sont capables de sécréter la reuterine. La souche ATCC 55730 a ainsi été utilisée comme complément alimentaire probiotique ou dans des produits laitiers, avant d'être remplacée par sa souche « fille » (dépourvue de deux gènes de résistance à des antibiotiques), *L. reuteri* DSM 17938 (Rosander *et al.* 2008), commercialisée par Biogaia® (Stockholm, Suède ; Figure I.1.13).



Figure I.1.13 : Exemples de produits à vertus probiotiques contenant *L. reuteri*

1.3.3 Production biotechnologique du 3-HP : une stratégie en deux étapes

1.3.3.1 Croissance sur milieu carboné : métabolisme hétéro-fermentaire

L'étude de la croissance et du métabolisme de *L. reuteri* constitue une approche d'importance majeure pour la compréhension des mécanismes impliqués dans les nombreuses applications potentielles de cette bactérie. En 2008, il a été montré que *L. reuteri*, qui présente un métabolisme hétéro-fermentaire, exploite simultanément deux voies glycolytiques afin d'assurer l'équilibre redox: la voie de la phosphocétolase (PKP, voie hétérolactique ou voie des pentoses-phosphate) et la voie d'Embden-Meyerhof (EMP, voie homolactique ou glycolyse) (Arsköld *et al.* 2008). Récemment, van Niel *et al.* (2012) ont confirmé cette observation et exprimé l'importance relative de ces deux voies pour la souche ATCC 55730 sur substrat glucose (87,8 % pour le flux PKP et 12,2 % pour le flux EMP).

Le rendement de la voie EMP permet l'obtention de deux moles de produits finis (acide lactique) et 2 moles d'ATP par mole de glucose fermenté ($\text{glucose} + 2 \text{ ADP} \rightarrow 2 \text{ acides lactiques} + 2 \text{ ATP}$; Figure I.1.14). Pour la voie PKP, la réaction globale est la suivante : $\text{glucose} \rightarrow 1 \text{ acide lactique} + 1 \text{ éthanol} + 1 \text{ CO}_2$ avec un gain net de 1 ATP (Figure I.1.14). L'efficacité de la voie PKP en termes d'énergétique intracellulaire est donc moitié moindre par rapport à celle de la voie EMP. L'avantage de cette voie réside dans le fait qu'elle est génératrice de NADH_2 , essentielle pour les réactions de biosynthèse (en particulier pour la synthèse des acides gras et des stéroïdes) et de ribose-5-phosphate, qui constitue le précurseur de la synthèse des nucléotides et des acides nucléiques. La croissance de *L. reuteri* sur glucose est cependant limitée par la balance redox, l'acétyl-phosphate est donc entièrement converti en éthanol et il n'y a pas de production d'acétate (Stevens *et al.* 2011).

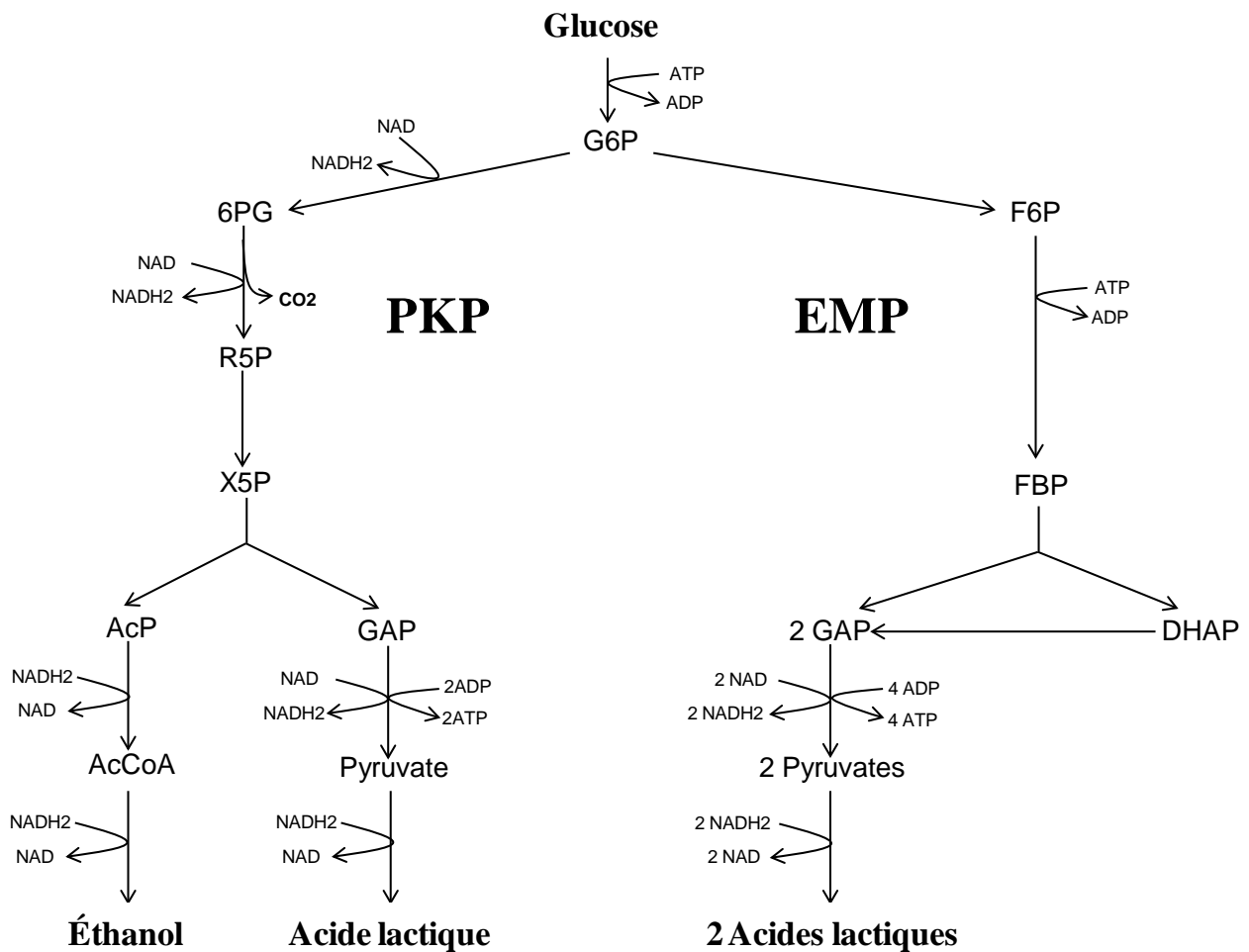


Figure I.1.14 : Métabolisme du glucose chez *L. reuteri*. La PKP est la voie de gauche, l'EMP la voie de droite. (G6P, glucose-6-phosphate ; 6PG, 6-phosphogluconate ; R5P, ribulose-5-phosphate ; X5P, xylulose-5-phosphate ; AcP, acetyl phosphate ; AcCoA, acetyl coenzyme A ; F6P, fructose-6-phosphate ; FBP, fructose-1,6-bisphosphate ; DHAP, dihydroxyacetone phosphate ; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate.) (Burgé *et al.* 2015a).

Bien que l'on trouve peu de travaux concernant de ce changement de métabolisme chez *L. reuteri*, son origine en cours de croissance a été étudiée chez d'autres bactéries lactiques et pourrait s'expliquer par la surexpression de certains gènes de la PKP (transcétolase, transaldolase et alcool déshydrogénase) en environnement acide (*Lactobacillus plantarum*, Pieterse *et al.* 2005), en cas de limitation par le glucose (*Streptococcus lactis*, Thomas *et al.* 1978) ou lors d'une modification du ratio $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ (*Lactococcus lactis*, Garrigues *et al.* 1997).

1.3.3.2 Bioconversion du glycérol en 3-HP : un système complexe

1.3.3.2.1 Voie de bioconversion du glycérol en 3-HP chez *L. reuteri*

La voie métabolique de production du 3-HP à partir du glycérol chez *L. reuteri* comprend deux étapes principales (Figure I.1.15). Au cours d'une première réaction enzymatique, le glycérol est converti en 3-HPA par une glycérol/diol déshydratase vitamine B12-dépendante (GDH/PduCDE) (Dishisha *et al.* 2014). Cette étape nécessite également l'intervention d'une enzyme supplémentaire de réactivation de la glycérol/diol déshydratase, cette dernière étant inactivée lors de son utilisation (Toraya 2000, Yamanishi *et al.* 2012). Le 3-HPA est ensuite oxydé en 3-HP en trois étapes successives. Il y a d'abord formation de 3-HP-CoA par une propionaldéhyde déshydrogénase CoA-dépendante (PduP) qui requiert l'utilisation de NAD⁺. Le 3-HP-CoA est ensuite converti en 3-HP-phosphate grâce à l'action d'une phosphotransacylase (PduL). Pour finir, le 3-HP-phosphate conduit à la formation de 3-HP et d'énergie sous forme d'ATP via une propionate kinase (PduW). En parallèle, le 3-HPA peut également être réduit en 1,3-PDO par une 1,3-PDO oxidoréductase NADH₂-dépendante (PduQ). Le ratio de production entre 3-HP et 1,3-PDO dépend donc en grande partie de la disponibilité en cofacteurs NAD⁺ et NADH₂ dans le milieu ainsi que des conditions d'aération. L'expression des gènes codants pour l'ensemble de ces enzymes est sous contrôle de l'opéron propanediol pdu (Figure I.1.15 ; Morita *et al.* 2008, Sriramulu *et al.* 2008), qui contrôle également l'expression du gène codant pour le transport du glycérol (PduF ; Morita *et al.* 2008).

Une fois le glycérol converti en 3-HPA, la difficulté majeure du procédé de production de 3-HP va être d'orienter le flux métabolique vers la synthèse de 3-HP plutôt que vers celle de 1,3-PDO. Pour maximiser le rendement en 3-HP, il convient donc de limiter au maximum la production de 1,3-PDO. Pour cela, il est nécessaire d'être en conditions micro-aérobies et du NAD⁺ doit être disponible pour les bactéries. D'autre part, la conversion du 3-HPA en 1,3-PDO est minimisée quand il y a peu ou pas de glucose dans le milieu de production (ratio glucose/glycérol de 0,33 maximum ; Talarico *et al.* 1988, Lüthi Peng *et al.* 2002 a et b), de façon à limiter l'utilisation de la glycolyse et donc la production de NADH₂. Cependant, des travaux *in silico* ont montré que si l'on réalisait une co-fermentation du glycérol et du glucose en conditions aérobies, le glycérol pouvait être orienté vers la production de 3-HP et le glucose utilisé pour la croissance et les besoins cellulaires, au sein d'*E. coli* OGM (Jiang *et al.* 2009). Les recherches actuelles œuvrent à créer de nouvelles voies de bio-synthèse, génératrices de NAD⁺, pour augmenter la production de 3-HP (*E. coli*, Yasuda *et al.* 2006). Ces stratégies permettent de minimiser la

production de 1,3-PDO sans l'éviter complètement. La séparation du 3-HP et du 1,3 PDO en solution semble cependant envisageable en raison de différences au niveau de leurs structures et de leurs propriétés physico-chimiques.

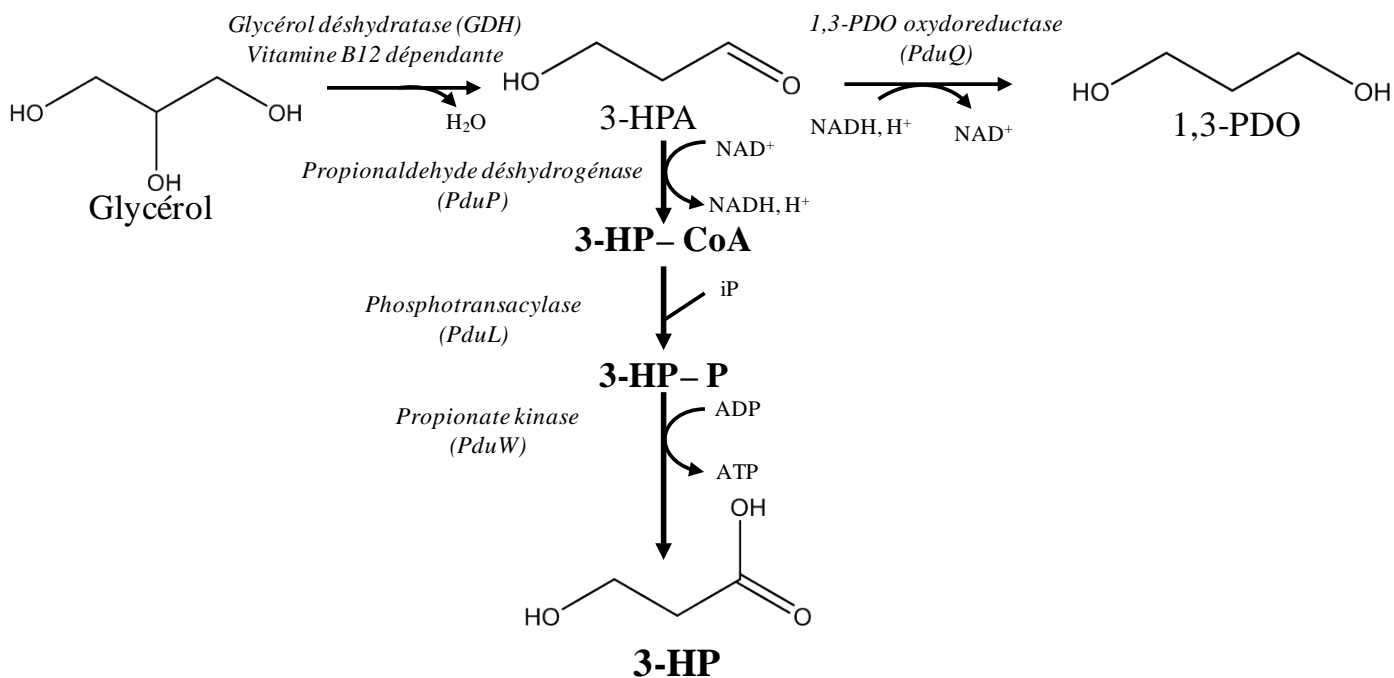


Figure I.1.15 : Voie de bioconversion du glycérol en 3-HP chez *L. reuteri* (d'après Dishisha *et al.* 2014) et organisation de l'opéron pdu de *L. reuteri* (Morita *et al.* 2008).

1.3.3.2.2 Le glycérol, une source de carbone disponible et prometteuse



Figure I.1.16 : Molécule de glycérol

Le glycérol (1,2,3-propanetriol, molécule purifiée de la glycérine, Figure I.1.16) est un liquide visqueux, inodore, incolore et au goût sucré, dérivé de matière première d'origine naturelle ou pétro-sourcée. Ses trois groupements hydroxyles rendent cette molécule très hydrophile et très réactive, capable de former des liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires. Les principales propriétés physico-chimiques du glycérol à 20°C sont résumées dans le tableau I.1.5. Le glycérol brut, issu majoritairement de la production de biodiesel, est pur à 70-80 %. Il est toujours concentré et purifié, le plus souvent par distillation, avant d'être commercialisé à des puretés variant entre 95,5 et 99,9 % (Pagliaro *et al.* 2009). Cette molécule est extrêmement stable sous des conditions normales de conservation, non irritante et non toxique pour l'environnement.

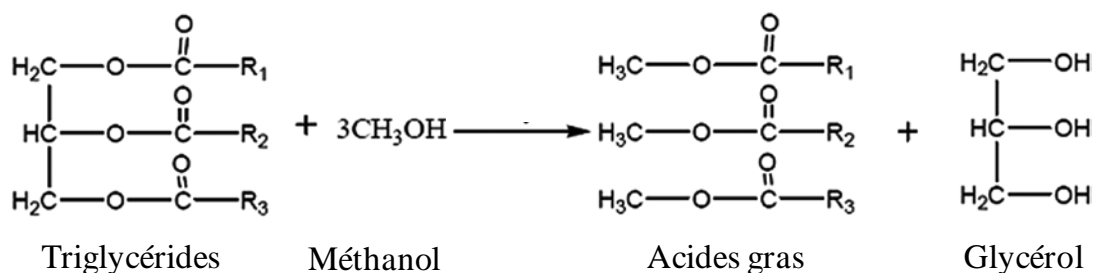
Tableau I.1.5 : Principales caractéristiques et propriétés physico-chimiques du glycérol

Formule chimique	C ₃ H ₅ (OH) ₃
Numéro CAS	56-81-5
pKa	14,4
Masse molaire	92,09 g.mol ⁻¹
Densité	1,261
Viscosité	1500 mPa.s
Log K_{ow} (Hydrophobicité)*	- 1,76
Solubilité dans l'eau (25°C)*	10 ⁶ mg.L ⁻¹
Constante de Henry (Volatilité)*	1,73.10 ⁻⁸ atm.m ⁻³ /mol

* Valeurs estimées par l'intermédiaire de l'EPI SuiteTMestimation, développé par Syracuse Research corporation (SRC) et l'U.S. Environmental Protection Agency (copyright 2000).

Le glycérol est devenu ces dernières années une source de carbone peu coûteuse pour la production de savons et surfactants par trans-estérification, notamment en Europe. En effet, pour cent tonnes de biodiesel obtenu par trans-estérification d'huiles végétales ou animales (avec du méthanol, réaction catalysée par du KOH ou du NaOH), environ dix tonnes de glycérol brut sont produites, comme le montre l'équation ci-dessous (da Silva *et al.* 2009, Ciriminna *et al.* 2014).

100 kg d'huile + 10,5 kg méthanol → 100 kg méthyle-ester (biodiesel) + 10,5 kg glycérol



La croissance de l'industrie du biodiesel a donc généré une quantité excédentaire de glycérol brut, conduisant à une forte baisse de son prix entre 2005 et 2007 (Figure I.1.17). Par conséquent, le développement de procédés de conversion du glycérol brut en produits à haute valeur ajoutée est devenu économiquement viable et utile pour valoriser ces excédents. On comprend donc aisément l'intérêt que représente l'utilisation du glycérol comme substrat de départ pour la production de biomolécules telles que le 3-HP.

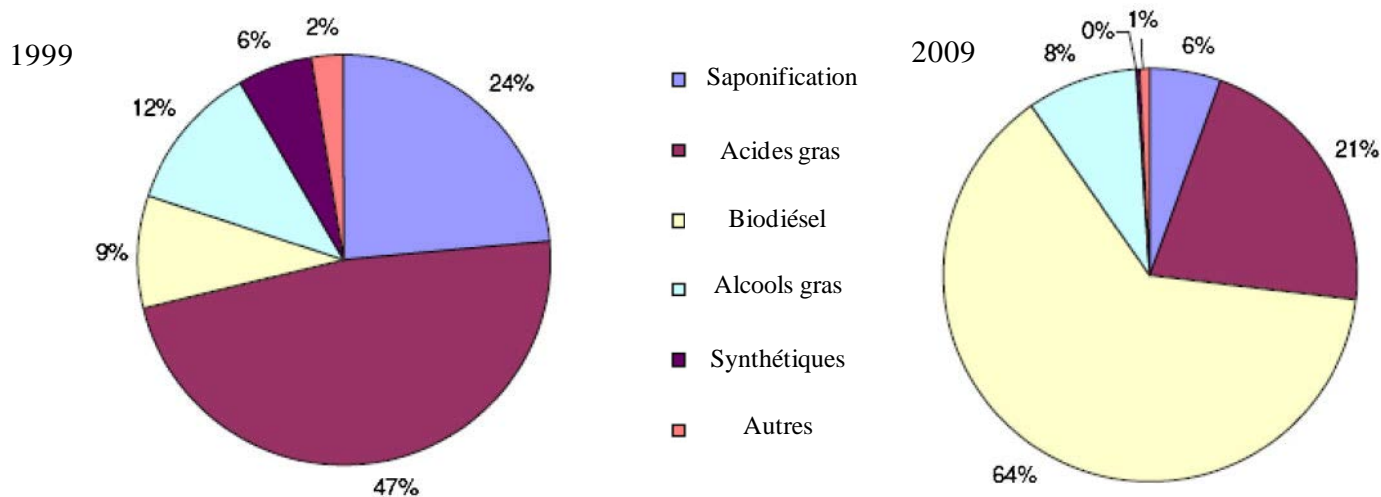


Figure I.1.17 : Principales provenances du glycérol avant (1999) et après (2009) l'explosion de la production mondiale de biodiésel (d'après Ciriminna *et al.* 2014).

Le glycérol est ainsi devenu une source polyvalente de carbone et d'énergie permettant de nombreuses applications potentielles, notamment dans le domaine de la fermentation industrielle (Figure I.1.18 ; Werpy and Petersen 2004). La plupart des recherches menées actuellement s'axe sur l'utilisation de glycérol pour la production de solvants tels que le dihydroxyacétone ou les diols 1,3 et 1,2-propanediol, mais aussi pour la production d'acides organiques comme l'acide citrique, l'acide succinique ou l'acide propionique (da Silva *et al.* 2009). Cette molécule est également couramment employée dans des applications alimentaires (agent sucrant, agent humectant), cosmétiques (agent hydratant, solvant, lubrifiant, produits capillaires), pharmaceutiques (lubrification, préparation de sirops) ou encore industrielles (agent plastifiant, résines, explosifs, antigels) (Vandeputte, 2012).

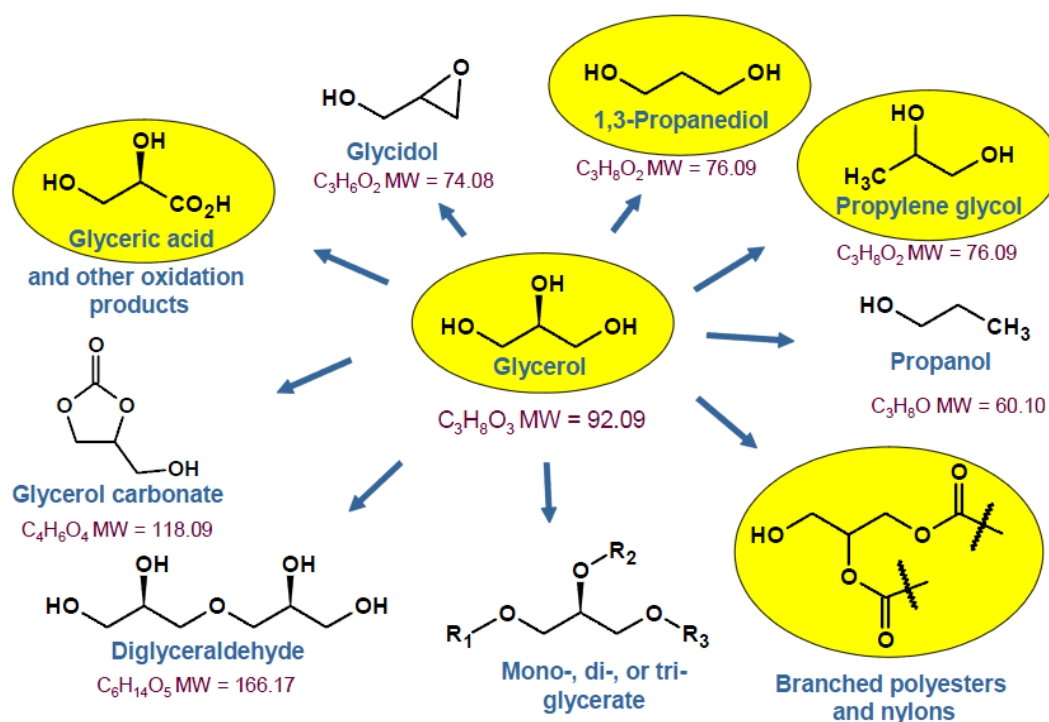


Figure I.1.18 : Dérivés possibles à partir du glycérol (Werpy and Petersen, 2004)

1.3.3.2.3 Le 3-HPA, intermédiaire métabolique de la voie du 3-HP

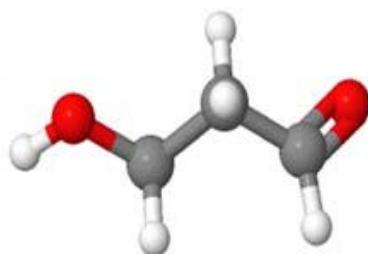


Figure I.1.19 : Molécule de 3-HPA

Le 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA) a été découvert initialement par Voisenet en 1910. Il observe sa formation à partir de glycérol lors de l'altération bactérienne du vin par *Bacillus amaracrylus* (maintenant classifiée comme étant *Paenibacillus polymixa* ; Voisenet 1910). Voisenet suppose alors que le 3-HPA est produit par déshydratation du glycérol, ce qui sera confirmé ultérieurement (Abeles *et al.* 1960). Ses propriétés physico-chimiques sont résumées dans le Tableau I.1.6.

Tableau I.1.6 : Principales caractéristiques et propriétés physico-chimiques du 3-HPA

Formule chimique	C ₃ H ₆ O ₂
Numéro CAS	2134-29-4
pKa	/
Masse molaire	74,04 g.mol ⁻¹
Densité	1,016
Log K_{o/w} (Hydrophobicité)*	- 1,14
Solubilité dans l'eau (25°C)*	10 ⁶ mg.L ⁻¹
Constante de Henry (Volatilité)*	3,29.10 ⁻⁹ atm.m ⁻³ /mol

* Valeurs estimées par l'intermédiaire de l'EPI SuiteTMestimation, développé par Syracuse Research corporation (SRC) et l'U.S. Environmental Protection Agency (copyright 2000).

Le groupement aldéhyde du 3-HPA explique en partie sa forte réactivité, à l'origine de ses propriétés particulières. En solution aqueuse, le 3-HPA subit ainsi une polymérisation ainsi qu'une hydratation pour former un équilibre principalement composé de 3-HPA monomérique, de 3-HPA hydraté et de dimères et trimères de 3-HPA (mélange appelé « système 3-HPA », Figure I.1.20). La production de 3-HPA par voie microbienne (Slininger *et al.* 1983, El-Ziney *et al.* 1998, Lüthi-Peng *et al.* 2002a et b, Ulmer and Zheng 2007, Krauter *et al.* 2012) et la composition du système 3-HPA (Talarico and Dobrogosz 1989, Vollenweider *et al.* 2003, Vollenweider *et al.* 2010) ont fait l'objet de nombreux travaux.

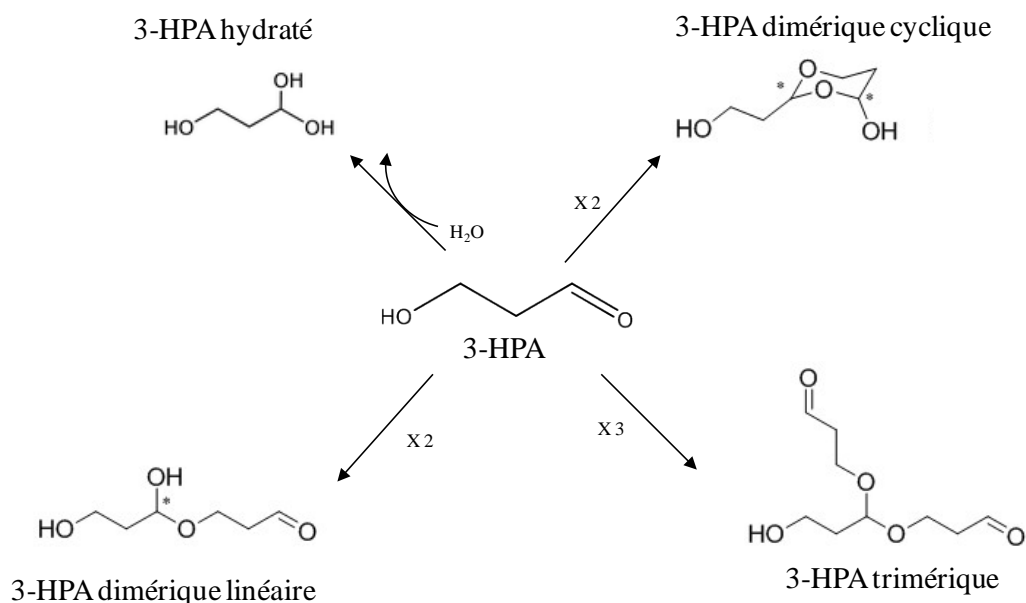


Figure I.1.20 : Composition détaillée du système 3-HPA (d'après Talarico and Dobrogosz 1989, Vollenweider *et al.* 2003, Vollenweider *et al.* 2010, Burgé *et al.* 2015c)

Il a notamment été montré que la composition de ce système était largement dépendante des conditions environnementales, notamment du pH, de la température et de la concentration en produit. A pH acide et pour une concentration inférieure à 1,4 M, le 3-HPA est principalement sous forme hydratée (Vollenweider *et al.* 2003). En augmentant la concentration (4,9 M), la forme prédominante devient la forme dimérique (Chen *et al.* 2002, Vollenweider *et al.* 2003). Le système 3-HPA en milieu aqueux et pH basique présente également des traces de formes acétales et hémiacétales en dimères, trimères, oligomères ou polymères (Sung *et al.* 2003, Bauer *et al.* 2010a).

Du fait de ses propriétés, le 3-HPA présente un intérêt particulier pour les industries alimentaires et chimiques ainsi que dans le domaine médical (Vollenweider and Lacroix 2004). Cette molécule possède en effet une forte activité antimicrobienne contre une grande variété de micro-organismes (Cleusix *et al.* 2007). Elle peut en outre servir de précurseur pour la synthèse chimique de différents composés d'intérêt (acroléine, acide acrylique, 1,3-PDO ; Figure I.1.21). Elle peut également être utilisée comme agent de réticulation ou fixée sur des tissus biologiques du fait de sa biocompatibilité (Chen *et al.* 2002 et 2004). Ainsi, du fait de son activité antimicrobienne, le 3-HPA pourrait constituer une alternative au glutaraldéhyde, couramment utilisé dans la fabrication de prothèses, en diminuant notamment la réaction inflammatoire (Sung *et al.* 2002 et 2003).

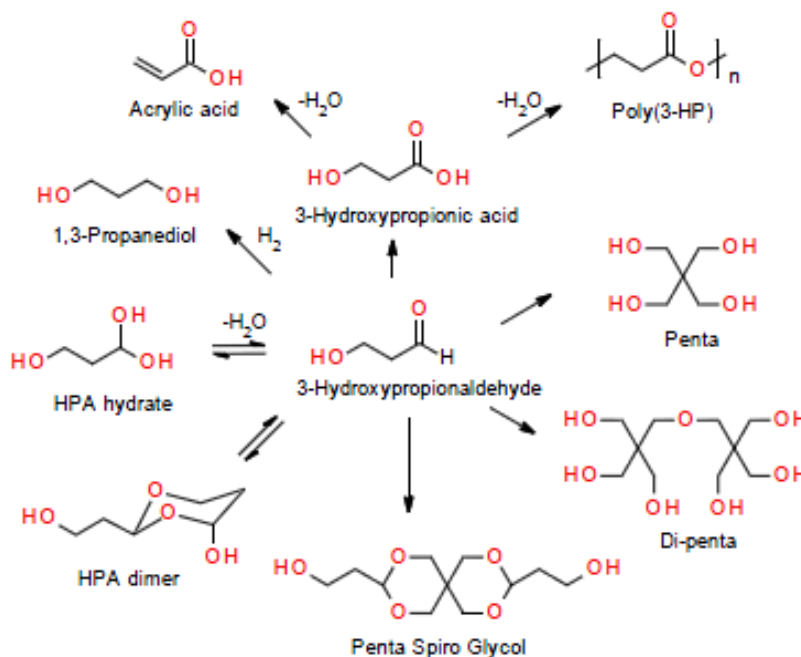


Figure I.1.21 : Dérivés possibles à partir du 3-HPA (Sardari 2013)

Le 3-HPA étant un intermédiaire métabolique, il n'est donc pas accumulé au sein de la bactérie productrice mais réduit en 1,3-PDO et/ou oxydé en 3-HP, selon les conditions environnementales dans lesquelles se trouve le micro-organisme (conditions d'aération, ratio entre NADH_2 et NAD^+). En anaérobiose, la réduction du 3-HPA en 1,3-PDO permet ainsi de régénérer le NAD^+ utilisé lors de la glycolyse. Au contraire, l'oxydation du 3-HPA en 3-HP nécessite l'utilisation de NAD^+ , converti en NADH_2 . Ainsi, l'accumulation de 3-HPA dans le milieu est favorisée quand il y a peu ou pas de glucose (ratio glucose/glycérol $< 0,33$; El-Ziney *et al.* 1998, Lüthi-Peng *et al.* 2002a). Afin de minimiser la formation de co-produits, notamment sous forme de 1,3-PDO en présence de glucose, mais aussi afin de limiter la présence des métabolites issus de la croissance, une production du 3-HPA par *L. reuteri* en deux étapes est privilégiée : (Lüthi-Peng *et al.* 2002a, Doleyres *et al.* 2005, Rütli *et al.* 2011), soient :

- (1) une phase de croissance microbienne, permettant la production de la biomasse
- (2) une phase de bioconversion du glycérol en 3-HPA par la biomasse produite en (1).

Concernant les conditions environnementales adéquates, la température optimale pour la production du 3-HPA semble être de 37°C et le pH optimal de 7,0 (+/- 0,5). De fortes concentrations en substrat glycérol (au-delà de 300 à 400 mM) peuvent induire une diminution de la production, en raison de la toxicité du 3-HPA formé pour les bactéries productrices elles-mêmes (Lüthi-Peng *et al.* 2002b) et d'une inhibition de la glycérol/diol déshydratase (Yamanishi *et al.* 2012) par le substrat. La présence de NaCl dans le milieu diminue également fortement l'accumulation de 3-HPA et ce, quel que soit le milieu (Lüthi-Peng *et al.* 2002a), sans qu'aucune explication n'ait encore été apportée à ce problème. La littérature s'accorde cependant sur les points suivants : la production de 3-HPA est largement dépendante de la température, du pH, de la concentration en glycérol et en carbohydrates (glucose, lactose, saccharose). Elle dépend également de la concentration en bactérie et de l'âge de la culture à la récolte (donc de la physiologie des lactobacilles), et doit être réalisée en anaérobiose.

Étant donné la vitesse de croissance et le statut G.R.A.S. de *L. reuteri*, ainsi que les bonnes performances de production obtenues à partir du glycérol (108 g.L^{-1} , $21,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, Krauter *et al.* 2012), elle constitue le producteur principal du 3-HPA à l'heure actuelle, même si *K. pneumoniae* est également utilisée (46 g.L^{-1} , Vancauwenberge *et al.* 1990 ; 54 g.L^{-1} , Ulmer and Zeng, 2007). Afin d'optimiser cette bioconversion, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre, principalement en piégeant la fonction aldéhyde afin de bloquer son action inhibitrice par une démarche d'*In Situ*

Product Removal (ISPR) ou en immobilisant les cellules en réacteur pour les protéger de l'action délétère du 3-HPA.

L'approche de type ISPR en fermentation ou bioconversion extractive permet de séparer un produit potentiellement toxique pour les bactéries productrices, en évitant son accumulation dans le milieu, et de faciliter le procédé d'extraction en aval tout en conduisant à une amélioration des titre, productivité et rendement de production (Freeman *et al.* 1993). Compte-tenu des propriétés de la molécule (faible poids moléculaire, non chargée et très soluble dans l'eau), le 3-HPA ne peut pas être facilement extrait d'une solution aqueuse. Pour bloquer sa fonction aldéhyde et ainsi diminuer l'inhibition exercée sur les cellules, le 3-HPA a été donc fixé avec succès en utilisant des semicarbazides et des carbohydrazides (Figure I.1.22), pour former respectivement des semicarbazones (Vancauwenberge *et al.* 1990, Ulmer and Zeng 2007, Sardari *et al.* 2014) et des carbohydrazones (Krauter *et al.* 2012) moins toxiques. Mais ces deux approches, bien que conduisant à des résultats intéressants en termes de production de la molécule d'intérêt (plusieurs dizaines de g.L⁻¹), posent problème pour le recyclage de l'extractant et la récupération de la molécule d'intérêt (complexe obtenu peu ou pas séparable). D'autres approches réversibles ont aussi été testées, parmi lesquelles une complexation avec du bisulfite de sodium (Sardari *et al.* 2013, Stevens *et al.* 2013) ou du sulfite d'hydrogène (Rütti *et al.* 2011), fixés ou non sur une résine échangeuse d'anions, conduisant à une diminution de la toxicité observée mais des résultats mitigés en termes de production (maximum 24 g.L⁻¹), la présence de résine dans le milieu affectant notamment les performances de bioconversion.

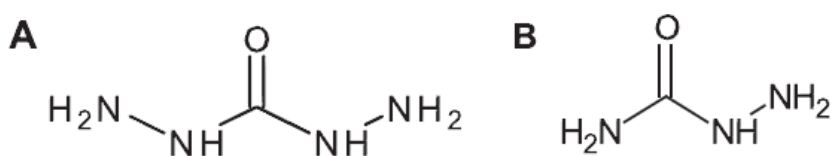


Figure I.1.22 : Structures chimiques de la carbohydrazide et de la semicarbazide

L'utilisation de cellules immobilisées constitue également une approche d'intérêt pour la production de 3-HPA, notamment en protégeant la cellule des dommages physiques et chimiques provoqués par la molécule (Doleyres *et al.* 2004a et b) et en évitant les étapes de lavage par centrifugation pouvant affecter l'état physiologique des bactéries productrices. Les premiers résultats (immobilisation dans des billes d'alginate ; Zamudio-Jaramillo *et al.* 2009) confirment le potentiel de cette approche pour la production biotechnologique du 3-HPA en augmentant la

survie cellulaire et la productivité. Plus récemment, des essais de production avec des cellules de *L. reuteri* immobilisées sur des nanoparticules super-paramagnétiques ont également été menés (Chen and Chen, 2013), permettant notamment d'éviter les étapes de centrifugation entre les phases de croissance et de bioconversion du glycérol, de n'utiliser qu'un seul bioréacteur, et de diminuer la résistance au transfert possiblement observée lors de l'immobilisation dans des billes.

1.3.3.2.4 Le 1,3-PDO, une molécule d'intérêt déjà valorisée

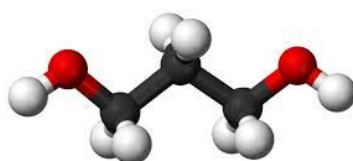


Figure I.1.23 : Molécule de 1,3-PDO

Comme tous les diols, le 1,3-PDO présente une forte réactivité chimique permettant la synthèse de diverses molécules d'intérêt (intermédiaires chimiques, solvants, polymères) qui trouvent des applications dans des domaines variés (chimie fine, cosmétique, adhésifs, résine). Cependant, comme dans le cas du 3-HP, sa synthèse par voie chimique pose de nombreux problèmes (impacts néfastes sur l'environnement, rendements faibles, purification coûteuse ; Saxena *et al.* 2009). Un grand nombre de travaux portent donc sur la production de 1,3-PDO par voie biotechnologique, notamment en utilisant *L. reuteri* comme micro-organisme producteur et le glycérol comme substrat de départ (Vaidyanathan *et al.* 2011, Jolly *et al.* 2014, Vieira *et al.* 2015). Les propriétés physico-chimiques du 1,3-PDO sont détaillées dans le tableau I.1.7.

Tableau I.1.7 : Principales caractéristiques et propriétés physico-chimiques du 1,3-PDO

Formule chimique	C ₃ H ₈ O ₂
Numéro CAS	504-63-2
pKa	/
Masse molaire	76,09 g.mol ⁻¹
Densité	1,05
Log K_{o/w} (Hydrophobicité)*	-1,04
Solubilité dans l'eau (25°C)*	10 ⁶ mg.L ⁻¹
Constante de Henry (Volatilité)*	1,74.10 ⁻⁷ atm.m ⁻³ /mol

* Valeurs estimées par l'intermédiaire de l'EPI Suite™ estimation, développé par Syracuse Research corporation (SRC) et l'U.S. Environmental Protection Agency (copyright 2000).

Contrairement au 3-HP, le 1,3-PDO est déjà produit à l'échelle industrielle par voie biotechnologique (*E. coli* OGM) à partir d'amidon de maïs depuis fin 2006 par la co-entreprise créée en 2004 entre DuPont et Tate (DuPont Tate & Lyle Bioproducts) avec une capacité d'environ 45 000 t/an en 2011²⁰. La société Metabolic Explorer produit également cette molécule d'intérêt, à l'échelle pilote uniquement, mais a entamé en 2013 la construction d'un site de production en Malaisie avec une capacité initiale de 8 500 t/an²¹. Les prévisions à l'horizon 2020 font état d'un marché estimé à 560 millions de dollars, équivalent à une croissance de 20 % entre 2012 et 2019²².

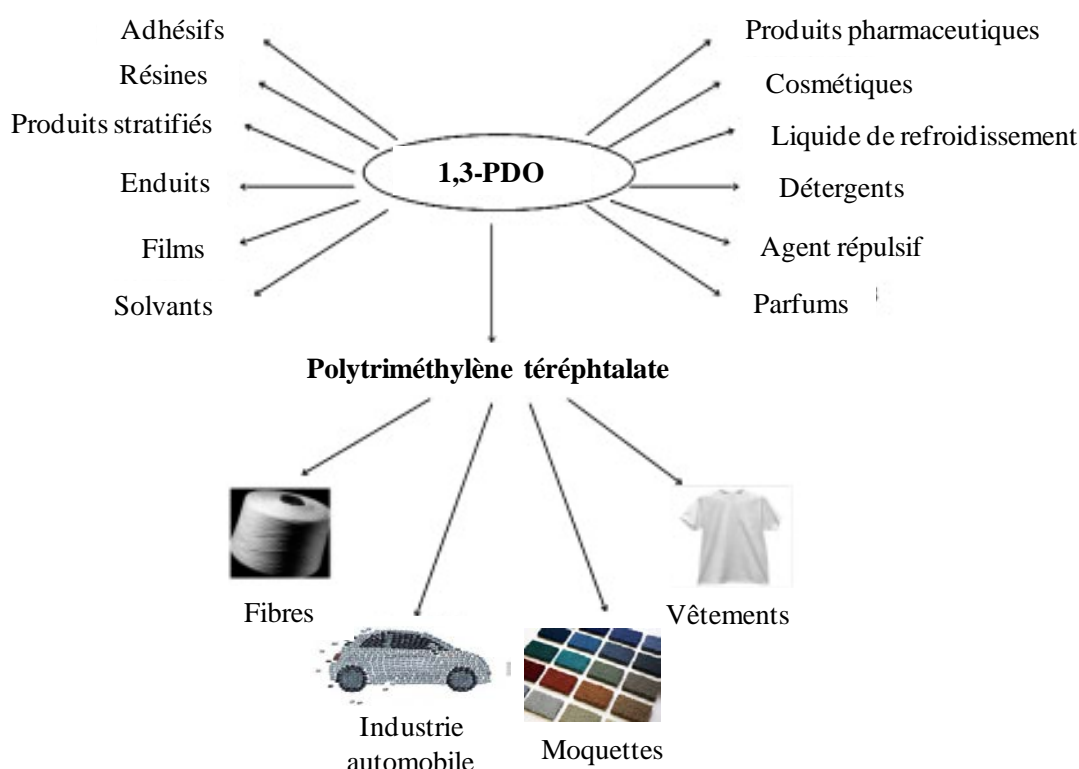


Figure I.1.24 : Dérivés possibles à partir du 1,3-PDO (d'après Kaur *et al.* 2012)

Même si les productions de 1,3-PDO par des micro-organismes naturels à partir du glycérol sont intéressantes (entre 48 et 70 g.L⁻¹ chez *K. pneumoniae*, entre 48 et 66 g.L⁻¹ chez *C.*

²⁰ www.dupont.com (consulté en septembre 2015)

²¹ www.metabolic-explorer.com (consulté en septembre 2015)

²² Etude de "Market and Market" (nov. 2012) 1,3-Propanediol (PDO) Market by Applications & Geography - Global Market Trends & Forecasts to 2019

butyricum ; Drozdzyńska *et al.* 2011), des approches de type ingénierie métabolique ont été développées, principalement sur *K. pneumoniae*, afin de pallier certains problèmes rencontrés : production insuffisante de la molécule d'intérêt (Zheng *et al.* 2006, Chen *et al.* 2009), toxicité des métabolites de la voie (3-HPA notamment, Hao *et al.* 2008), génération de co-produits (3-HP par exemple, Horng *et al.* 2010, Drozdzyńska *et al.* 2011), disponibilité du co-facteur NADH₂ (Saxena *et al.* 2009, Ma *et al.* 2010, Kaur *et al.* 2012) et de la vitamine B12 (Celinska 2000). L'inconvénient majeur de ces micro-organismes résidant dans leur caractère pathogène, d'autres micro-organismes non pathogènes ont également été modifiés à des fins de production de la molécule d'intérêt, comme *S. cerevisiae* (Rao *et al.* 2008) et *E. coli* (Chotani *et al.* 2000).

1.3.3.3 Mécanismes d'excrétion du 3-HP par les bactéries productrices

Les mécanismes de transport du substrat vers l'intérieur des cellules et ceux liés à l'excrétion des produits sont des éléments importants à étudier pour mieux comprendre et ainsi optimiser la production de 3-HP. Les mécanismes qui régissent l'excrétion du 3-HP n'étant pas connus ni étudiés en détails, il est supposé dans la littérature qu'ils sont similaires à ceux impliqués dans l'export du 2-HP. Trois types de transport sont ainsi décrits pour l'acide lactique : symport du lactate et des protons (Konings *et al.* 1997), antiport avec les substrats (Loubière *et al.* 1992) ou transport actif (donc nécessitant de l'ATP) par des transporteurs de la famille ABC (ATP Binding Cassette ; Braibant *et al.* 2000, Poelarends *et al.* 2000). Il existe cependant une différence importante, l'acide lactique étant excrété pendant la phase de croissance, donc en présence d'un substrat énergétique, alors que le 3-HP est excrété durant la bioconversion et donc en absence de substrat énergétique.

Plus globalement, l'excrétion d'acides organiques nécessite une quantité importante d'énergie cellulaire, particulièrement à pH extracellulaire acide. Si cette quantité est supérieure à celle issue de la formation des produits, un déficit est créé, affectant la croissance et de nombreuses autres fonctions cellulaires (van Maris *et al.* 2004). En conséquence, une production prolongée de 3-HP, surtout en milieu acide et à forte concentration, nécessite la production d'ATP par une voie métabolique annexe afin de subvenir aux besoins cellulaires et de maintenir un pH intracellulaire constant, par excrétion du 3-HP contre le gradient de protons. Cependant, la production d'une mole d'ATP par mole de 3-HP produit chez *L. reuteri* à partir du glycérol (Figure I.1.15) constitue un avantage par rapport aux voies métaboliques synthétiques utilisant le glucose comme substrat de départ et qui, souvent, ne génèrent pas d'ATP (Kumar *et al.* 2013a).

1.4 Enjeux pour une bioconversion optimisée du glycérol en 3-HP

De fortes concentrations de produit, productivité et rendement de conversion du substrat en produit sont généralement nécessaires pour que la production d'une molécule soit commercialement viable. Bien que plusieurs voies biotechnologiques de production du 3-HP, avec ou sans ingénierie métabolique, aient été mises en évidence et développées, les performances obtenues ne sont pas suffisantes et des améliorations sont indispensables. La toxicité induite par le 3-HPA et le 3-HP et les faibles rendements atteints constituent ainsi des freins à une production optimale et empêchent un développement à l'échelle pilote voire industrielle (Suthers and Cameron 2005, Jiang *et al.* 2009).

1.4.1 Disponibilité des cofacteurs et synthèse de vitamine B12

La régénération de NAD^+ constitue un enjeu important pour produire le 3-HP à partir de glycérol. Le maintien du niveau optimal d'oxygène permettant la régénération continue du NAD^+ sans interférer avec la synthèse de vitamine B12 (en anaérobiose) et la production de 3-HP risque de s'avérer compliqué. Pour résoudre ce problème, une stratégie a été proposée (Ashok *et al.* 2013b) chez *K. pneumoniae* OGM, qui consiste en une production anaérobie de 3-HP en présence de nitrate comme accepteur d'électrons (22 g.L⁻¹ de 3-HP obtenu). Cet ajout de nitrate permet bien de régénérer le NAD^+ mais inhibe l'activité des enzymes de la voie réductrice et donc diminue la production de 3-HP. Afin d'orienter le flux du glycérol vers le 3-HP, l'expression de la glycérol kinase et de la 1,3-PDO oxydoréductase a donc été supprimée, permettant de doubler la production de 3-HP par rapport à la souche de référence utilisée sans nitrate. L'insertion dans des micro-organismes hôtes de voies de biosynthèses génératrices de NAD^+ a également été suggérée (Yasuda *et al.* 2006).

Chez *L. reuteri*, la conversion du glycérol en 3-HPA est catalysée par une glycérol/diol déshydratase vitamine B12-dépendante (Sriramulu *et al.* 2008, Dishisha *et al.* 2014). Cette vitamine est nécessaire à la réactivation de l'enzyme (Toraya, 2000, Yamanishi *et al.* 2012). La quantité de vitamine B12 disponible dans la cellule est donc un élément primordial pour le maintien de la consommation du glycérol. Ainsi, certains travaux relatent un ajout de vitamine B12 au milieu de bioconversion (Toraya, 2000). D'autre part, bien que conduisant à des niveaux de production de 3-HP intéressants, l'utilisation d'*E. coli* comme micro-organisme producteur est limitée en raison de son incapacité à synthétiser cette vitamine, à l'inverse de *K. pneumoniae* en anaérobiose. Cela explique l'augmentation du nombre de travaux utilisant *K. pneumoniae* pour

produire du 3-HP, bien que cette bactérie soit pathogène. Plusieurs approches d'ingénierie métabolique ont également été testées pour pallier cette difficulté, par exemple en utilisant une glycérol déshydratase vitamine B12-indépendante (existant chez *Clostridium butyricum* par exemple ; Raynaud *et al.* 2003), en augmentant le taux d'expression des gènes impliqués dans la synthèse de vitamine B12 (Dunn-Coleman *et al.* 2006) ou encore en augmentant le stockage de la molécule par augmentation de l'expression des gènes codants pour des protéines impliquées dans son transport (récepteur, perméase, protéine de transport ATP/GTP-dépendante ; Bulhuis *et al.* 2002). L'utilisation de micro-organismes producteurs naturels de vitamine B12 tels que *Pseudomonas denitrificans* ou l'insertion de la voie complète de production de la molécule chez un hôte sont aussi envisagées (Kumar *et al.* 2013a).

1.4.2 Inhibition et toxicité provoquées par le substrat et les métabolites

De nombreux travaux font état et décrivent les inhibition (notamment des activités enzymatiques) et impacts toxiques (sur la viabilité ou la cultivabilité) dus aux métabolites produits lors de la bioconversion du glycérol (3-HP ou 3-HPA). Des phénomènes d'inhibition et de toxicité des bactéries productrices ont ainsi été mis en évidence, d'une part par acidification du milieu liée à l'excrétion du 3-HP et, d'autre part, liés au stress oxydatif, à la perte d'activité enzymatique (Schaefer *et al.* 2010) et de cultivabilité (Doleyres *et al.* 2005) vraisemblablement causés par le 3-HPA. Concernant le 1,3-PDO, aucun effet inhibiteur n'a été montré dans la gamme de concentration attendue lors de la bioconversion du glycérol (pas d'effet visible sur *Clostridium butyricum* jusqu'à 50 g.L⁻¹ ; Colin *et al.* 2000). Cependant, il a été rapporté que le glycérol provoquait une inhibition de l'activité de la glycérol/diol déshydratase (Yamanishi *et al.* 2012), via un clivage irréversible de la liaison CO-C de la vitamine B12, qui conduit à la formation de 5'-déoxyadénosine et d'autres espèces de cobalamine non identifiées (Toraya, 2000). Celles-ci restent attachées à la glycérol/diol déshydratase et conduisent à sa désactivation irréversible (Toraya, 2000). La réactivation *in situ* de la glycérol/diol déshydratase désactivée nécessite l'intervention d'enzymes spécifiques (glycerol-dehydratase-reactivating factor) utilisant de l'ATP et des ions Mg²⁺, qui réactivent l'enzyme en échangeant une coenzyme B12 endommagée par une coenzyme intacte (Toraya, 2000, Yamanishi *et al.* 2012).

1.4.2.1 Inhibition et toxicité du 3-HPA : un stress connu et en partie caractérisé

Le 3-HPA est hautement toxique pour de nombreux micro-organismes, aussi bien des bactéries à Gram-positif ou négatif (Axelsson *et al.* 1989, Talarico *et al.* 1988, Barbirato *et al.* 1996, Cleusix *et al.* 2007, Spinler *et al.* 2008) que des levures (*S. cerevisiae*, Dobrogosz and Lindgren, 1994), des protozoaires (*Trypanosoma brucei brucei*, Yunmbam and Roberts, 1992 et 1993) ou des bactériophages (phage lambda d'*E. coli*, Dobrogosz and Lindgren, 1995). De plus, son accumulation affecte la production de 3-HP par la cellule. Si de nombreuses hypothèses pour expliquer son effet bactéricide ont été émises, ses mécanismes d'action ne sont qu'en partie élucidés (Rasch, 2002, Vollenweider *et al.* 2003 et 2010, Schaefer *et al.* 2010). L'accumulation de 3-HPA est due à un déséquilibre entre les activités de la GDH (glycérol → 3-HPA), des PduP, PduL et PduW (3-HPA → 3-HP) et de la PduQ (3-HPA → 1,3-PDO).

Tableau I.1.8 : Activité antimicrobienne du 3-HPA contre différentes familles de bactéries (Cleusix *et al.* 2007)

Organisme	Souche	CMI (mM)	CMB (mM)
<i>Escherichia coli</i>	DSM 5698	7,5 - 15	15 - 30
<i>Bacteroides vulgatus</i>	DSM 1447	< 1,9	1,9 - 3,8
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	DSM 2079	1,9 - 3,8	1,9 - 3,8
<i>Bacteroides fragilis</i>	LMG 10263	3,8 - 7,5	3,8 - 7,5
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	LMG 11043	1,9 - 3,8	7,5 - 15
<i>Bifidobacterium longum</i>	DSM 20219	1,9 - 3,8	3,8 - 7,5
<i>Bifidobacterium longum infantis</i>	DSM 20088	1,9 - 3,8	1,9 - 3,8
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSM 20456	3,8 - 7,5	7,5 - 15
<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM 20213	7,5 - 15	7,5 - 15
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	15 - 40	15 - 40
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334	15 - 40	40 - 80
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ETH-Z	15 - 40	15 - 40
<i>Lactobacillus salivarius</i>	ETH-Z	15 - 40	40 - 80
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM 20016	30 - 50	60 - 120
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ATCC 55730	30 - 50	60 - 120
<i>Eubacterium bifforme</i>	DSM 3989	1,9 - 3,8	3,8 - 7,5
<i>Eubacterium eligens</i>	DSM 3376	1,9 - 3,8	1,9 - 3,8
<i>Colinsella aerofaciens</i>	DSM 3979	3,8 - 7,5	7,5 - 15
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	3,8 - 7,5	30 - 50
<i>Streptococcus salivarius</i>	DSM 20560	3,8 - 7,5	15 - 30
<i>Clostridium difficile</i>	ETH-Z	< 1,9	3,8 - 7,5
<i>Clostridium clostridioforme</i>	DSM 933	15 - 30	15 - 30
<i>Ruminococcus productus</i>	DSM 2950	7,5 - 15	3,8 - 7,5
<i>Listeria innacua</i>	HPB 13	7,5 - 15	7,5 - 15
<i>Listeria ivanovii</i>	HPB 28	3,8 - 7,5	7,5 - 15

Bien que produit par cette bactérie, le 3-HPA présente une activité antimicrobienne avérée sur *L. reuteri* (Tableau I.1.8). En 2007, Cleusix *et al.* ont testé l'activité antibactérienne de ce composé contre une population représentative des bactéries intestinales (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, etc.) en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire la concentration la plus faible empêchant la croissance bactérienne ; et la concentration minimale bactéricide (CMB), c'est-à-dire la concentration la plus faible induisant une mortalité de 99,99 %. Les résultats de cette étude montrent que toutes ces bactéries testées sont sensibles, mais à des niveaux différents, compris entre 2 et 50 mM en 3-HPA pour la CMI, et entre 2 et 120 mM pour la CMB (Tableau I.1.8). *L. reuteri*, bien que sensible à ce stress, apparaît cependant comme plus résistante, ce qui est logique étant donné que la synthèse de 3-HPA, liée à son caractère probiotique, constitue un mécanisme d'auto-défense.

Des recherches ont également fait état d'une perte importante de cultivabilité, de l'ordre de 10 unités logarithmique d'unités formant colonies par millilitre, concomitante à la production de 3-HPA par *L. reuteri* (Figure I.1.25 ; Doleyres *et al.* 2005), et d'inhibition de la croissance de différents pathogènes entériques provoquée par cette molécule (Figure I.1.26 ; Spinler *et al.* 2008).

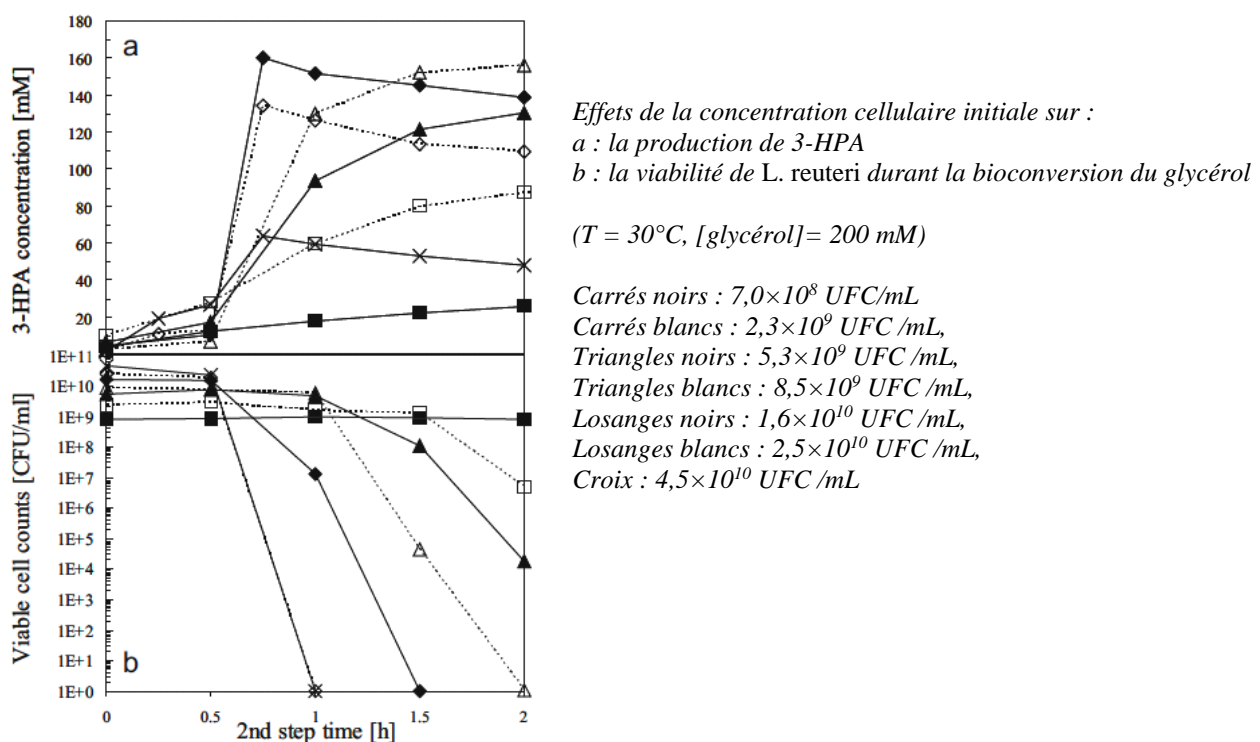


Figure I.1.25 : Evolution de la concentration en 3-HPA et de la cultivabilité cellulaire sur milieu gélosé (exprimée en UFC/mL) au cours de la bioconversion du glycérol par *L. reuteri* et en fonction de la concentration cellulaire initiale (Doleyres *et al.* 2005).

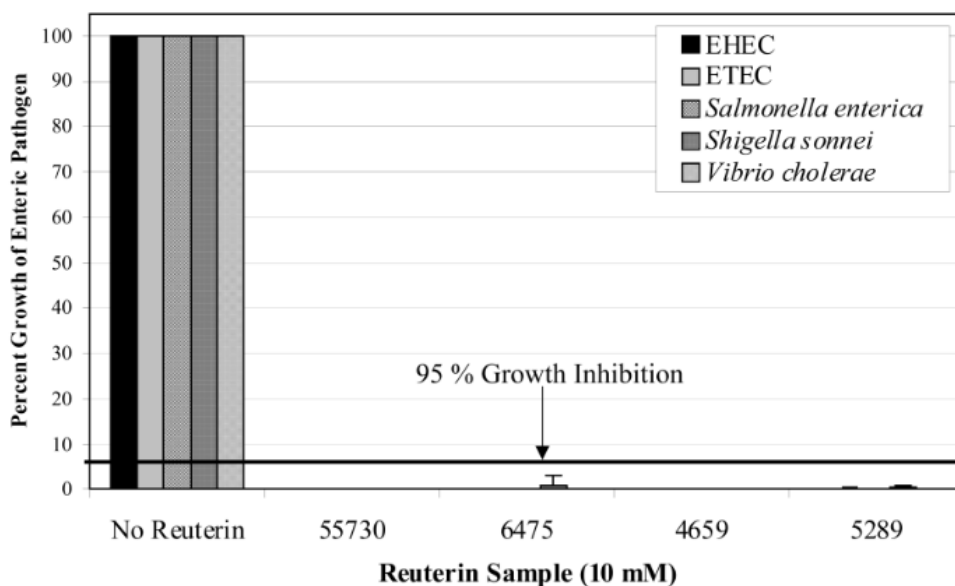


Figure I.1.26 : Evaluation de l'effet inhibiteur du 3-HPA (10 mM ajoutés au milieu de culture) produit par 4 souches de *L. reuteri* (ATCC 55730, ATCC 6475, ATCC 4659 et ATCC 5289) sur la croissance de différents micro-organismes pathogènes (EHEC = Entéro-hémorragique *E. coli*, ETEC = Entéro-toxigénique *E. coli*) (Spinler *et al.* 2008).

Schaefer *et al.* (2010) ont cherché à élucider les mécanismes à l'origine de la toxicité générée par le 3-HPA. Ils ont ainsi démontré que le 3-HPA induisait un stress oxydatif sur *E. coli* et ont émis l'hypothèse que ce phénomène était lié à l'interaction de la fonction aldéhyde du 3-HPA avec les groupements thiols des protéines. Cette étude met en effet en évidence que l'exposition d'*E. coli* au 3-HPA conduit à une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines contenant des groupements thiols (groupements -SH présents sur les acides aminés cystéines) et des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (thiorédoxine, glutaredoxine, hydroperoxide réductase). Il a également été montré qu'une souche dépourvue du régulateur positif de transcription OxyR (gène impliqué dans la réponse au stress oxydatif) était quatre fois plus sensible à l'action du 3-HPA. Enfin, l'addition de cystéines dans le milieu diminue l'effet antimicrobien observé, par interaction du 3-HPA avec leurs groupements thiols. Des résultats similaires ont été rapportés concernant la capacité du 3-HPA à se lier aux acides aminés cystéines, et, dans une moindre mesure, aux acides aminés tryptophanes et histidines (Vollenweider *et al.* 2010). Ces travaux ont également montré une régulation de l'expression de certaines protéines suite à une exposition d'*E. coli* au 3-HPA (1 mM). En effet, certaines protéines de ménage ainsi que des enzymes impliquées dans les voies métaboliques productrices d'énergie étaient sous-exprimées en présence de 3-HPA mais pas de propanal (contrôle), tandis que l'expression de

quatre protéines chaperonnes (groES, grpE, hsp70, htrA) de la famille des protéines de choc thermique (HSP) était induite, synonyme de situation de stress pour la cellule. *E. coli* enclenche également une réponse au stress oxydatif généré en présence de 3-HPA, en augmentant l'expression de protéines impliquées dans la régénération du système rédox (GSH réductase, peroxidoxin) (Vollenweider *et al.* 2010).

L'impact des conditions environnementales sur l'effet inhibiteur du 3-HPA a été étudié sur *E. coli* (Rasch, 2002), montrant notamment une augmentation des effets avec la température (entre 10 et 30°C). Le pourcentage de sel dans le milieu (NaCl entre 0,5 et 3 % m/v) ainsi que le pH (entre 4,5 et 6,5) n'auraient à l'inverse que peu ou pas d'effet.

Plusieurs solutions ont été proposées pour tenter de diminuer l'inhibition exercée sur les bactéries productrices, parmi lesquelles le blocage de la fonction aldéhyde par des composés piègeurs, appelés « scavengers » (Ulmer and Zeng 2007, Krauter *et al.* 2012, Stevens *et al.* 2013, Sardari *et al.* 2014). L'utilisation de carbohydrazides et un apport contrôlé en glycérol dans le milieu de bioconversion par fed-batch ont ainsi permis de limiter l'accumulation du 3-HPA et sa toxicité, ce qui a conduit à une amélioration des performances de production de 3-HP par *L. reuteri* (Dishisha *et al.* 2014). Cette approche de type fed-batch a également été utilisée avec succès pour la production de 3-HP par ingénierie métabolique chez *E. coli* (42,1 g.L⁻¹, Jung *et al.* 2014 ; 57 g.L⁻¹, Kim *et al.* 2014) et *K. pneumoniae* (48,9 g.L⁻¹, Huang *et al.* 2013). Une régulation de l'expression des gènes de la voie peut également être envisagée par ingénierie métabolique (surexpression des gènes codant pour les enzymes PduQ, PduP, PduL et PduW par exemple, permettant d'augmenter l'utilisation du 3-HPA formé et d'éviter son accumulation dans le milieu).

1.4.2.2 Inhibition et toxicité provoquées par le 3-HP : deux effets potentiels à discriminer (molécule et pH)

Comme les autres acides organiques, le 3-HP induit une inhibition de la croissance bactérienne et de sa propre production. Ainsi, le rendement de production du 3-HP à partir de glycérol dans la période où sa concentration est la plus importante (entre 18 et 27 g.L⁻¹) diminue de façon significative chez les recombinants de type *E. coli* ou *K. pneumoniae* (Rathnasingh *et al.* 2009, Ashok *et al.* 2013a). Cette baisse serait due à une diminution de l'activité enzymatique de la glycérol déshydratase (DhaB) et de l'aldéhyde déshydrogénase (PuuC et KGDH) utilisées dans ces études. De plus, lorsque du 3-HP est ajouté au milieu de culture, le taux de croissance, la consommation de glycérol et la production de 3-HP (passage de 2,5 à 0,7 g.L⁻¹) diminuent

progressivement avec la concentration en acide (entre 0 et 70 g.L⁻¹, Kumar *et al.* 2012). En général, la toxicité des acides organiques est liée à leur capacité à diffuser à travers la membrane cellulaire. A l'intérieur de la cellule, ces composés se dissocient et libèrent des protons H⁺ qui vont conduire à l'abaissement du pH intracellulaire. Cette acidification du cytoplasme peut endommager l'intégrité des bases puriques et causer la dénaturation de certaines enzymes, ce qui impacte le métabolisme cellulaire (Booth *et al.* 2002, Roe *et al.* 2002, Warnecke and Gill 2005). Celui-ci peut être sérieusement affecté si la cellule n'est pas en mesure de maintenir le pH intracellulaire dans une certaine gamme et, à l'extrême, conduire à la mort de la cellule (Halm *et al.* 2004).

La toxicité liée à la production du 3-HP peut donc être de deux ordres : liée à la chute du pH concomitante à sa production ou due aux caractéristiques intrinsèques de la molécule. Les travaux de Sebastianes *et al.* (2012) constituent la première étude portant sur l'activité antimicrobienne du 3-HP liée à sa fonction acide carboxylique. Les auteurs ont ainsi montré que la croissance de *Staphylococcus aureus* et de *Salmonella typhi* était inhibée par l'acide carboxylique (Figure I.1.27). Les CMI ont été déterminées et atteignent 64 mg/L pour les deux micro-organismes testés. En revanche, l'ester éthylique correspondant (3-hydroxypropionate d'éthyle) ne présente pas d'activité antimicrobienne (Figure I.1.27). Le groupement acide carboxylique est donc essentiel à l'activité inhibitrice du 3-HP.

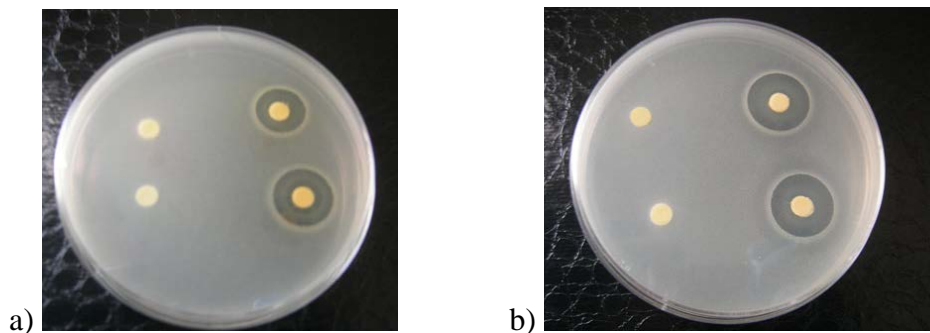


Figure I.1.27 : Evaluation de l'activité antibactérienne du 3-HP. Sur le côté droit des boîtes : activité du 3-HP (50 mg/disque) contre *S. aureus* (a) et *S. typhi* (b). Sur le côté gauche : aucune activité antimicrobienne n'est observée pour le 3-hydroxypropionate d'éthyle (50 mg/disque) sur ces deux micro-organismes (Sebastianes *et al.* 2012).

La CMI du 3-HP sur *E. coli* a également été évaluée (15 g.L⁻¹ ; Warnecke *et al.* 2012). Cette CMI varie en fonction des micro-organismes et des conditions environnementales (pH,

température, composition du milieu). Il est donc difficile de comparer la toxicité d'un acide sur plusieurs organismes différents ou de plusieurs acides sur la même bactérie. Avec le développement de nouvelles techniques d'exploration et d'analyses du génome et l'avènement des techniques de type « omique », l'identification des mécanismes impliqués dans ces phénomènes de toxicité progresse. En 2010, Warnecke *et al.* suggèrent que la toxicité du 3-HP sur *E. coli* serait due, au moins en partie, à une interférence anion-spécifique avec le métabolisme cellulaire et notamment à l'inhibition des voies chorismate et thréonine. Un travail a également été mené sur l'identification de gènes dont l'expression pourrait améliorer la tolérance d'*E. coli* au stress induit par le 3-HP (Warnecke *et al.* 2008, 2010, 2012). Un peptide de 21 acides aminés a notamment été identifié, permettant d'augmenter la résistance de 133 % (augmentation de la CMI de 15 à 20 g.L⁻¹) lorsque le gène *iroK* est exprimé (Warnecke *et al.* 2012).

Les problèmes induits par le stress acide peuvent être en partie résolus en adaptant les micro-organismes à des pH faibles, ce qui permettrait de conduire l'étape de bioconversion à un pH inférieur au pKa de l'acide et donc à diminuer le coût de production en évitant l'ajout de bases pendant le procédé (4,51 dans le cas du 3-HP ; Warnecke and Gill, 2005). Une autre solution pour diminuer la toxicité induite par le 3-HP serait de l'extraire en continu du milieu de production par des techniques adaptées, selon une démarche de type ISPR (*In Situ Product Recovery*). Ces techniques sont décrites pour différents acides organiques, notamment le 2-HP, et sera abordée dans la seconde partie de ce travail (Partie I.2.2).

1.4.2.3 Évaluation de l'état physiologique des bactéries productrices par fluorescence

La détermination de l'état physiologique au niveau de chaque cellule doit prendre en compte des éléments fondamentaux de viabilité ou d'activité spécifique, au-delà de la simple cultivabilité. Les méthodes associées à cette détermination sont basées sur l'utilisation de marqueurs fluorescents, jouant un rôle d'indicateur d'activité biologique ou d'indicateurs structuraux, tels que l'activité enzymatique, le pH intracellulaire, le potentiel de membrane, l'intégrité membranaire ou l'état de stress oxydatif. La quantification de la fluorescence est réalisée par microscopie à fluorescence, microscopie confocale ou par cytométrie en flux.

Actuellement, de nombreux marqueurs fluorescents sont utilisés pour caractériser l'état physiologique des bactéries. Ils permettent d'estimer des paramètres cellulaires importants pour la viabilité et l'activité d'une cellule bactérienne (Figure I.1.28).

Marqueurs physiologiques

Marqueurs taxonomiques

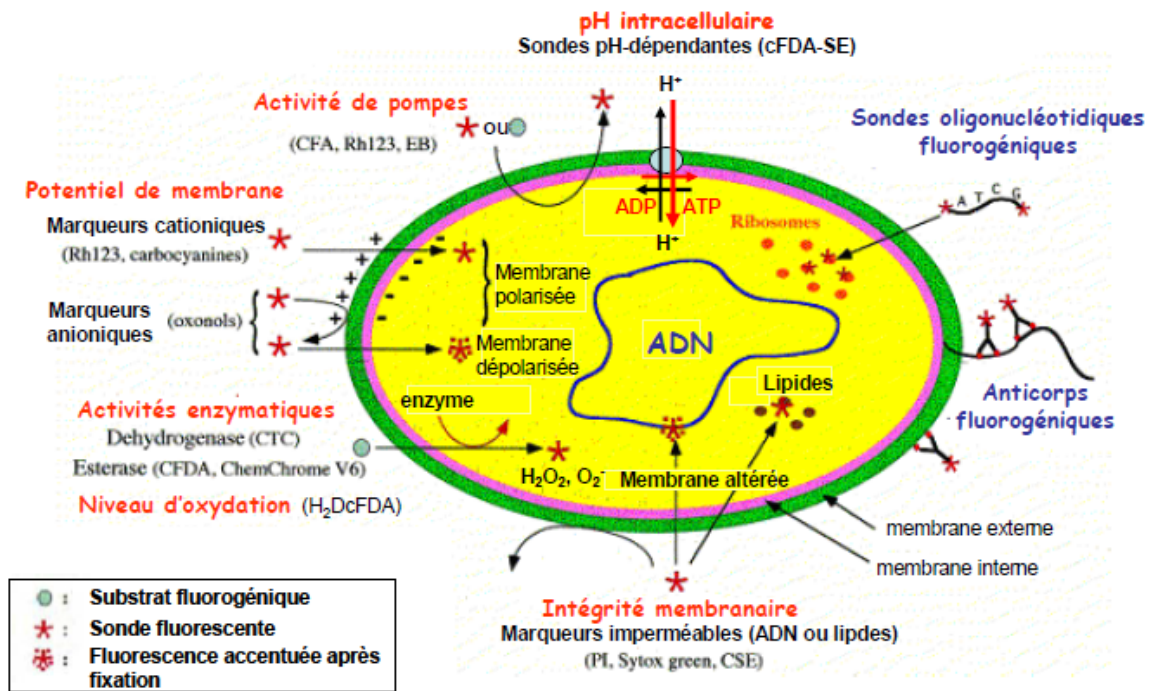


Figure I.1.28 : Exemples de paramètres cellulaires évalués à l'aide de marqueurs fluorescents physiologiques et taxonomiques (Rault 2009).

1.4.2.3.1 Evaluation de l'intégrité membranaire : une estimation de la mortalité cellulaire

La mortalité cellulaire est assimilée à l'évaluation de l'intégrité membranaire, propriété indispensable à la survie cellulaire. Lorsque cette intégrité est compromise, la membrane devient perméable à l'iodure de propidium (IP), un intercalant qui se complexe avec les acides nucléiques (Nocker *et al.* 2006). Si le marqueur est intercalé entre les brins d'ADN et d'ARN, cela provoque une fluorescence rouge après excitation à 488 nm (Figure I.1.29). Les bactéries marquées à l'IP sont donc considérées comme « mortes ». En revanche, dans le cas de cellules dont la membrane est intègre, l'IP ne peut pas pénétrer et aucune fluorescence n'est détectée.

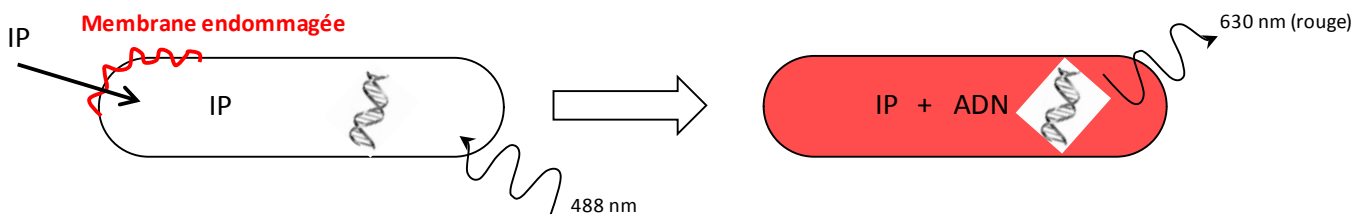


Figure I.1.29 : Mode de fonctionnement du marqueur iodure de propidium (IP)

1.4.2.3.2 Mesure de l'activité estérasique : une estimation de la viabilité cellulaire

La mesure d'activités enzymatiques au sein de la cellule constitue un indicateur de viabilité reconnu par la communauté. En effet, celle-ci permet d'étudier la capacité d'une cellule à synthétiser des enzymes et à les maintenir sous leur forme active. L'activité estérasique, présente dans toutes les cellules, est ainsi largement utilisée pour caractériser l'activité enzymatique cellulaire globale, grâce à l'utilisation de fluorochromes tels que les dérivés du diacétate de fluorescéine (FDA) ou du diacétate de carboxyfluorescéine (cFDA) (Breeuwer and Abee 2000). Les estérases sont des enzymes présentes en très grand nombre dans les cellules et qui jouent de nombreux rôles au niveau métabolique. Si elles sont actives, on considère que les cellules ont une activité métabolique, et donc qu'elles sont « viables ». L'un des ces fluorochromes, la carboxyfluorescéine diacétate (cFDA), est un précurseur non fluorescent qui diffuse passivement à travers la membrane cellulaire. Si les estérases de la cellule sont actives, elles vont hydrolyser le cFDA qui va alors se cliver et former de la carboxyfluorescéine (cF). Après une excitation à 488 nm, ce composé fluoresce dans le vert, et est détecté à une longueur d'onde de 530 nm. Dans le cas contraire, si l'activité estérasique des cellules est nulle, sous-entendant une absence d'activité métabolique basale, le cFDA n'est pas clivé et aucune fluorescence n'est détectée : les bactéries sont alors considérées comme « non viables ». Ce marquage est donc basé sur la présomption que seules les cellules ayant une membrane intacte et une activité estérasique sont capables d'internaliser et de retenir ce fluorochrome (Breeuwer et Abee, 2000).

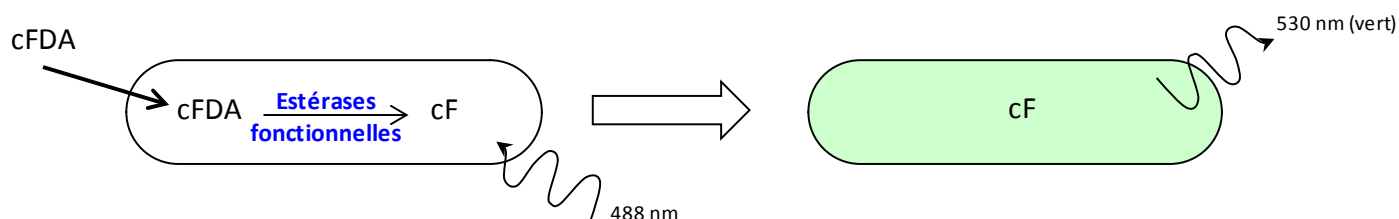
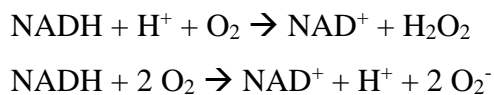


Figure I.1.30 : Mode de fonctionnement du marqueur carboxyfluorescéine diacétate (cFDA)

1.4.2.3.3 Estimation du stress oxydatif : détection de l'anion superoxyde OH^\bullet

Les bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs peuvent leur être néfastes. L'apparition d'un stress de type oxydatif est ainsi régulièrement impliquée dans la perte de viabilité des micro-organismes, en particulier anaérobies. Celui-ci est dû à l'apparition de formes réactives de l'oxygène (ROS), dont les principales sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^\bullet), et le radical hydroxyle (OH^\bullet). Comprenant un ou plusieurs électrons non appariés, ces ROS ont un potentiel d'oxydation capable de perturber la

physiologie cellulaire et de générer une toxicité. Le système le plus efficace d'élimination des ROS est l'activation d'enzymes, comme la catalase dans le cas du H_2O_2 , mais dont les bactéries lactiques sont déficientes. Elles possèdent en revanche une peroxydase, moins efficace que la catalase (Doleyres 2003). Chez *L. reuteri*, la présence d'une NADH oxydase pourrait provoquer l'apparition de ROS par les réactions suivantes (van Niel *et al.* 2002) :



Parmi les différentes méthodes utilisées pour détecter les ROS, l'utilisation de marqueurs fluorescents présente l'intérêt d'être simple de mise en œuvre et rapide. Le principe de ces marqueurs repose sur le fait qu'ils contiennent un groupement « dihydro » pouvant être oxydé par les espèces réactives de l'oxygène, pour libérer ensuite *in vivo* une molécule fluorescente détectable. Plusieurs marqueurs sont utilisés pour détecter les ROS. Il s'agit de l'hydroéthidine (HE ou dihydroéthidium, DHE) pour la détection des anions superoxydes ou de la dichlorodihydrofluorescéine (H_2DcFDA) pour la détection de l' H_2O_2 intracellulaire (Gomes *et al.* 2005). Ce marqueur, dérivé de la fluorescéine, pénètre facilement dans la cellule où il est désacétylé par les estérases pour former de la dichlorodihydrofluorescéine (H_2DcF). Celle-ci est oxydée en présence des peroxydases par l' H_2O_2 généré par le stress oxydatif. Le résultat de cette oxydation donne de la dichlorofluorescéine (DCF), qui fluoresce en vert ($\lambda = 525$ nm) après excitation à 488 nm (Figure I.1.31). Dans le cas du DHE, celui-ci est clivé en présence d' O_2^- pour former le cation éthidium (E^+) fluorescent dans le rouge après excitation à 488 nm. Ces différents marqueurs permettent donc la détection des cellules stressées oxydativement, c'est-à-dire présentant une forte quantité de ROS intracellulaire sous la forme d' H_2O_2 ou d' O_2^- .

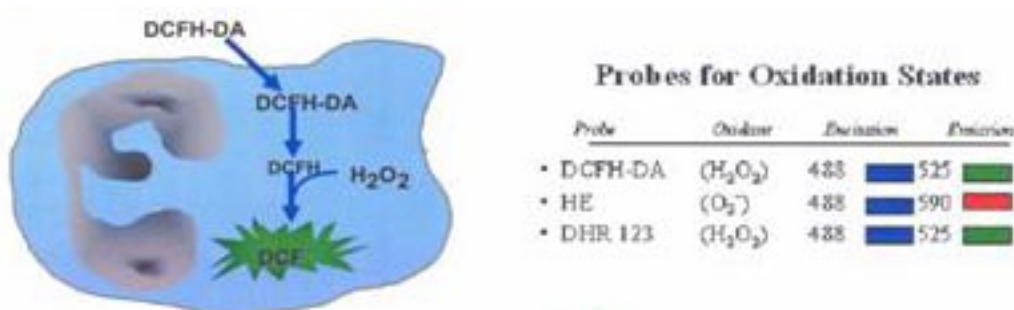


Figure I.1.31 : Mode de fonctionnement du marqueur dichlorodihydrofluorescéine (H_2DcFDA), ici noté DCFH-DA et exemples de marqueurs utilisés pour la détection des différents ROS existant.

Ces méthodes ont été appliquées avec succès à la détection de la formation de différents ROS chez des bactéries lactiques : H₂O₂ (*Lactobacillus bulgaricus*, Rault 2009) et O₂⁻ (*Lactococcus lactis*, Velly 2014).

1.4.2.3.4 Estimation du pH intracellulaire

Les bactéries lactiques, en conditions optimales, maintiennent leur pH intracellulaire (pHi) à une valeur toujours supérieure au pH extracellulaire (pHe), afin de se protéger de l'acidification qui leur est défavorable. Ce gradient de pH ($\Delta\text{pH} = \text{pHi} - \text{pHe}$), ainsi que leur potentiel de membrane ($\Delta\psi$), constituent, de plus, une force proton motrice (fpm) nécessaire à différents mécanismes nécessitant de l'énergie, tels que l'incorporation des acides aminés et des sucres, la synthèse d'ATP ou l'excrétion de certaines molécules (Breeuwer and Abee, 2000). Chez les bactéries lactiques, une corrélation entre la diminution du pHi et la perte de viabilité a notamment déjà été rapportée (Rechinger et Siegumfeldt, 2002). La mesure du pHi est donc intéressante pour la détection d'un éventuel stress cellulaire.

Les principales sondes fluorescentes pH-dépendantes permettant de mesurer le pHi chez les micro-organismes sont des dérivés de la fluorescéine (F), de la carboxyfluorescéine (cF) ou encore du 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCEF) (Breeuwer et Abee, 2004) (Tableau I.1.9). Incorporés dans le cytoplasme, les précurseurs non fluorescents de ces molécules sont hydrolysés par les estérases intracellulaires, ce qui libère les fluorochromes dont la fluorescence est pH-dépendante. La quantification de la fluorescence conduit à une évaluation du pH intracellulaire. La carboxyfluorescéine succinimidyl ester (cF-SE) est une sonde fluorescente dérivée du cF, qui agit selon le même principe. Son précurseur non fluorescent, facilement incorporé dans les cellules, est le cFDA-SE. Ce marqueur fluorescent a été utilisé avec succès pour déterminer le pH intracellulaire de nombreux micro-organismes (Tableau I.1.9, Rault 2009).

Tableau I.1.9 : Marqueurs permettant l'estimation du pHi et micro-organismes testés (Rault 2009).

Marqueurs fluorescents	$\lambda\text{EX}_{\text{max}} / \lambda\text{EM}_{\text{max}}$ (nm)	Microorganismes testés
cFDA-SE C ₂₉ H ₁₉ NO ₁₁ carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester	492 / 517	<i>B. longum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. brevis</i> , <i>Pediococcus inopinatus</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>St. thermophilus</i> , <i>Lc. lactis</i> <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Listeria innocua</i> <i>Rhodothorula glutinis</i>
cDcFDA-SE C ₂₉ H ₁₇ Cl ₂ NO ₁₁ 5-(and -6)-carboxy-2',7' dichlorofluorescein diacetate succinimidyl ester	492 / 517	<i>Lc. lactis</i> , <i>Listeria innocua</i>
GFP ratiométrique Green fluorescent protein	410 / 517	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>E. coli</i>

Résumé de la première partie :

L'acide 3-hydroxypropionique, isomère de l'acide lactique, constitue un synthon d'intérêt. En effet, la présence d'un groupement carboxyle et d'un groupement 3-hydroxyle lui confère une forte réactivité chimique, permettant la synthèse de matériaux polymères (poly-hydroxypropanoates) et de nombreux dérivés chimiques (acide acrylique, acrylamide, polyacrylates). Le 3-HP bio-sourcé fait également partie de la liste des 10 synthons ciblés par le Department Of Energy américain et les opportunités de croissance du marché sont significatives.

Étant donné les problèmes, notamment environnementaux, posés par la synthèse de 3-HP par voie chimique, la production par voie biotechnologique constitue une option intéressante dans un contexte de développement durable. Parmi les micro-organismes identifiés comme producteurs de 3-HP, les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* ont montré les résultats les plus intéressants avec le glycérol comme substrat de départ, même si les titres et rendements obtenus sont encore faibles. Des micro-organismes génétiquement modifiés (*E. coli* et *K. pneumoniae* principalement, *S. cerevisiae* plus récemment) ont également été développés pour tenter d'optimiser cette production par voie biotechnologique, mais leur utilisation pose des problèmes (hôte pathogène, incapacité à synthétiser des coenzymes nécessaires au fonctionnement des enzymes de la voie de biosynthèse...).

L. reuteri n'étant pas capable de croître sur glycérol, un procédé séquentiel a été décrit : (i) production de biomasse par fermentation de sucres ; (ii) production de 3-HP par bioconversion du glycérol, permettant de s'affranchir de la présence de co-produits excrétés lors de la croissance. Cependant, plusieurs verrous restent à lever, en lien avec l'activité antimicrobienne du 3-HP et du 3-HPA sur les bactéries productrices et avec le rendement de conversion insuffisant (présence de co-produits, problème de régénération des cofacteurs d'oxydoréduction et de la vitamine B12). L'intégration du procédé de production à un procédé de séparation (démarche d'*In Situ Product Recovery*) constitue une approche intéressante pour lever une partie des inhibitions provoquées par les molécules synthétisées, et récupérer le 3-HP en continu dans le milieu de bioconversion.

2 – Extraction sélective *in situ* des acides organiques en milieu aqueux

Le choix du principe d'extraction du 3-HP repose sur la connaissance des propriétés de cette molécule, dans son environnement aqueux. Le tableau I.1.1 présenté précédemment montre que celle-ci est de nature polaire, non volatile et de faible masse molaire. Son appartenance à la famille des acides organiques va orienter le choix du procédé de récupération, notamment par analogie avec les procédés décrits dans la littérature pour son isomère de position, l'acide lactique (2-HP). Ce choix doit également prendre en compte la présence éventuelle d'autres molécules dans le milieu. Dans le cas du 3-HP, le procédé doit donc être sélectif pour l'acide par rapport au glycérol, au 3-HPA et au 1,3-PDO.

2.1 Extraction *in situ* de molécules d'intérêt

2.1.1 Impact de l'ISPR

Le développement d'une technologie ISPR au sein d'un bioprocédé n'a de sens que si le produit d'intérêt est inhibiteur et/ou instable. Dans ces deux cas de figure, l'ISPR peut conduire à une amélioration des performances en termes de titre final, de productivité et de rendement (Tableau I.2.1). En fonction des propriétés physico-chimiques de la molécule à extraire, les technologies les plus adaptées varient. De même, la configuration dans laquelle est réalisée l'ISPR est un paramètre important à prendre en compte.

Tableau I.2.1 : Bénéfices et impacts potentiels de l'ISPR en mode batch (d'après Lye and Woodley 1999)

Avantages	Conséquences dans la mise en œuvre
Augmentation du titre en produit	Réduction du volume du réacteur Extraction facilitée
Augmentation du rendement sur substrat	Réduction du coût en substrat
Augmentation du rendement sur biocatalyseur	Réduction du coût en biocatalyseur
Augmentation de la productivité	Réduction du volume du réacteur Diminution du temps de process

Les avantages liés à la mise en œuvre de d'approches de type ISPR dans le cas de l'extraction de composés toxiques produits en cours de fermentation ont notamment été soulignés dans de nombreuses études. Une augmentation de la productivité volumétrique (x 2,5) et du titre final en produit (x 4) a ainsi été rapportée dans le cas de la fermentation alcoolique (Christen *et al.* 1990). Une augmentation du rendement et de la concentration finale en acide lactique a également été mentionnée dans le cas de l'acide lactique produit par fermentation extractive, en comparaison aux techniques conventionnelles de fermentation (Xavier *et al.* 1995). L'effet de la détoxification du milieu par récupération de molécules toxiques à l'aide de membranes d'ultrafiltration a

également été démontré dans le cas de la production d'acide propionique (productivité volumétrique multipliée par 8 en fed-batch, Boyaval *et al.* 1994).

2.1.2 Choix de la technique d'ISPR en fonction de la molécule à extraire

Les procédés ISPR sont classés en différentes catégories, en fonction des produits extraits et de leurs applications. Le choix de la technique est donc basé sur les caractéristiques physico-chimiques de la molécule d'intérêt mais aussi sur la configuration potentielle de l'ensemble du procédé unitaire. Il convient également de s'intéresser aux contraintes économiques, environnementales et aux limitations légales, la technique développée devant être viable sur le plan économique et compétitive par rapport aux techniques existant déjà.

Dans leur revue, Stark et von Stockar (2003) ont classé les différentes techniques d'ISPR (évaporation, extraction, perméation, méthodes chromatographiques) en fonction des produits d'intérêt à extraire. Pour cela, ils se basent essentiellement sur les travaux de Freeman (Freeman *et al.* 1993), qui propose cinq propriétés principales pour décider de la technique ISPR à adopter. Ainsi, le caractère volatil, l'hydrophobicité, la taille, la charge (positive, négative ou neutre) et les propriétés spécifiques de liaison et interactions propres à chacune des molécules à extraire permettent de les classer en fonction de la technique d'ISPR appropriée. Du fait de la grande diversité des techniques d'ISPR existantes, de nombreux produits et molécules sont compatibles avec une extraction *in situ*. Bien souvent, plusieurs méthodes successives seront nécessaires à la réussite de l'extraction. De même, dans la plupart des cas, il existe toute une variété de techniques pour extraire une molécule donnée. Un arbre de décision concernant la technique à adopter en fonction de la volatilité et de la charge a ainsi été proposé pour l'extraction d'acides organiques (Figure I.2.1, van Hecke *et al.* 2014).

Dans le cas des acides organiques, les techniques ISPR les plus employées sont l'électrodialyse et l'échange d'ions, du fait que la plupart des fermentations sont conduites à un pH supérieur au pKa. Les acides sont donc obtenus sous forme chargée, condition requise pour leur extraction. Dans le cas des fermentations à faible pH, l'adsorption et l'extraction constituent les techniques les plus appropriées. Cependant, le choix de la technique à utiliser dépend non seulement des caractéristiques physico-chimiques de la molécule cible mais également des conditions environnementales (concentration de l'acide dans le milieu, présence d'autres molécules, conductivité...).

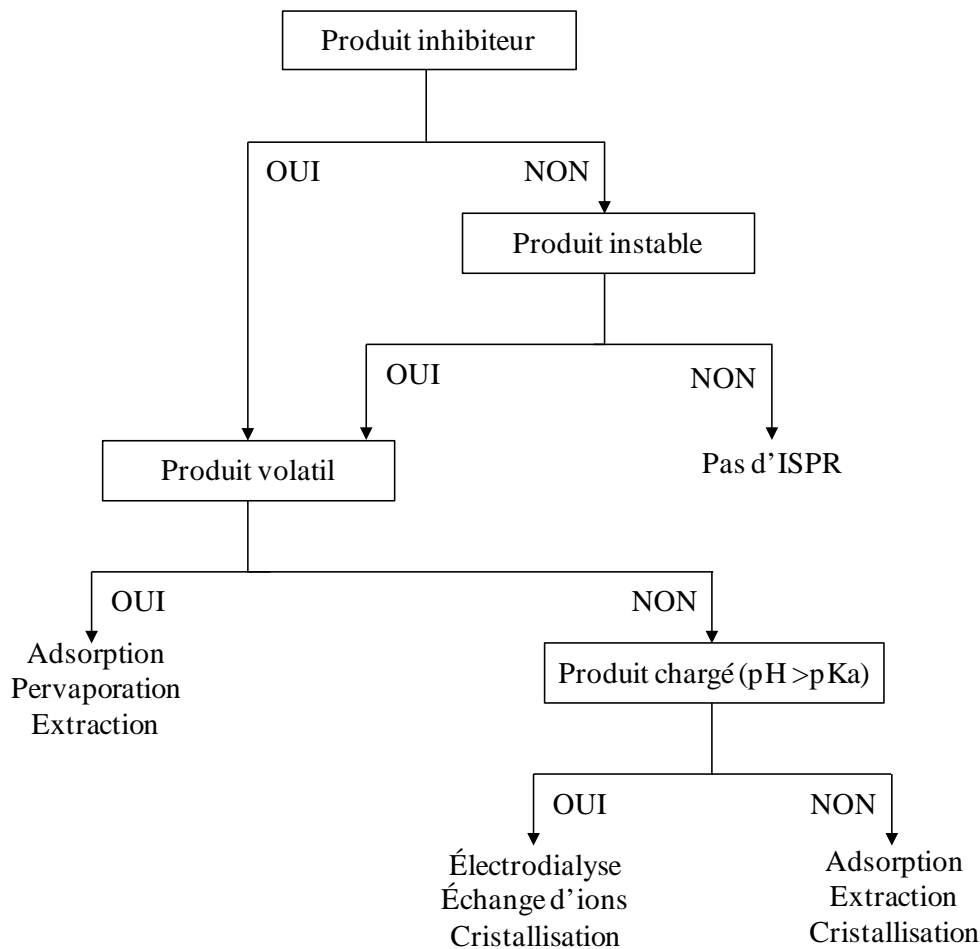


Figure I.2.1 : Arbre de décision pour la sélection de la technique ISPR à adopter en fonction de la volatilité et de la charge de l'acide (d'après van Hecke *et al.* 2014).

Stark et von Stockar ont ainsi étudié l'utilisation des différentes technologies ISPR entre 1979 et 1999. Durant cette période, plus d'un tiers des applications concerne la production de solvants organiques tels que l'éthanol (70 % de ces solvants), le butanol, le propanol ou l'acétone. La deuxième catégorie des produits impliqués dans des procédés ISPR sont les acides organiques, et en particulier les acides lactique (55 % des acides organiques), acétique, propionique et butyrique. Les autres applications liées à l'utilisation de cette technologie sont relatives à la production d'arômes, de métabolites secondaires et d'enzymes variés (Stark and von Stockar, 2003). Une étude récente a également recensé entre 2003 et 2014 les différents travaux (environ 140 articles) publiés concernant des couplages entre fermentations et technologies ISPR (van Hecke *et al.* 2014). La contribution de chaque catégorie de produits dans ces études est synthétisée dans la figure I.2.2. Sur cette période, environ 32 % des travaux concernent la production d'alcools et de solvants, 21 % celle d'acides organiques et 46 % celle d'arômes, parfums et autres produits.

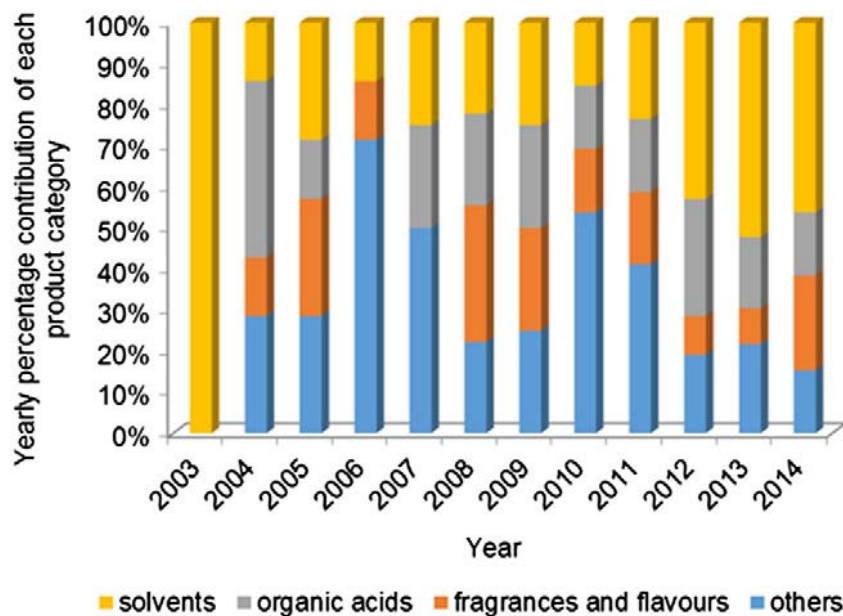


Figure I.2.2 : Contribution totale de chaque catégorie de produit extrait par ISPR entre 2003 et 2014 (van Hecke *et al.* 2014)

Dans un panorama récent des produits et technologies de rupture dans les biotechnologies industrielles à l’horizon 2021 (Ferreira, 2011), les prédictions concernant la prochaine décennie font état d’une forte croissance dans la production d’acides organiques comme les acides lactique, acétique, succinique et acrylique. Dès lors, on peut supposer que le marché du 3-HP, directement lié à celui de l’acide acrylique (production estimée à 4,5 millions de tonnes en 2015, Ferreira, 2011) est amené à évoluer selon des trajectoires similaires. Une étude récente (Choi *et al.* 2015) prévoit même une production annuelle de 3-HP de 8 millions de tonnes à l’horizon 2020. La problématique de la production et de l’extraction couplée de cette molécule plate-forme devient donc une voie intéressante à explorer. Les technologies d’ISPR constitueraient alors une réponse adaptée, tant du point de vue de la faisabilité technique que du contexte applicatif.

2.1.3 Configurations possibles de l’ISPR

Le succès d’un procédé ISPR ne dépend pas uniquement du choix de la technique de séparation mais aussi et surtout de la configuration entre bioréacteur, unité de séparation et mode opératoire (culture en batch, fed-batch ou en continu). Plusieurs études et revues ont étudié l’impact de ces différents paramètres sur l’extraction (Lye and Woodley 1999, van Hecke *et al.* 2014). Il existe deux approches pour récupérer un produit dans un milieu de fermentation : le « end-of-pipe » et le « slip-stream » (Vane 2008). Dans le cas de l’approche « end-of-pipe » l’étape de séparation s’effectue en aval de l’étape de production de la molécule d’intérêt. C’est

notamment le cas lors de la production d'éthanol. A l'inverse dans le cas de l'approche « slip-stream », le milieu de fermentation ne quitte pas le bioréacteur ou y revient après une boucle d'extraction, puisque la séparation est réalisée de manière concomitante à la fermentation. Cette approche est également connue sous le nom de fermentation extractive et est très souvent utilisée dans le cas de la production d'acides organiques, notamment en raison de l'inhibition provoquée par ceux-ci. On distingue d'ailleurs deux types de fermentation extractive : *in situ* (à l'intérieur du bioréacteur) et *ex situ* lorsque le milieu circule en boucle dans une unité de séparation externe.

La figure I.2.3 représente les différentes configurations possibles d'ISPR à partir de deux principaux critères : extraction interne ou externe, contact direct ou indirect. Ainsi, un contact direct (Configurations 1 et 3) entre les bactéries et un solvant organique peut conduire à un effet inhibiteur et toxique sur les cellules (Wasewar *et al.* 2004). De plus, la stabilité du procédé est réduite en cas de contact direct avec la phase de séparation. La position de l'unité de séparation par rapport au bioréacteur impacte également l'efficacité du procédé, la séparation pouvant s'effectuer directement dans le fermenteur (Configurations 1 et 2) ou au moyen d'un passage par une boucle externe (Configurations 3 et 4). Pour réduire la toxicité de la phase de séparation à l'intérieur du réacteur, un contact indirect peut être réalisé par utilisation d'une membrane interne (Configuration 2b), ou par immobilisation des cellules sur une matrice (Configuration 2a). Ces deux méthodes sont également utilisées pour obtenir un contact indirect lors d'une extraction en externe (Configurations 4a et 4b). Les études focalisées sur l'extraction d'acides organiques produits par fermentation ont ainsi montré que l'ensemble de ces configurations avaient été utilisées de façon équitable entre 2003 et 2014 (Annexe 3).

Yabannavar et Wang (1991a) ont testé la configuration 4b pour étudier l'extraction réactive de l'acide lactique, et ont immobilisé les cellules afin de réduire la toxicité liée à un contact direct. Harrington et Hossain (2008), ont eux testé la configuration 4a, en employant une membrane poreuse à fibres creuses pour l'extraction de l'acide lactique. Il se révèle donc souvent nécessaire de réduire les interactions entre micro-organismes et phase extractante. Cependant, les membranes sont susceptibles de s'encrasser, et l'immobilisation n'est pas toujours assez efficace. Il peut donc s'avérer nécessaire d'ajouter une étape de clarification, située en amont de l'unité de séparation (Configuration 4c). Il est également important de préciser que l'ensemble de ces configurations peuvent être réalisées tant en batch qu'en fed-batch ou culture en continu. La capacité à combiner à la fois la fermentation et l'extraction dans un procédé continu constitue l'un des avantages majeurs de l'ISPR en termes de productivité.

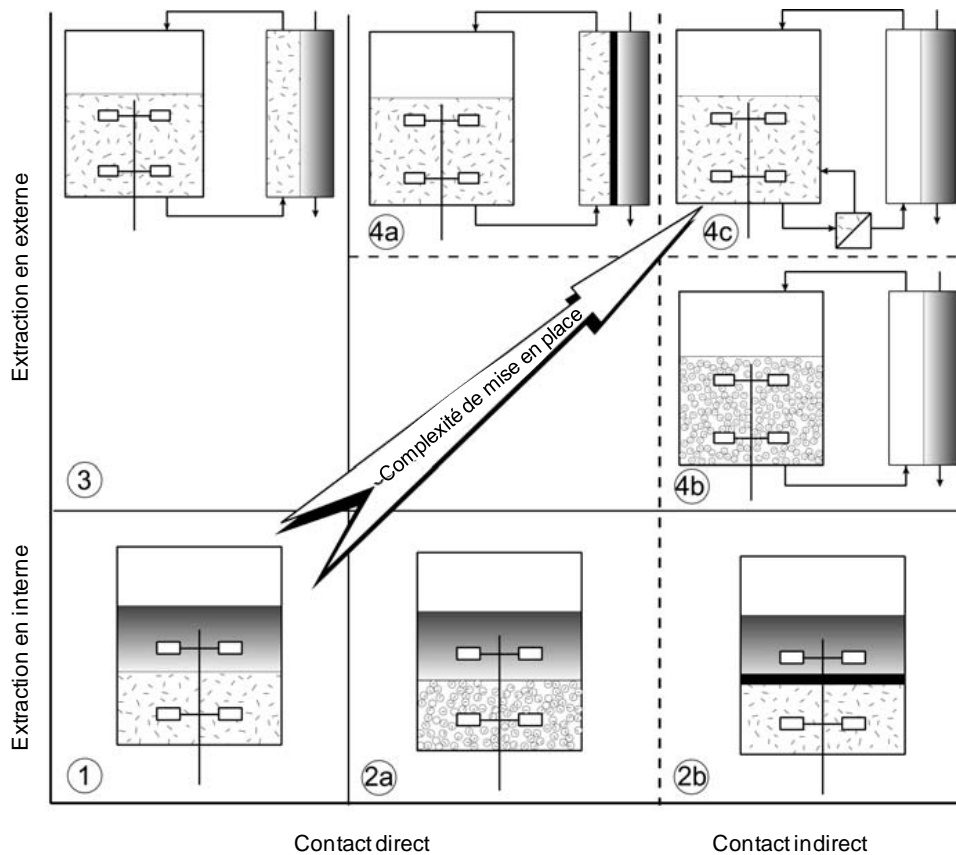


Figure I.2.3 : Configurations possibles en ISPR (Stark and von Stockar, 2003)

Concernant la période 2003-2014, une grande majorité des études concerne une configuration en interne avec contact direct, contre seulement 35 % en externe (Figure I.2.4, van Hecke *et al.* 2014).

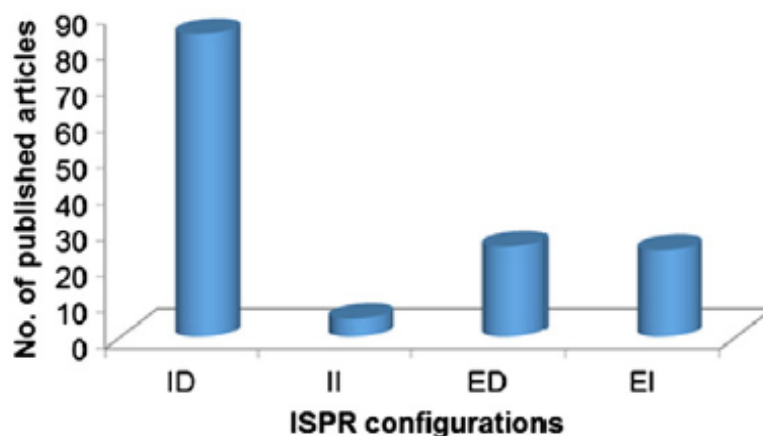


Figure I.2.4 : Nombre d'articles répertoriés dans la littérature entre 2003 et 2014 en fonction de la configuration ISPR adoptée (ID – interne direct, II – interne indirect, ED – externe direct, EI – externe indirect) (van Hecke *et al.* 2014)

2.2 Procédés de séparation pour la récupération des acides carboxyliques

2.2.1 Précipitation aux sels de calcium

Environ 90 % de l'acide lactique produit à l'échelle industrielle l'est par fermentation (Joglekar *et al.* 2006, Choi *et al.* 2015). Cependant, le procédé classique d'extraction de l'acide lactique à partir du milieu de fermentation présente certains inconvénients. Celui-ci est basé sur la précipitation de l'acide sous forme de sel de calcium lors de l'addition de carbonate de calcium (CaCO_3) ou d'hydroxyde de calcium (Ca(OH)_2) dans le milieu. Après filtration, le solide est récupéré et réacidifié à l'acide sulfurique (H_2SO_4). Si ce procédé permet bien l'extraction de l'acide lactique, il est générateur d'une quantité semblable de déchets sous forme de sulfate de calcium et pose un problème environnemental (Kertes and King 1986, Hong *et al.* 2001). De plus, l'acide lactique obtenu par cette technologie n'est pas pur (impuretés colorées, sucres, autres acides organiques...) qui vont nécessiter de nouvelles étapes de purification représentant un coût important (Joglekar *et al.* 2006).

2.2.2 Distillation extractive

Il est possible d'obtenir de l'acide lactique d'une grande pureté par estérification de l'acide lactique brut avec des alcools, suivie d'une distillation de l'ester obtenu et hydrolyse de l'ester de lactate distillé pour former l'alcool correspondant et de l'acide lactique (Cockrem and Johnson 1993). L'estérification constitue le seul procédé permettant de séparer l'acide lactique d'autres acides organiques (Joglekar *et al.* 2006). Le procédé comprenant la distillation réalisée de manière simultanée avec l'estérification de l'acide et l'hydrolyse de l'ester après distillation est appelé distillation extractive (Kim *et al.* 2000, Sun *et al.* 2006). Cependant, ce type de séparation nécessite de prétraiter le milieu de fermentation de manière à éliminer les nombreuses impuretés présentes en solution (résidus de sucre, pigments...), principalement par des techniques membranaires (microfiltration, ultrafiltration, osmose inverse...).

2.2.3 Chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions met en œuvre un support solide chargé sur lequel l'acide organique s'adsorbe par affinité. Les acides sous forme dissociée sont ainsi transférés de manière sélective depuis la phase liquide jusqu'à la surface de particules solides et insolubles en suspension dans une colonne. Ces techniques ont notamment été utilisées avec succès pour l'extraction de différents acides organiques en milieux complexes (acide succinique, Zeikus *et al.* 1999, acide acétique, Chandel *et al.* 2007).

L'utilisation de résines poreuses échangeuses d'anion pour l'extraction de l'acide lactique a déjà montré son efficacité dans différentes études (Hong *et al.* 2001, Joglekar *et al.* 2006). L'efficacité de l'échange dépend de deux paramètres : la concentration des ions en solution et l'affinité de ces ions pour la phase non soluble (Alexandratos 2009). Étant donné que la fermentation lactique se déroule le plus souvent à un pH 5-6, supérieur au pK_a de l'acide lactique (3,86), une des stratégies d'extraction couramment employée est l'utilisation de résines échangeuses d'anions (Joglekar *et al.* 2006). Dans les faits, parmi toutes les résines testées, les résines échangeuses d'anions Amberlite IRA-400 et IRA-92 sont celles qui ont montré les résultats les plus encourageants au regard d'une utilisation à l'échelle industrielle. Celles-ci présentent en effet une forte capacité d'adsorption pour l'acide lactique, sont utilisables sur une large gamme de pH (0 à 14, Mustafa *et al.* 2010), possèdent une durée de vie importante, sont facilement régénérables et peuvent être couplées à la fermentation (Joglekar *et al.* 2006). Cette approche est donc cohérente avec une démarche d'ISPR mais présente cependant certains inconvénients. En effet, ce procédé nécessite la régénération des résines par des bases fortes (NaOH ou KOH), ce qui conduit à une augmentation des coûts et de l'impact environnemental (Joglekar *et al.* 2006). De plus, dans le cas d'un milieu complexe de fermentation, d'autres acides carboxyliques peuvent être retenus sur la résine en plus de l'acide lactique, ce qui impliquera nécessairement des étapes additionnelles de purification. Il s'avère également souvent nécessaire de clarifier le milieu, ses constituants pouvant encrasser les résines

2.2.4 Électrodialyse

L'électrodialyse est un procédé de séparation utilisé pour extraire sélectivement des ions présents en solution vers une autre solution via une membrane échangeuse d'ions sur la base d'une différence de potentiel électrique. Ses principales applications sont le dessalement d'eau de mer ou de lactosérum, la purification de glycérol et l'extraction d'acides organiques produits par fermentation tels que l'acide lactique (Kim and Moon 2001, Habova *et al.* 2004), l'acide acétique (Wang *et al.* 2011a), l'acide citrique (Wang *et al.* 2011a), l'acide gluconique (Wang *et al.* 2011b) et l'acide succinique (Groot 2011).

L'électrodialyse constitue une technique membranaire longtemps considérée comme prometteuse dans le cadre d'un procédé de type ISPR pour l'extraction de l'acide lactique du milieu de fermentation. Cette dernière peut être intégrée à un procédé continu et est compatible avec les pH du milieu de fermentation (Joglekar *et al.* 2006). La littérature décrit l'extraction de l'acide lactique par un processus en deux étapes distinctes. Au cours de la première étape, les sels

de lactate issus du milieu de fermentation sont purifiés et concentrés par des procédés traditionnels d'électrodialyse. Dans un deuxième temps, ces sels sont convertis en acide lactique par décomposition de l'eau ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$). Cependant, afin de ne pas encrasser les membranes (présence de cellules ou de pigments pouvant être adsorbés sur les membranes et diminuer leur efficacité), un prétraitement du milieu de fermentation préalable à l'électrodialyse est nécessaire (microfiltration, ultrafiltration, osmose inverse). Cette technique est également très coûteuse d'un point de vue énergétique (Habova *et al.* 2004) et nécessite une conductivité électrique importante et donc une forte concentration en acides dans le milieu (plusieurs dizaines de g.L^{-1}), ce qui n'est pas compatible avec les performances attendues dans le cas de la production de 3-HP par *L. reuteri*.

2.2.5 Extraction liquide/liquide réactive

L'extraction liquide-liquide, également appelée extraction par solvant, constitue également un procédé de séparation conventionnel, dans lequel un ou plusieurs solvants sont utilisés pour extraire un composé d'intérêt d'une phase liquide vers la phase contenant le solvant. Cette technique est notamment utilisée pour l'extraction ciblée d'acides organiques présents dans des milieux de fermentation (acides malique, lactique et succinique, Oliveira *et al.* 2012). Cependant, les acides organiques étant peu ou pas solubles dans des solvants organiques, des extractants sont souvent ajoutés afin de favoriser l'extraction (Wasewar *et al.* 2004).

L'acide lactique étant peu soluble en phase organique ($\text{Log } K_{o/w} = -0,65$), un procédé d'extraction réactive liquide-liquide a ainsi été proposé et étudié. Cette technique est basée sur la capacité d'une molécule extractante présente dans la phase organique à former de façon sélective un complexe avec la molécule cible, ce qui conduit à son transfert dans la phase organique. Une fois extrait en phase organique, le complexe doit subir une dissociation afin de récupérer la molécule cible. La phase extractante sera ainsi régénérée et réutilisée pour de nouvelles extractions (Hong *et al.* 2001). Cette technique peut être utilisée en circuit fermé, ce qui constitue un avantage dans une démarche de procédé de type ISPR (Wasewar *et al.* 2004). Cependant, la plupart des extractants sont efficaces à faibles pH, à l'inverse des micro-organismes utilisés pour les fermentations (pH 6-7). De plus, la formation d'émulsions stables entre les deux phases a également été mentionnée (Bar, 1988). Enfin, en raison de leur viscosité importante et de leur forte toxicité, la solvatation des extractants dans un diluant est souvent nécessaire. La qualité de l'extraction est alors dépendante du couple extractant / diluant.

Pour pallier ces problèmes, l'utilisation de contacteurs à membranes poreuses apparaît comme une solution d'intérêt, de par la possibilité de stabiliser l'interface entre phase aqueuse et solvant organique et donc d'éviter la formation d'émulsions (Tong *et al.* 1999). Les cellules sont également protégées d'un contact direct avec la phase extractante, du fait d'une taille de pore inférieure à la taille des micro-organismes au niveau du contacteur. Une clarification du milieu de fermentation n'est plus nécessaire. Grâce à l'utilisation de modules à fibres creuses, une surface d'échange spécifique élevée est offerte, augmentant ainsi l'efficacité de l'extraction (Huang *et al.* 2004, Harrington and Hossain 2008). Enfin, l'intégration dans un procédé continu est facilitée du fait de la flexibilité de cette technique. Les principes de l'extraction réactive et de l'extraction réactive assistée par contacteur à membrane (ERCM) seront traités de manière plus détaillée dans la partie 2.3 de ce chapitre.

Concernant les acides organiques produits par fermentation (en mode batch, fed-batch ou continu) et extraits entre 2003 et 2014 (Annexe 3), ils sont le plus souvent récupérés par électrodialyse et chromatographie d'échanges d'ions, même si l'extraction liquide-liquide ou la cristallisation ont également été utilisées. Les fortes concentrations en acides obtenues peuvent ainsi expliquer l'utilisation récurrente de l'électrodialyse, du fait d'une conductivité électrique suffisante. Pendant cette période, même si l'extraction de nombreux acides a été étudiée, les travaux concernant l'acide lactique sont majoritaires. Pour conclure, le tableau I.2.2 récapitule les différentes techniques compatibles à une approche de type ISPR pour la récupération d'acides organiques en milieu aqueux, en se restreignant à l'exemple de l'acide lactique, isomère de position du 3-HP.

Tableau I.2.2 : Comparaison des différentes techniques d'extraction des acides carboxyliques trouvées dans la littérature à travers l'exemple de l'acide lactique

Types de procédés d'extraction	Principe de séparation	Avantages	Inconvénients	Sources
Précipitation aux sels de calcium	Précipitation aux sels de calcium avec Ca(OH)_2 ou CaCO_3 puis réacidification avec H_2SO_4	+ Procédé simple et efficace	- Génération importante de déchets (sulfate de calcium) - Étape de séparation nécessaire en aval	Hong <i>et al.</i> (2001) Wasewar <i>et al.</i> (2004)
Distillation extractive	- Estérification de l'acide - Distillation et hydrolyse de l'ester	+ Procédé bien connu + Procédé efficace + Produit obtenu très pur + Séparation de l'acide lactique des autres acides	- Formation d'esters, dimères et polymères - Couteux en énergie (évaporation de l'eau) - Peu de flexibilité	Cockrem and Johnson (1993) Kim <i>et al.</i> (2000) Wasewar <i>et al.</i> (2004) Joglekar <i>et al.</i> (2006) Sun <i>et al.</i> (2006)
Adsorption / Échange d'ions	Utilisation d'une résine échangeuse d'anions pour capter l'acide	+ Favorable à des pH importants + Procédé sûr et efficace + Durée de vie importante + Utilisable à grande échelle	- Peu adapté à des conditions de fermentations (pH entre 5 et 7) - Régénération de la résine - Flux de déchet important - Peu spécifique	Hong <i>et al.</i> (2001) Wasewar <i>et al.</i> (2004) Joglekar <i>et al.</i> (2006) Alexandratos (2009) Wang <i>et al.</i> (2011)
Électrodialyse	Première étape : purification et concentration des sels de lactate issus du milieu de fermentation Seconde étape : conversion des sels en acide lactique par décomposition de l'eau	+ Séparation et concentration de l'acide de façon simultanée + Compatible avec les pH des milieux de fermentation	- Nécessite une concentration en acide importante - Couteux en énergie - Faible productivité - Nécessite un prétraitement	Kim and Moon (2001) Hong <i>et al.</i> (2001) Wasewar <i>et al.</i> (2004) Habova <i>et al.</i> (2004) Wang <i>et al.</i> (2011)
Extraction L/L réactive	Réaction entre une molécule extractante en phase organique et la molécule à extraire en phase aqueuse	+ Forte sélectivité pour l'acide + Possible à faible concentration + Peu de déchets générés + Peu coûteux + Bon rendement d'extraction + Possibilité de back-extraction et régénération de la phase organique simple + Bonne productivité	- Utilisation d'extractants toxiques et efficaces à faibles pH - Utilisation de solvants organiques - Extraction dispersive - Formation d'émulsions	Bar (1988) Tong <i>et al.</i> (1999) Hong <i>et al.</i> (2001) Wasewar <i>et al.</i> (2004)
ERCM	Extraction L/L réactive avec mise en contact par une membrane	+ Extraction non dispersive + Émulsions évitées + Toxicité diminuée + Surface spécifique d'échange très importante + Processus flexible et peu coûteux	- Possibilité d'encrassement des membranes - Difficulté de lavage et stérilisation	Tong <i>et al.</i> (1999) Hong <i>et al.</i> (2001) Wasewar <i>et al.</i> (2004) Huang <i>et al.</i> (2004) Joglekar <i>et al.</i> (2006)

2.3 Extraction liquide-liquide réactive

2.3.1 Propriétés et critères de choix des molécules extractantes

Le rôle premier d'un extractant est d'augmenter de façon sélective le coefficient de distribution (K_D) de la molécule d'intérêt (ici un acide organique, sous sa forme dissociée, A^- , ou non dissociée, HA) en faveur de la phase organique (org) par rapport à la phase aqueuse (aq) (Figure I.2.5). Ce coefficient est défini de la façon suivante :

$$K_D = \frac{[HA]_{org} + [A^-]_{org}}{[HA]_{aq} + [A^-]_{aq}} \quad (1)$$

Le choix de l'extractant pour un procédé d'extraction liquide-liquide constitue une étape cruciale pour réaliser une extraction efficace. Ce choix repose en particulier sur des considérations physico-chimiques (coefficient de distribution élevé vis-à-vis du soluté à extraire, faible solubilité ou immiscibilité avec l'eau, viscosité faible, stabilité physico-chimique, faible toxicité), tout en tenant compte des critères économiques (Wasewar *et al.* 2004).

Tableau I.2.3 : Avantages et inconvénients des différents types de molécules extractantes

Nature de l'extractant	Exemples	Type de liaison avec l'acide	Avantages	Inconvénients
C-O	cétones (MIBK) alcools (octanol, décanol...) éthers	Liaisons H	/	Extraction peu efficace
P-O	TBP (Tributylphosphate) TOPO (Trioctylphosphine oxide)	Liaisons H	Peu miscibles à l'eau Bonne capacité de solvatation	Couteux
Amines primaires	Octylamine	Liaisons ioniques	Forte affinité pour les acides carboxyliques Peu couteuses	Solubles dans l'eau
Amines secondaires	Diocylamine	Liaisons ioniques	Forte affinité pour les acides carboxyliques Peu couteuses	Formation d'amides
Amines tertiaires	Alamine 336 TOA (Triocylamine)	Liaisons ioniques	Forte affinité pour les acides carboxyliques Peu couteuses	Forte viscosité
Sels d'ammonium quaternaire	Aliquat 336	Liaisons ioniques	Forte affinité pour les acides carboxyliques Peu couteuses	Forte viscosité Régénération difficile Toxicité

Trois principaux types d'extractants sont généralement utilisés en extraction réactive :

- (i) des extractants contenant de l'oxygène lié au carbone notés C-O tels que des alcools (octanol, décanol), des cétones (Méthyl-isobutyl-cétone MIBK) ou des éthers ;
- (ii) des extractants contenant du phosphore lié au carbone notés P-O tels que le tributylphosphate (TBP) ou la trioctylphosphine oxide (TOPO) ;
- (iii) des amines aliphatiques à longues chaînes (Alamine, Triocylamine, tridecylamine) et les sels d'ammonium quaternaires (Aliquat 336) (Tableau I.2.3, Kertes and King 1986, Hong *et al.* 2001, Joglekar *et al.* 2006).

Alors que les extractants contenant de l'oxygène lié au carbone (cétones, alcools, éthers) conduisent à de faibles coefficients de distribution ($K_D < 1$) et sont donc peu efficaces pour l'extraction d'acides carboxyliques, les extractants contenant du phosphore lié au carbone (TBP et TOPO) montrent dans les mêmes conditions une meilleure capacité de solvation de l'acide (Wasewar *et al.* 2004). Ces derniers sont également moins miscibles à l'eau que les extractants de type C-O. Bien que le TOPO présente une meilleure extractibilité que le TBP, les deux sont efficaces pour l'extraction d'acides carboxyliques (Wasewar *et al.* 2004).

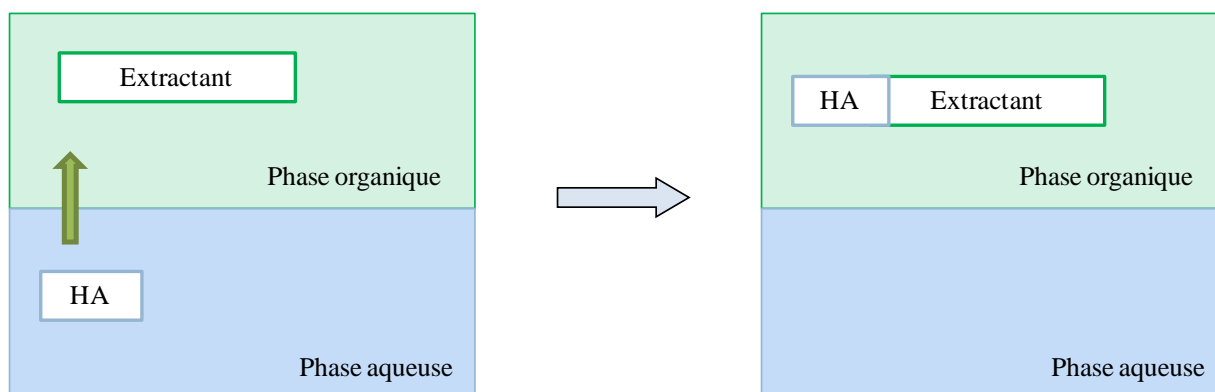
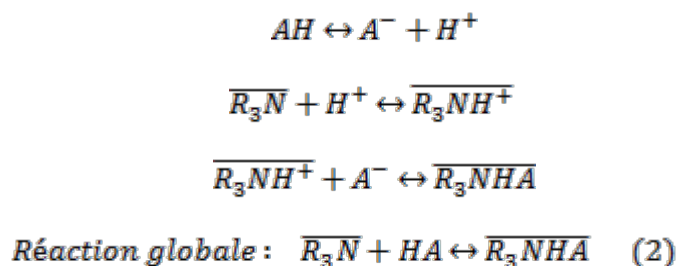


Figure I.2.5 : Principe de l'extraction liquide-liquide réactive d'un acide organique par utilisation d'un extractant dilué dans un solvant organique. L'interface séparant les deux phases est représentée schématiquement par une ligne "fictive" avec une séparation parfaite des phases

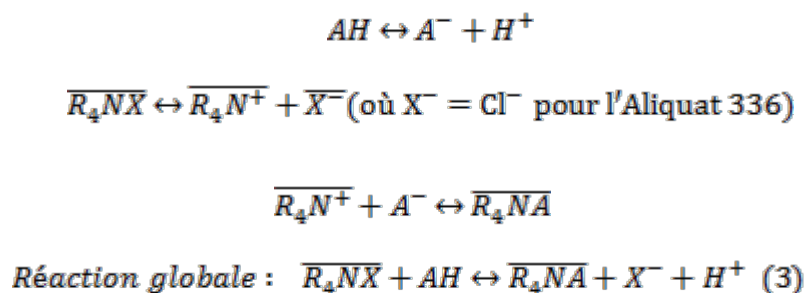
L'utilisation d'amines aliphatiques de haut poids moléculaire lors de l'extraction réactive implique la formation de liaisons ioniques fortes entre les deux molécules. Ce type d'extractant a été décrit comme légèrement plus efficace que les P-O et moindre coût constitue un avantage à leur utilisation (Wasewar *et al.* 2004). De plus, leur forte affinité pour les acides leur confère une sélectivité pour ces derniers bien supérieure à celle pour les autres composés du milieu. Les amines primaires sont trop solubles dans l'eau pour être utilisées, et les amines secondaires, bien qu'efficaces pour l'extraction, peuvent, sous certaines conditions de température, conduire à la formation d'amides avec les acides carboxyliques, risquant de provoquer la perte de l'extractant et du produit d'intérêt. Les amines tertiaires à longues chaînes carbonées, alliant une affinité élevée pour les acides organiques, due à leur forte basicité, ainsi qu'une faible solubilité dans l'eau, constituent donc les extractants les plus utilisés pour l'extraction réactive d'acides carboxyliques (Hong *et al.* 2001, Wasewar *et al.* 2004).

La réaction ayant lieu entre l'acide carboxylique (HA) et l'amine tertiaire extractante (R_3N) est assimilée à une réaction acido-basique (Hong *et al.* 2001, Tik *et al.* 2001, Wasewar *et al.* 2004). Différentes études ont montré que les amines tertiaires n'extrayaient que la forme non dissociée de l'acide (Kertes and King 1986, Tamada *et al.* 1990a et c) et n'étaient donc pas efficaces à $pH > pK_a$ (Yang *et al.* 1991). Le mécanisme réactionnel le plus souvent décrit dans la littérature est un mécanisme en deux étapes (Hong *et al.* 2001). Une réaction acido-basique a d'abord lieu entre l'acide et l'amine tertiaire. L'amine récupère ainsi le proton de l'acide pour former un ammonium quaternaire chargé positivement (Wasewar *et al.* 2004). L'amine chargée positivement peut alors former une paire d'ions avec la base conjuguée de l'acide chargée négativement. La réaction peut être représentée de la façon suivante, les espèces présentes dans la phase organique étant surmontée d'une barre.



Les ammoniums quaternaires réagissent avec la forme dissociée de l'acide par un mécanisme de type échange d'ions (anions en l'occurrence) qui dépend de la gamme de pH. Les réactions sont les suivantes :

$pH < pK_a$



pH > pKa



L'extraction réactive implique non seulement des interactions entre l'acide et la molécule extractante mais aussi entre le complexe néoformé et le diluant utilisé pour solubiliser l'amine (Tamada *et al.* 1990a et c). En particulier, lorsque les extractants utilisés sont actifs (possèdent des groupements fonctionnels), la phase d'extraction est capable de se lier à l'acide au-delà de ce qui est nécessaire à la neutralisation stœchiométrique de l'amine (Kertes and King, 1986). Bien que la nature exacte des mécanismes chimiques réactionnels ne soit pas connue, certaines données suggèrent que la liaison hydrogène spécifique formée entre le proton du diluant et le complexe acide / amine pourrait expliquer le pouvoir de solvation plus élevé de ces diluants (Tamada and King 1990). L'extraction réactive est donc un phénomène complexe influencé par divers facteurs, tels que la nature et la concentration, tant de l'acide que de la molécule extractante, le type du diluant, le pH initial de la solution aqueuse, la température. Le comportement du complexe formé à l'équilibre rend difficile la prédiction du coefficient de distribution (Tamada and King 1990). Il est donc important dans ce cas d'étudier la capacité du diluant seul à extraire la molécule d'intérêt de la phase aqueuse.

Il a également été rapporté que l'utilisation combinée d'amines tertiaires et ammoniums quaternaires conduisait à une amélioration importante de l'extraction réactive de différents acides carboxyliques (Marinova *et al.* 2004, Marinova *et al.* 2005, Keshav *et al.* 2008b) et notamment de l'acide lactique (Kyuchoukov *et al.* 2001, Yankov *et al.* 2005, Harington and Hossain 2008, Hossain and Maisuria 2008). Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer l'origine de cette synergie : complémentarité des mécanismes d'extraction des deux amines (l'amine tertiaire extrairait d'abord à pH bas, puis l'ammonium quaternaire lorsque le pH remonte suite à l'extraction de l'acide, Kyuchoukov *et al.* 2001), stabilisation par l'Aliquat 336 du complexe acide-TOA formé, augmentation de l'hydrophobicité du complexe (Sarkar *et al.* 2014) mais les mécanismes précis ne sont toujours pas connus en détails. Les paramètres opératoires tels que le pH, la concentration en acide, la composition de la phase extractante (ratio amine tertiaire/ammonium quaternaire) influent sur l'efficacité de

l'extraction en mélange synergique (Yankov *et al.* 2005, Hossain and Maisuria 2008, Harington and Hossain, 2008). Un phénomène de synergie a également été rapporté en combinant amines tertiaires et TBP dans le cas de l'acide lactique (Matsumoto *et al.* 2001, Matsumoto *et al.* 2003) et d'autres acides organiques (Keshav *et al.* 2008b).

L'Annexe 4 répertorie la liste des différents acides organiques séparés par extraction réactive. Sur les 22 acides recensés, les études portant sur l'acide lactique sont de loin les plus nombreuses, même si de nombreux travaux se focalisent également sur les acides propionique, succinique, citrique et acétique. Si les premières études remontent au début des années 1990, l'utilisation de l'extraction réactive demeure très utilisée à l'heure actuelle pour la récupération d'acides organiques, comme en témoigne le nombre important de publications parues entre 2010 et 2015 sur le sujet (29 référencées en Annexe 4).

2.3.2 Propriétés et critères de choix du diluant

Souvent, les extractant purs ne peuvent être utilisés seuls dans un procédé d'extraction liquide-liquide, du fait notamment de leur forte viscosité et de leur faible capacité d'extraction en l'absence d'un solvant organique stabilisant le complexe extractant-acide (Yang *et al.* 1991, Honda *et al.* 1995, Labbaci *et al.* 2012, Kyuchoukov and Yankov 2012).

(i) les diluants actifs : possédant un ou plusieurs groupements fonctionnels, qui jouent un rôle au niveau du transfert du soluté entre les phases en modifiant la capacité de l'extractant. Ils empêchent la formation d'une deuxième phase organique en solubilisant le produit de l'interaction extractant-soluté (Tong *et al.* 1998, Senol 2001), et permettent une bonne solubilisation, comme les alcools (Kertes and King 1986), les hydrocarbures halogénés ou encore les cétones ;

(ii) les diluants inertes : utilisés essentiellement pour diluer l'extractant mais qui n'interviennent pas au niveau chimique pour influencer l'équilibre liquide-liquide (Sabolova *et al.* 2001, Senol 2001) et qui conduisent à une moins bonne solubilisation, comme les benzènes ou les alcanes.

La stabilité d'un complexe acide-amine et sa solubilité dans la phase organique sont favorisées par l'utilisation de diluants relativement polaires. Tamada et son équipe (1990) ont ainsi classé les différentes familles de solvant en fonction de leur capacité de solubilisation du complexe acide-amine en phase organique : Alcools > Nitrobenzène > hydrocarbures

halogénés donneurs de protons > cétones > halogènes aromatiques > benzène > hydrocarbures aromatiques.

Des études ont montré que l'utilisation d'Alamine 336 (un mélange commercial d'amines tertiaires en C8 et C10), réputé comme étant l'extractant le plus efficace dans le cas de l'acide lactique dans différents diluants, conduisait à de meilleurs résultats avec le chloroforme (Wasewar *et al.* 2004). Mais dans l'optique de la mise en place d'un procédé de type ISPR, celui-ci s'avère trop toxique pour les micro-organismes producteurs. De même, l'utilisation d'éthers, hautement volatils et non biodégradables sont à éviter, même si ils montrent de bons résultats.

Plusieurs paramètres doivent être pris en compte lors du choix du diluant. Ils ne doivent pas être trop polaires ni solubles dans l'eau de manière à éviter un mélange avec la phase aqueuse et donc à l'origine de difficultés pour la régénération de la phase extractante et la récupération de l'acide (back-extraction). Des études travaillent ainsi à mélanger solvants actifs et inertes afin de diminuer cette polarité (Yankov *et al.* 2004, Yankov *et al.* 2005, Kyuchoukov *et al.* 2006). Il a de plus été montré que des concentrations en amines dans le diluant supérieures à 25 % pouvaient entraîner la formation d'émulsions à l'interface phase organique/phase aqueuse, ce qui serait préjudiciable au déroulement d'un procédé ISPR (Joglekar *et al.* 2006). Enfin, les coûts doivent également être pris en considération, de même que la toxicité des diluants étudiés, en partie liée à leur solubilité en phase aqueuse (Tableau I.2.4). Ainsi, le décanol et le dodécanol présentent une solubilité faible avec l'eau et constituent donc des candidats potentiels, à l'inverse de l'octanol notamment. Afin de diminuer encore les risques d'inhibition contre les micro-organismes producteurs, des diluants réputés biocompatibles sont utilisés pour solvater les molécules extractantes, bien que conduisant à des performances d'extraction réduites : l'alcool oléique (Yabannavar *et al.* 1987, Honda *et al.* 1995, Kahya *et al.* 2001, Hossain and Maisuria 2008, Keshav *et al.* 2008a, Kyuchoukov and Yankov 2012) et les huiles végétales comme l'huile de tournesol (Harington and Hossain 2008, Keshav *et al.* 2008b, Waghmare *et al.* 2011), l'huile de sésame (Keshav *et al.* 2012) ou l'huile de soja (Waghmare *et al.* 2013). L'emploi de liquides ioniques pour l'extraction d'acides est également rapporté dans la littérature, conduisant cependant à des problèmes de solubilisation des molécules extractantes (TOA et TOPO notamment, Matsumoto *et al.* 2004b) et des performances d'extraction mitigées à forte concentration en acide (Martak and Schlosser 2007).

L'Annexe 5 répertorie les différents coefficients de distribution et rendements d'extraction trouvés dans la littérature dans le cas de l'acide lactique et obtenus expérimentalement pour différents extractants (TOA, Alamine 336, Aliquat 336...) et diluants (octanol, décanol, alcool oléique, huile de tournesol...). Ce tableau illustre bien l'importance de la combinaison extractant-diluant, tant du point de vue du choix des molécules que de leur pourcentage d'utilisation (rendements d'extraction variant entre 5 et 95 %). De même, les faibles performances obtenues par utilisation d'extractants ou de diluants seuls confirment l'importance du rôle joué par chacune des deux espèces dans le phénomène d'extraction réactive : l'extractant pour la complexation avec l'acide et le diluant pour la solvataion du complexe formé. L'importance d'utiliser des solvants actifs (décanol, octanol) plutôt qu'inertes (huiles végétales ou minérales) est également soulignée, de même que le phénomène de synergie entre amines tertiaires et quaternaires.

Tableau I.2.4 : Principales caractéristiques physico-chimiques de quelques diluants utilisés pour l'extraction réactive de l'acide lactique référencées dans la littérature.

Diluant	Solubilité dans l'eau à 25 °C (mg/L)	log $K_{o/w}$
MIBK	8888	1,31
<i>n</i> -octanol	814	3,00
<i>n</i> -décanol	37	4,57
<i>n</i> -dodécanol	6,89	5,13
Alcool oléique	0,02	7,50
Octane	1,15	5,18
Décane	1,25	5,01
Dodécane	0,11	6,10
Huile tournesol	Négligeable	> 100

* Valeurs estimées par l'intermédiaire de l'EPI SuiteTMestimation, développé par Syracuse Research corporation (SRC) et l'U.S. Environmental Protection Agency (copyright 2000).

2.3.3 Récupération de l'acide et régénération de l'extractant (back-extraction ou dés-extraction)

L'un des avantages majeur de l'utilisation de la technique d'extraction réactive dans un procédé de type ISPR est la possibilité offerte de récupérer l'acide en phase aqueuse et de régénérer la phase extractante en vue d'une nouvelle extraction (Hong *et al.* 2001). Cette technique est nommée « back-extraction » (Figure I.2.6). Le coût de régénération est un

paramètre indispensable à prendre en compte en termes de viabilité économique du procédé de séparation.

La principale approche pour la régénération est appelée « swing-process » : certains facteurs, comme la température, le pH, la composition du diluant sont modifiés pour provoquer la désextraction de l'acide carboxylique de la phase organique vers une phase aqueuse (Tong *et al.* 1999, Hong *et al.* 2001, Wasewar *et al.* 2004). Si la technique de « swing température » (augmentation de la température pour provoquer la dissociation du complexe) a montré des résultats intéressants pour la récupération des acides citriques, succiniques et propioniques (Tong *et al.* 1999, Wasewar *et al.* 2004, Keshav *et al.* 2010), la température n'a que peu d'effet sur le coefficient de distribution de l'acide lactique entre 20 et 90°C et cette technique n'est donc que peu utilisée pour la back-extraction de cet acide (Tong *et al.* 1999). Bien que l'on puisse également adopter une démarche similaire pour le pH, celle-ci requiert l'utilisation de produits chimiques supplémentaires et est génératrice de déchets (Tong *et al.* 1999).

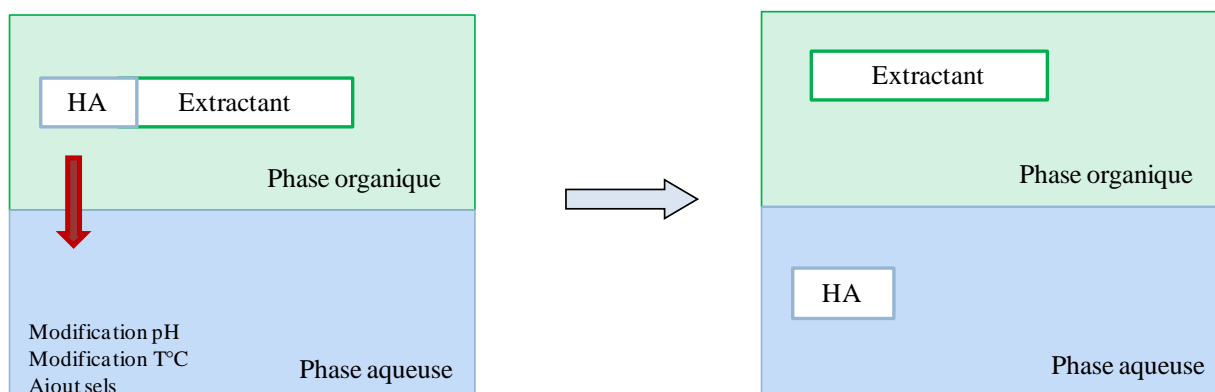


Figure I.2.6 : Principe de la récupération de l'acide et régénération de l'extractant

Une autre approche pour la back-extraction de l'acide, dite de « stripping », est basée sur l'utilisation de composés inorganiques. Son fort pouvoir de séparation, son faible coût et sa capacité à régénérer la phase extractante par un procédé simple en font une approche intéressante pour intégrer un procédé de type ISPR (Tong *et al.* 1999). Cette technique est basée sur un mécanisme d'échange d'ions entre la base conjuguée de l'acide présent en phase organique et les ions présents dans la phase de stripping. Tong *et al.* (1999) ont testé une série de composés inorganiques pour la back-extraction de l'acide à partir d'un complexe lactate-TOMAC (tri-*n*-octylmethylammonium chloride). Les performances de sels de sodium contenant des anions de type Cl^- , OH^- , NO_3^- , SO_4^{2-} et CO_3^{2-} ont d'abord été étudiées. Le

pourcentage de récupération de l'acide lactique augmente ainsi avec la concentration en anions jusqu'à obtenir un plateau. La capacité de stripping des ions Cl^- et NO_3^- permet ainsi une récupération de la quasi-totalité de l'acide (la récupération de l'acide dans de l'eau pure, sans ajout de sel, n'étant que de 7 %). Les cations Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} et NH_4^+ ont également été testés. Des faibles différences ont ainsi été observées entre ces différents ions. Harington et Hossain (2008), ont rapporté un coefficient de distribution d'environ 33 pour la back-extraction de l'acide lactique à partir d'une phase extractante composée de TOA à 20 % et d'huile de tournesol à 80 % en utilisant du Na_2CO_3 à 0,5 M contre environ 1 en utilisant 0,5 M de NaCl.

L'utilisation de bases volatiles comme la triméthylamine ou la triéthylamine pouvant être évaporées après l'étape de désextraction a également été testée, conduisant à de bons rendements de régénération de la phase extractante et récupération de l'acide (Wasewar *et al.* 2004, Keshav *et al.* 2010).

2.3.4 Impact de la phase organique extractante

2.3.4.1 Toxicité générale des solvants et extractants organiques

En cas d'extraction *in situ*, l'utilisation d'une phase organique peut conduire à une série de dommages physiques et biochimiques impactant l'activité des micro-organismes. Cette toxicité du solvant et/ou de l'extractant constitue souvent le problème critique lors de la mise en place de fermentations et bioconversions extractives (Wasewar *et al.* 2004). Bar et Gainer (1987) ont ainsi rencontré des problèmes de toxicité de solvants ainsi que des faibles rendements d'extraction lors de la production d'acides lactique, citrique et acétique par fermentation extractive. Le degré de toxicité d'une phase organique donnée varie selon le micro-organisme.

Différentes études ont tenté de relier les propriétés physico-chimiques des solvants organiques à leur toxicité (Fernandes *et al.* 2003). Le coefficient de partage du solvant dans le système à deux phases octanol-eau (paramètre de Hansch), exprimé en logarithme ($\log P_{\text{oct/eau}}$) a ainsi montré la meilleure corrélation avec les activités biocatalytiques et la croissance cellulaire (Leon *et al.* 1998; Paje *et al.* 1997).

Les solvants sont considérés comme toxiques si leur $\log P$ est inférieur à 2-3 (solvants polaires) et comme non toxiques si leur $\log P$ est supérieur à 4-5 (solvants apolaires) (Fernandes *et al.* 2003). Cette corrélation ne constitue cependant pas une règle absolue,

puisque certaines études suggèrent également que la toxicité pourrait dépendre de la structure moléculaire de ces solvants (Vermuë *et al.* 1993) ainsi que des micro-organismes utilisés (Rajagopal 1999). Un screening de la toxicité de différents solvants organiques usuels contre 9 micro-organismes producteurs d'acide lactique a été effectué par Matsumoto *et al.* (2004a; Tableau I.2.5). Selon cette étude, les solvants ayant un log P inférieur à 3 ont le plus souvent été considérés comme toxiques contre la plupart des micro-organismes étudiés. L'utilisation de liquides ioniques (hexafluorophosphates de 1-butyl-, 1-hexyl- et 1-octyl-3-méthylimidazolium) pour remplacer ces solvants a également été testée (Matsumoto *et al.* 2004b), conduisant à une diminution de la toxicité induite (sur *Lactobacillus rhamnosus*) mais avec des problèmes de solubilisation des molécules extractantes (TOA et TOPO) et donc des performances d'extraction moindres.

Tableau I.2.5 : Toxicité de différents solvants contre différentes bactéries lactiques (Lb : *Lactobacillus*, P : *Pediococcus*, Leu : *Leuconostoc*, B : *Bacillus*). Les + représentent une conservation d'au moins 50 % de l'activité de production d'acide lactique, les – une conservation de moins de 50 % de cette activité (Matsumoto *et al.* 2004a).

Organic solvents	Log P	<i>Lb.</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lb.</i>	<i>P.</i>	<i>Leu.</i>	<i>B.</i>
		<i>rhamnosus</i> NBRC 3863	<i>homohiochi</i> NRIC 0119	<i>homohiochi</i> NRIC 1815	<i>fructivorans</i> NRIC 0224	<i>fructivorans</i> NRIC 1814	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> NRIC 1683	<i>pentosaceus</i> NRIC 0099	<i>fallax</i> NRIC 0210	<i>coagulans</i> NBRC 12583
1-Butanol	0.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Pentanol	1.3	-	-	-	-	+	+	-	-	-
1-Hexanol	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chloroform	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toluene	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Octanol	2.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylene	3.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyclohexane	3.2	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Hexane	3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heptane	4	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Isooctane	4.09	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cyclooctane	4.16	-	-	+	-	+	+	-	+	-
Dodecanol	5	-	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Decane	5.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+

On distingue deux principaux types de toxicité en lien avec l'utilisation de solvants organiques : la *molecular level toxicity* (toxicité de la fraction soluble du solvant dans l'eau donc au niveau moléculaire), et la *phase level toxicity* (toxicité due au contact direct entre la phase organique extractante et la phase aqueuse contenant les micro-organismes producteurs) (Bar and Gainer 1987, Yabannavar and Wang 1991b). Par exemple, certains solvants comme le dodécanol ou l'oléate de méthyl sont toxiques uniquement selon le critère de *phase level* mais pas au niveau *molecular level*, tandis que d'autres sont complètement non toxiques, comme l'huile de paraffine (*Lactobacillus delbrueckii*, Bar and Gainer 1987). D'autres molécules organiques, comme la tridodécylamine (TDA) sont toxiques au niveau moléculaire

et phase (Bar and Gainer 1987). Il est important de noter que dans le cas d'un contact direct entre phases, le rôle joué par chaque type de toxicité est difficilement discernable, en raison de l'impact inévitable de la fraction soluble de la phase organique.

Des phénomènes de toxicité liés à l'utilisation d'Alamine 336, TOA et Aliquat 336 ont également été rapportés (*L. delbrueckii*, Seevaratnam *et al.* 1991, *L. casei*, Demirci *et al.* 1999), sans que la distinction entre les deux types de toxicité ne soit faite. En ajoutant 0,1 % (v/v) de TOA ou d'Aliquat 336 au milieu de culture de *L. delbrueckii*, le glucose n'est ainsi plus consommé et aucune croissance n'est détectée (Seevaratnam *et al.* 1991). A l'inverse, en présence d'huile de paraffine, la consommation de glucose et la croissance bactérienne ne sont plus affectées (Seevaratnam *et al.* 1991).

2.3.4.2 Toxicité à l'échelle moléculaire (*Molecular level toxicity*)

Un solvant peut être toxique de par ses fractions miscibles ou immiscibles avec l'eau (Yabannavar and Wang 1987). Dans le cas de la fraction soluble, on parle de *molecular level toxicity*. D'un point de vue mécanistique, celle-ci serait liée à l'interaction des molécules organiques avec les lipides de la membrane bactérienne, affectant ainsi sa fluidité, sa perméabilité et donc son fonctionnement, et provoquant la détérioration des protéines associées à la membrane (Bar 1986, Pinheiro and Cabral 1991, Heipieper *et al.* 1994, Berberich *et al.* 2000). Cette modification des propriétés membranaires pourrait également affecter le transport des nutriments au travers de celle-ci et conduire à une lyse cellulaire en cas de forte concentration en solvant (Leon *et al.* 1998).

La toxicité au niveau moléculaire peut être évaluée en saturant un milieu aqueux avec la partie soluble de la phase organique à tester, par mélange des deux phases puis séparation par centrifugation (Choudhury *et al.* 1998, Demirci *et al.* 2003). Le tableau I.2.6 répertorie l'impact de ce type de toxicité contre deux micro-organismes en fonction de la phase extractante utilisée.

Tableau I.2.6 : *Molecular level toxicity* de différentes combinaisons de solvants et extractants contre deux lactobacilles (d'après Wasewar *et al.* 2004).

<i>Molecular level toxicity</i>			
Solvant et/ou extractant utilisé(s)	Micro-organisme	% de croissance par rapport au témoin	Auteurs
100 % octanol	<i>L. rhamnosus</i>	83,4	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
100 % TOA	<i>L. rhamnosus</i>	11,4	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
75 % TOA	<i>L. rhamnosus</i>	11,1	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
20 % TOA	<i>L. rhamnosus</i>	14,2	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
10 % TOA	<i>L. rhamnosus</i>	28,1	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
5 % TOA	<i>L. rhamnosus</i>	72,6	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
2 % TOA	<i>L. rhamnosus</i>	100	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
100 % MIBK	<i>L. rhamnosus</i>	61,7	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
50 % MIBK	<i>L. rhamnosus</i>	86,7	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
100 % Alamine 336	<i>L. delbrueckii</i>	8,3	Yabannavar and Yang (1991b)
50 % Alamine 336	<i>L. delbrueckii</i>	55,6	Yabannavar and Yang (1991b)
15 % Alamine 336	<i>L. delbrueckii</i>	68,8	Yabannavar and Yang (1991b)
100 % Alamine 336 (cellules immobilisées)	<i>L. delbrueckii</i>	2,8	Yabannavar and Yang (1991b)
50 % Alamine 336 (cellules immobilisées)	<i>L. delbrueckii</i>	55,6	Yabannavar and Yang (1991b)
100 % Alamine 336 (cellules immobilisées) + huile de soja	<i>L. delbrueckii</i>	66,7	Yabannavar and Yang (1991b)
50 % Alamine 336 (cellules immobilisées) + huile de soja	<i>L. delbrueckii</i>	72,2	Yabannavar and Yang (1991b)

L'effet inhibiteur dépend donc des molécules organiques, de leur solubilité dans l'eau et du micro-organisme testé. Une des façons de diminuer cet impact est d'ajouter au milieu de fermentation des gouttelettes d'huile afin de piéger les molécules de solvant solubilisées dans l'eau (Yabannavar and Wang 1991b, Gu *et al.* 1997).

2.3.4.3 Toxicité par contact direct entre phases (*Phase level toxicity*)

Cette toxicité est due à la présence de deux phases non miscibles formant une interface vers laquelle les micro-organismes présents en phase aqueuse vont avoir tendance à venir s'adsorber. L'effet inhibiteur pourrait provenir d'une augmentation de la tension de surface au niveau de la membrane des cellules (Yabannavar and Wang 1991). L'impact de cette toxicité (Tableau I.2.7) est beaucoup plus marqué que celui de la *molecular level toxicity* (Tableau I.2.6). Elle peut cependant être diminuée par la mise en place d'une membrane entre les deux phases (Ye *et al.* 1996, Demirci *et al.* 2003) ou en immobilisant les cellules dans le réacteur (Trauth *et al.* 2001). Une augmentation du titre final en acide lactique (x 2,5) a ainsi été obtenue par immobilisation des cellules (Tik *et al.* 2001).

L'utilisation d'un contacteur à membrane a également permis d'utiliser une phase extractante composée d'Alamine 336 et d'alcool oléique, normalement décrite comme toxique

lors d'un contact direct avec la phase aqueuse contenant les bactéries productrices, lors de la fermentation extractive de l'acide lactique (Ye *et al.* 1996).

Tableau I.2.7 : *Phase level toxicity* de différentes combinaisons de solvants et d'extractants contre deux lactobacilles (d'après Wasewar *et al.* 2004).

<i>Phase level toxicity</i>			
Solvant et/ou extractant utilisé(s)	Micro-organisme	% de croissance par rapport au témoin	Auteurs
Aq:Octanol (1:1)	<i>L. rhamnosus</i>	12,46	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
Aq:MIBK (1:1)	<i>L. rhamnosus</i>	3,74	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
Aq:Huilé de paraffine (1:1)	<i>L. rhamnosus</i>	96,45	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
Aq:TOA (100:1)	<i>L. rhamnosus</i>	5,6	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
Aq:TOA (50:1)	<i>L. rhamnosus</i>	6,5	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
Aq:TOA (25:1)	<i>L. rhamnosus</i>	6,7	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
Aq:Alcool oléique	<i>L. delbrueckii</i>	96,7	Yabannavar and Yang (1991b)
Aq:Alamine 336 30 % + alcool oléique	<i>L. delbrueckii</i>	0	Yabannavar and Yang (1991b)
Aq:Alamine 336 15 % + alcool oléique	<i>L. delbrueckii</i>	41,7	Yabannavar and Yang (1991b)
Aq:Alamine 336 30 % + alcool oléique (cellules immobilisées)	<i>L. delbrueckii</i>	41,2	Yabannavar and Yang (1991b)
Aq:Alamine 336 15 % + alcool oléique (cellules immobilisées)	<i>L. delbrueckii</i>	73,3	Yabannavar and Yang (1991b)

2.4 Extraction liquide-liquide assistée par contacteur à membrane

2.4.1 Applications de l'extraction en contacteur à membrane

De nombreuses applications de l'utilisation de contacteurs à membrane ont vu le jour dans des domaines variés telles que les industries chimiques, pétrochimiques, pharmaceutiques ou encore agro-alimentaires (Sirkar 2008), le plus souvent dans des configurations de contacts gaz-liquide, pour l'oxygénation de sang ou la carbonatation de boissons par exemple (Pabby and Sastre 2013). Les applications les plus récentes concernent le recyclage des déchets dans les missions spatiales (Cath *et al.* 2005) ou l'utilisation en tant que poumons artificiels (Kim *et al.* 2009) et ouvrent donc de nouveaux horizons pour cette technologie.

Concernant les applications en extraction liquide-liquide, de nombreuses études se sont intéressées à la récupération de composés d'arômes. Pierre *et al.* (2001 et 2002) et Viladomat *et al.* (2006) ont ainsi étudié la récupération de ces derniers dans les effluents agro-industriels en utilisant un contacteur membranaire Liqui-Cel®. L'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huiles essentielles d'agrumes a également été étudiée (Dupuy *et al.* 2011). Dahuron et Cussler (1988) ont travaillé à l'extraction de protéines (cytochrome C, myoglobine, catalase, uréase et chymotrypsine) à l'aide de contacteur à membrane, offrant

ainsi une alternative efficace aux techniques de séparation conventionnelles (colonnes d'extraction liquide-liquide). A ce jour, même si de nombreux travaux étudient l'extraction réactive d'acides organiques assistée par contacteur membranaire (ERCM) (Jin and Yang 1998, Wu *et al.* 2003, Huang *et al.* 2004, Harington and Hossain 2008, Agrahari *et al.* 2014, Moraes *et al.* 2015) aucune application à l'échelle industrielle n'est connue à ce jour.

Cependant, des mises en œuvre à grande échelle existent pour d'autres systèmes, principalement dans le cas d'échanges liquide-gaz : carbonatation de boissons (Pepsi, États-Unis), décarbonatation et nitrogénéation en brasserie (Kirin, Japon), extraction de l'ammoniac d'effluents gazeux (TNO, Pays-Bas). Concernant les échanges liquide-liquide, des procédés de traitement d'eaux usées couplés à la récupération de composés aromatiques (Klaassen and Jansen 2001, KoSa Netherlands BV, Pays-Bas) et d'extraction de phénol contenu dans un liquide organique vers une phase aqueuse (Sirkar 2008) ont également été développés. En marge de l'extraction liquide-liquide à membrane classique, l'utilisation de modules à fibres creuses hydrophiles asymétriques (polyacrylonitrile-méthyle acrylate) a été décrite à l'échelle industrielle pour la production enzymatique d'un intermédiaire de fabrication du diltiazem, médicament anti-hypertenseur (Lopez and Matson 1997). D'autres applications commerciales dans le domaine pharmaceutique concernent la purification d'acide mévinolinique (Prasad and Sirkar 1989) et la synthèse d'ibuprofène (Long *et al.* 2003).

2.4.2 Principe et mise en œuvre de l'extraction liquide-liquide à membrane

2.4.2.1 Principe de l'extraction liquide-liquide à membrane

L'extraction liquide-liquide est une opération qui permet la séparation de deux ou plusieurs constituants d'un mélange grâce à leur différence de partage entre deux phases liquides non ou partiellement miscibles (Datta *et al.* 2015). Le principe est de mettre en contact intime une solution d'alimentation contenant les constituants à séparer (fractions ou solutés) avec une seconde phase liquide appelée solvant. Ce dernier s'enrichit en solutés jusqu'à l'équilibre thermodynamique, suite à quoi les deux phases sont séparées l'une de l'autre. Enfin, une dernière étape peut être mise en œuvre dans le but de purifier la fraction d'intérêt et régénérer le solvant.

En utilisant un contacteur membranaire, il est possible de former une interface stable entre deux phases au niveau des pores d'une membrane poreuse. Les deux phases circulent donc de part et d'autre de cette membrane sans se mélanger. On parle alors de contact non dispersif entre les deux phases. La membrane a uniquement un rôle de support permettant la

stabilisation de l'interface et n'apporte pas de sélectivité. Les pores de la membrane sont remplis par l'une des deux phases (dite phase mouillante) en fonction de l'affinité entre le matériau membranaire et les liquides (Figure I.2.7). Afin d'éviter le passage de la phase mouillante au travers de la membrane et par conséquent sa dispersion dans l'autre phase, une légère surpression est appliquée du côté du liquide non mouillant afin de stabiliser l'interface. Cette surpression, dépendante de la nature et de la structure de la membrane, ainsi que des propriétés des fluides en contact, est généralement comprise entre quelques millibars et quelques bars (Dupuy 2010). Elle est régie par la pression critique, qui dépend de la tension interfaciale entre les deux fluides, l'angle de contact et le rayon du plus gros pore. C'est l'équation de Young-Laplace, reposant sur un modèle de structure de pores simple, qui constitue la méthode la plus employée pour calculer ΔP_c (équation 5).

$$\Delta P_c = -\frac{2 \times \gamma \times \cos \theta_c}{r}$$

Avec γ la tension interfaciale entre les fluides ($N.m^{-1}$), θ_c l'angle de contact critique entre le matériau et les deux liquides ($^\circ$), r le rayon des pores de la membrane (m) et ΔP_c la valeur de la pression critique en Pa.

Comme dans le cas d'une extraction liquide-liquide conventionnelle, la phase d'extraction doit être choisie de façon à garantir une tension interfaciale suffisamment élevée pour éviter le mélange.

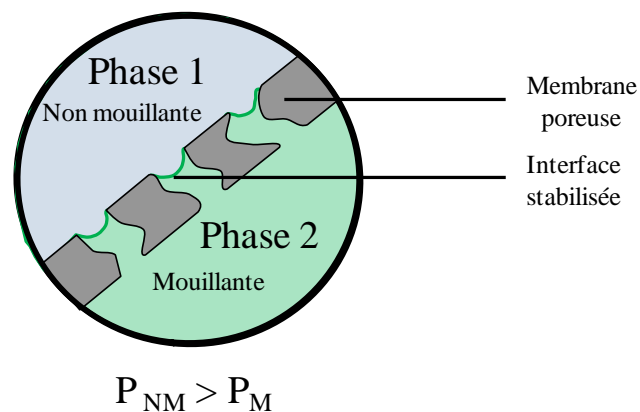


Figure I.2.7 : Schéma de principe de l'extraction liquide-liquide à membrane. La pression plus élevée appliquée côté phase non mouillante permet la stabilisation de l'interface.

Le transfert de matière entre les deux phases au sein d'un contacteur membranaire est régi par une différence de potentiels chimiques et un coefficient de transfert de matière. Ce

dernier ne dépend pas de la pression transmembranaire appliquée (Kiani *et al.* 1984). Le flux de transfert de matière (mass flow rate) d'un soluté i entre les deux fluides est représenté par l'équation (6), qui relie un coefficient de transfert de matière, une surface d'échange et une force motrice :

$$m_i = k_i \times A \times F_{Mi} \quad (6)$$

Avec m le flux de transfert de matière ($\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$), K le coefficient global de transfert de matière ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), A la surface d'échange (m^2) et FM la force motrice ($\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$). On peut exprimer la force motrice, différence de potentiel chimique ou d'activité du composé i , en termes de concentrations. Cette force motrice représente l'écart à l'équilibre entre les deux phases.

2.4.2.2 Avantages et limites des contacteurs membranaires

L'emploi de membranes permet un contact non dispersif entre les phases aqueuse et organique, ce qui permet de s'affranchir des étapes de séparation de ces phases après leur mise en contact et d'apporter un gain important en temps et en énergie. Les contacteurs membranaires offrent également des perspectives intéressantes quant à l'intensification des procédés, de par leur flexibilité (facilité de mise à l'échelle et modularité des procédés), leur compacité (surfaces spécifiques pouvant atteindre $3000 \text{ m}^2/\text{m}^3$) et l'élargissement du choix des solvants. D'une manière générale, les modules sont 5 à 20 fois plus petits que les systèmes dispersifs (Sirkar 2008).

En contrepartie de ces avantages, la présence de la membrane peut engendrer une résistance supplémentaire au transfert de matière qui n'existe pas dans le cas des systèmes dispersifs conventionnels. Des membranes très fines et très poreuses permettent de limiter cette résistance. Les membranes polymériques présentent l'avantage d'être moins chères que les membranes en céramique, mais présentent une durée de vie limitée qui dépend des liquides utilisés et des protocoles de nettoyage appliqués (Daramola *et al.* 2012). De plus, elles ne peuvent pas être stérilisées à la chaleur et sont sensibles au pH (Daramola *et al.* 2012). Enfin, différents problèmes peuvent être rencontrés et doivent donc être considérés avant un éventuel passage à l'échelle industrielle (Younas 2011), notamment un manque de données cinétiques pour dimensionner les contacteurs membranaires lors du changement d'échelle. La figure I.2.8 résume les principaux avantages et inconvénients de l'utilisation des contacteurs membranaires pour l'extraction liquide-liquide.

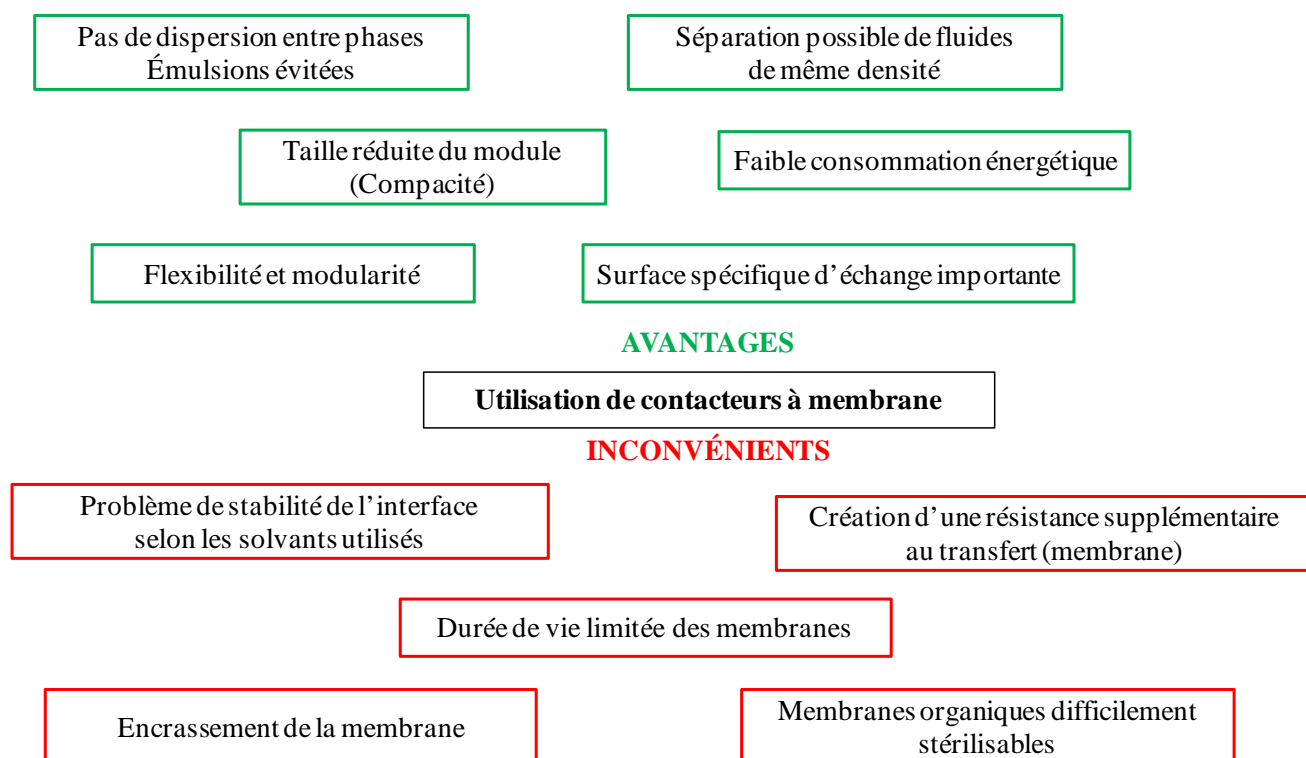
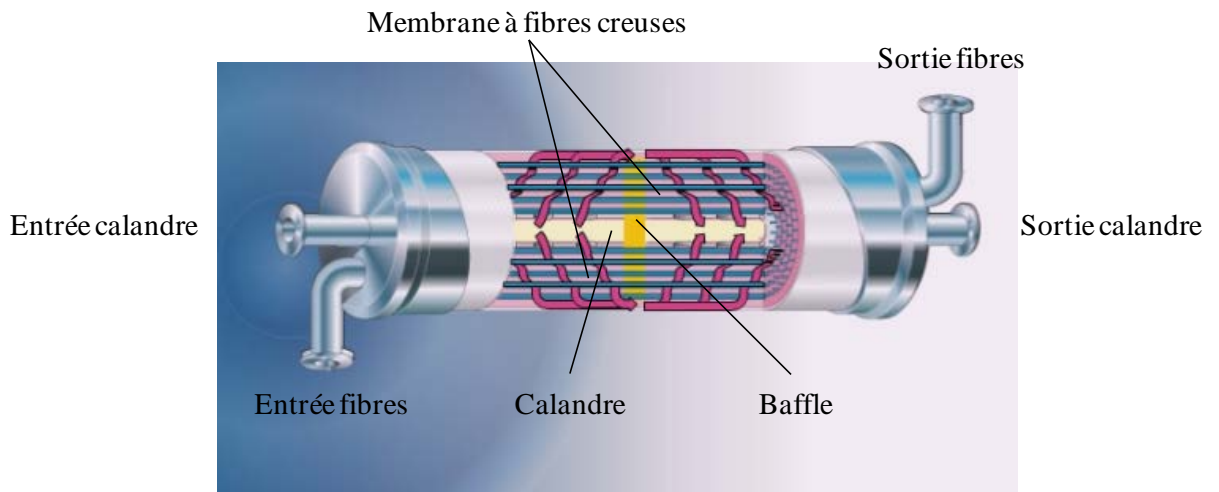


Figure I.2.8 : Principaux avantages et inconvénients de l'utilisation des contacteurs à membranes (d'après Boucif, 2012).

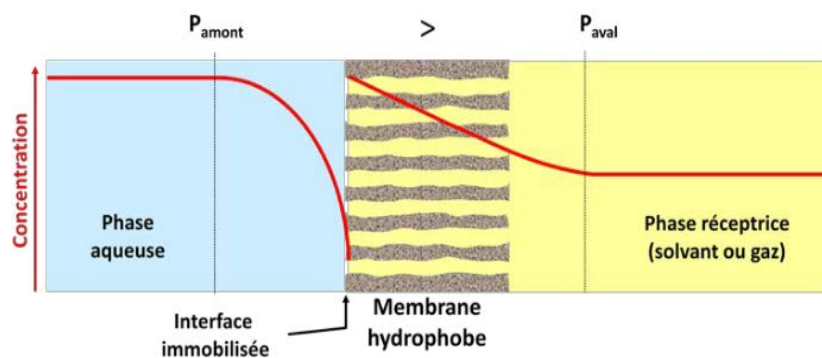
2.4.3 Transfert de matière dans les contacteurs membranaires

2.4.3.1 Profil de concentration et résistance au transfert

La résistance globale au transfert de matière au sein du contacteur peut être décrite selon la loi des résistances en série comme étant la somme des résistances générées dans les différents compartiments, en amont de la membrane (phase aqueuse), au sein de celle-ci et en aval de la membrane (phase organique). Étant donnée la géométrie du module (Figure 1.2.9a), on peut considérer que le transfert de matière est exclusivement diffusif à l'intérieur des pores dans le cas de fibres creuses en polypropylène utilisées dans un contacteur Liqui-Cel (diamètre moyen 30 nm, longueur effective des pores d'environ 100 μm). La figure 1.2.9b propose une représentation d'un profil de concentration au voisinage de la membrane poreuse en extraction liquide-liquide.



a)



b)

Figure I.2.9 : a) Représentation schématique du contacteur Liqui-Cel® (2,5 × 8, fibres X50 en polypropylène hydrophobe) et b) Profil de concentration en soluté au voisinage d'une membrane hydrophobe (Dupuy 2010)

2.4.3.2 Détermination du coefficient de distribution apparent K_D

En extraction liquide-liquide, avec ou sans membrane, la force motrice du transfert résulte de la différence de potentiel chimique du soluté entre les deux phases : le produit d'intérêt (soluté) est présent dans la phase aqueuse mais peu ou pas dans la phase extractante (solvant). Il y a alors transfert du soluté jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique. Cet équilibre est caractéristique du système phase aqueuse – soluté – phase extractante et varie en fonction de la température.

Comme mentionné plus haut, l'équilibre entre les phases est décrit par le coefficient de distribution (K_D) dont l'expression est donnée par l'équation 1 (partie 2.1.2.1). La valeur du coefficient de distribution influence sur la configuration de l'ERCM et notamment sur le choix de la membrane utilisée (Prasad and Sirkar 1988, Figure I.2.10). Ainsi si $K_D > 1$, l'usage d'une membrane hydrophobe est indiqué puisque ces pores seront remplis par la phase organique

extractante, l'ensemble générant une résistance au transfert la plus faible possible. Si $K_D < 1$, une membrane hydrophile sera plus adaptée.

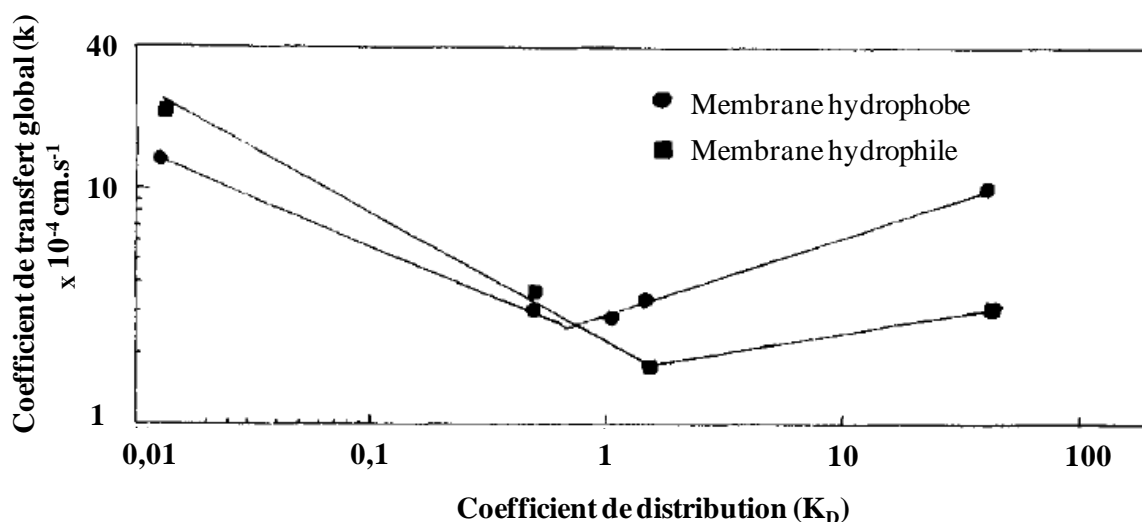


Figure I.2.10 : Coefficients de transfert de matière obtenus en contacteur membranaire liquide-liquide avec deux types de membranes : hydrophobe (polypropylène) et hydrophile (cellulose régénérée) (d'après Prasad and Silkar 1988)

2.4.4. Les contacteurs à membrane : une technologie innovante pour l'extraction liquide-liquide réactive

Les procédés à membranes présentent de nombreux avantages et sont implantés largement à l'échelle industrielle. Ils constituent des alternatives crédibles aux procédés d'extraction conventionnels tels que l'échange d'ions ou encore la distillation (Pabby and Sastre 2013). De plus, ces techniques membranaires peuvent être facilement intégrées à différents niveaux du procédé de séparation en raison de leur compacité et de leur possible automatisation (Bernardo and Clarizia 2011), ce qui en fait des procédés plus flexibles. L'étape de mise à l'échelle est également facilitée. Les procédés à membranes sont également reconnus comme peu énergivores et générant des impacts environnementaux réduits. Parmi l'ensemble des techniques membranaires, l'utilisation de contacteurs à membrane s'est développée de manière importante ces dernières années en particulier pour de l'extraction liquide-liquide, conduisant à une amélioration de l'efficacité par rapport à un procédé traditionnel (Bringas *et al.* 2013).

Bien adaptées à l'extraction sélective des acides organiques, les techniques basées sur l'utilisation d'une phase organique extractante peuvent ainsi être couplées à certaines techniques membranaires (Stark and von Stockar 2003), de manière à augmenter la surface

spécifique d'échange tout en évitant un mélange entre les phases aqueuses et organiques. L'extraction réactive par des amines a été largement étudiée et décrite dans le cas de la récupération de l'acide lactique. Cette réaction nécessite la mise en contact dispersif de la phase aqueuse contenant l'acide avec une phase organique contenant l'acide. En plus des problématiques de toxicité pour la cellule, cette méthode dispersive peut conduire à la formation d'émulsions stables non désirées. Une solution permet de pallier ces problèmes : l'utilisation des contacteurs liquide-liquide à membrane, déjà décrite pour l'extraction réactive de l'acide lactique (Tableau I.2.8). Il s'agit de membranes hydrophobes ou hydrophiles poreuses permettant de stabiliser l'interface entre les deux phases en évitant leur mélange. Dans le cas des membranes hydrophobes, il s'agit principalement de matériaux en polypropylène (PP), polyéthylène (PE), polytétrafluoroéthylène (PTFE), polytétrafluoroéthylène-co-perfluorovinyléther (PFA) ou polyvinylidène fluoride (PVDF). Dans le cas des membranes hydrophiles, il s'agit souvent de polyoléfine (PO), polysulfone (PS), polyamide (PA), voire de cellulose ou encore de céramique (Fernandes *et al.* 2003). Ce système membranaire permet de diminuer la toxicité de la phase organique d'extraction. De plus, il ne nécessite pas d'étape de filtration préalable, ce qui simplifie le procédé couplé par rapport à l'électrodialyse ou l'échange d'ions sur résine notamment.

Tableau I.2.8 : Etudes mentionnant l'utilisation de contacteurs à membranes poreuses pour l'extraction réactive de l'acide lactique (2-HP)

Type de membrane	Objectif	Fibres	Calandre	Auteurs
Polypropylène (hydrophobe)	Extraction	Phase aqueuse Acide lactique (280 mM)	Phase organique Aliquat 336 + hydrocarbures	Coelhoso <i>et al.</i> (1997)
Polypropylène (hydrophobe)	Extraction	Phase organique Alamine 336 + 2-octanol	Phase aqueuse Acide lactique (5-40 g/L)	Huang <i>et al.</i> (2004)
Polypropylène (hydrophobe)	Extraction	Phase aqueuse Acide lactique (0,2 M)	Phase organique Aliquat 336 + TOA + huile de tournesol +TBP	Harington and Hossain (2008)
Polypropylène (hydrophobe)	Back extraction	Phase organique Alamine 336 + 2-octanol	Phase aqueuse Solution NaOH	Huang <i>et al.</i> (2004)
Polypropylène (hydrophobe)	Back extraction	Phase aqueuse Solution NaCl (1 M)	Phase organique Aliquat 336 + hydrocarbures	Coelhoso <i>et al.</i> (1997)
Polyoléfine (hydrophile)	Back extraction	Phase aqueuse Acide lactique	Phase organique TOMAC + alcool oléique	Tong <i>et al.</i> (1999)
Polyoléfine (hydrophile)	Extraction	Phase aqueuse Milieu de fermentation	Phase aqueuse	Tong <i>et al.</i> (1998)

L'extraction réactive par contacteur à membranes (ERCM) présente plusieurs autres avantages techniques. Ce procédé peut fonctionner en continu, ce qui facilite la conduite du système couplé. Il est plus compact et flexible que les composés dispersifs. De plus, le

procédé d'ERCM est relativement bien documenté dans le cas de l'acide lactique (Coelho *et al.* 1997, Huang *et al.* 2004, Harington and Hossain 2008).

Coelho *et al.* (1997), pionniers de l'extraction réactive par contacteur à membranes appliquée à l'acide lactique, utilisent une solution aqueuse de lactate de sodium et une phase organique composée d'Aliquat 336 diluée dans un mélange d'hydrocarbures dans le but de démontrer la faisabilité de l'intégration de contacteurs à membranes dans des procédés d'ISPR. Le transfert de matière à travers les pores de la membrane est assimilé à un mécanisme de diffusion contrôlée et souvent considéré comme l'étape limitante. De façon à augmenter le coefficient de transfert de matière, il est nécessaire d'augmenter le coefficient de diffusion du complexe acide-amine, notamment en réduisant la viscosité de la phase organique, par augmentation de la température ou réduction de la concentration en molécules extractantes (Coelho *et al.* 1997).

Plus récemment, Huang *et al.* (2004) ont montré que le coefficient global de transfert de matière de l'acide lactique en phase organique (composée d'Alamine 336 diluée dans de l'octanol) augmentait avec le débit d'alimentation en phase aqueuse ($1,71 \times 10^{-5}$ m/s à 20 mL/min et $3,1 \times 10^{-5}$ m/s à 120 mL/min), mais pas en phase organique, suggérant que le transfert n'était pas limité par la diffusion dans les pores hydrophobes de la membrane du contacteur.

L'ERCM a également été utilisée avec succès pour l'extraction de l'acide succinique par des amines tertiaires (Agrahari *et al.* 2014, Moraes *et al.* 2015), de l'acide butyrique (Wu *et al.* 2003) et de différents autres acides carboxyliques (acétique, propionique, valérique, Schlosser *et al.* 2005). Schügerl (2005) a ainsi répertorié quelques études concernant l'ERCM de différents acides carboxyliques en fonction du type de membrane et de la phase organique extractante utilisée (Tableau I.2.9).

Tableau I.2.9 : Exemples d'ERCM d'acides carboxyliques et phase organique extractante utilisée (d'après Schügerl 2005)

Type de membrane	Acide	Phase organique	Auteurs
Polypropylène	Acétique	MIBK	Segupta <i>et al.</i> (1988a)
Polypropylène	Acétique	MIBK / xylène	Segupta <i>et al.</i> (1988b)
Polypropylène Polysulfone Polyéthylène	Acétique	Alamine 304 / décane Adogen 283 / décane TOPO / kérosène	Solichien <i>et al.</i> (1995)
Cellulose acétate	Succinique	MIBK / butanol	Prasad and Sirkar (1987)
Polypropylène Polysulfone Polyéthylène	Propionique	Alamine 304 / décane Adogen 283 / décane TOPO / kérosène	Solichien <i>et al.</i> (1995)
Polypropylène	Propionique	TOPO / décane TOPO / kérosène	Ozdali <i>et al.</i> (1996)
PVDF	Citrique	TOA / xylène	Juang <i>et al.</i> (1998)
PVDF	Citrique	Alamine 336 / xylène	Birman <i>et al.</i> (1990)
Polypropylène	Citrique	TOA / MIBK	Basu and Sirkar (1992)

2.4.5 Utilisation de contacteurs membranaires en fermentations extractives

Les travaux de Wu and Yang (2003) étudient la production d'acide butyrique à partir de glucose en mode fed-batch avec des cellules immobilisées de *Clostridium butyricum*. L'ERCM est réalisée par une amine tertiaire (Alamine 336) diluée dans l'alcool oléique au sein d'un contacteur membranaire hydrophobe à fibres creuses (Celgard X-30, Liqui-Gel Extra-flow), couplé à un deuxième contacteur à membrane utilisé pour la dés extraction de l'acide et la régénération de l'extractant (Figure I.2.11). Les avantages de l'ISPR et de l'utilisation d'un contacteur à membrane sont mis en évidence : concentration finale en acide butyrique multipliée par 15 dans la phase aqueuse de récupération (passage de 20 à 300 g.L⁻¹), augmentation de la productivité (passage de 5,11 à 7,37 g.L⁻¹.h⁻¹) et du rendement de production (passage de 0,38 à 0,45 g/g de substrat), formation du produit d'intérêt favorisé par rapport aux co-produits, pH stabilisé grâce à l'extraction, concentration en acide faible et constante dans le bioréacteur (vitesse de production équivalente à la vitesse d'extraction) ce qui limite la toxicité induite par l'acide butyrique. La pureté du produit obtenu est également très élevée (91 %). L'utilisation de cellules libres en suspension dans le bioréacteur a été testée sans toutefois conduire à des résultats intéressants en raison de la forte toxicité exercée par la phase organique extractante sur les bactéries productrices circulants dans le contacteur.

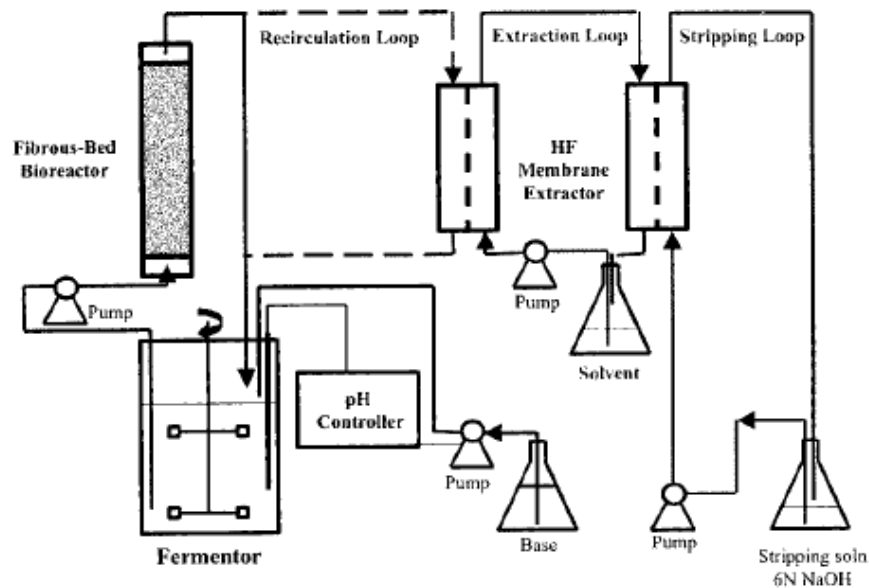


Figure I.2.11 : Montage expérimental du couplage fermentation et extraction liquide-liquide réactive assistée par contacteurs à membrane dans le cas de la production d'acide butyrique par *C. butyricum* à partir de glucose (Wu and Yang 2003)

Une autre étude (Jin and Yang 1998) s'intéresse à l'utilisation de la fermentation extractive pour la production d'acide propionique à partir du lactose chez *Propionibacterium acidipropionici* et son extraction à l'aide d'une phase organique extractante composée de tridécylamine diluée dans de l'alcool oléique assistée par contacteur membranaire de nature hydrophobe (Celgard X-30, Liqui-Gel Extra-flow). Le système intégré est présenté sur la figure I.2.12. Là encore, en comparaison à une production conventionnelle en batch, les résultats obtenus sont nettement améliorés : productivité de $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (x 5), rendement de $0,66 \text{ g/g}$ de substrat (+ 20 %), titre final de 75 g.L^{-1} et pureté d'environ 90 %. La production de co-produits (acide acétique et acide succinique) est également diminuée et les performances du procédé intégré sont restées constantes durant le mois et demi qu'a duré l'étude.

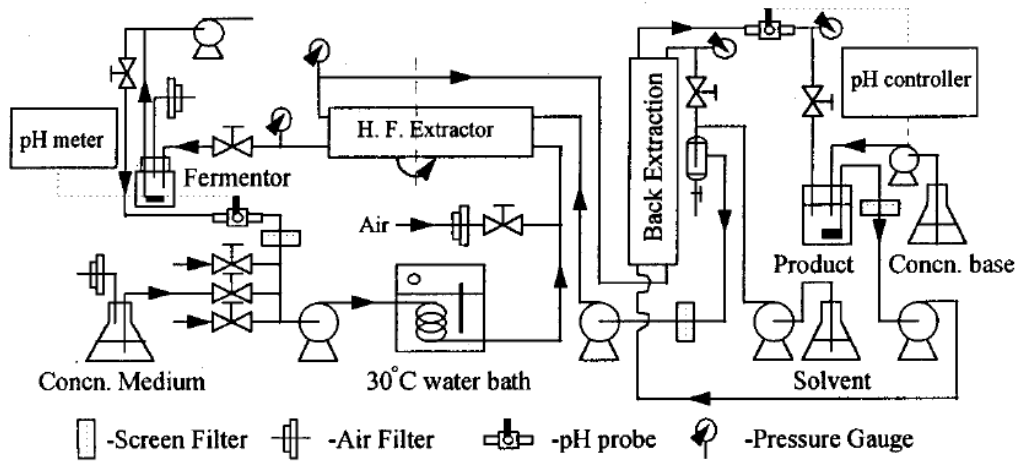
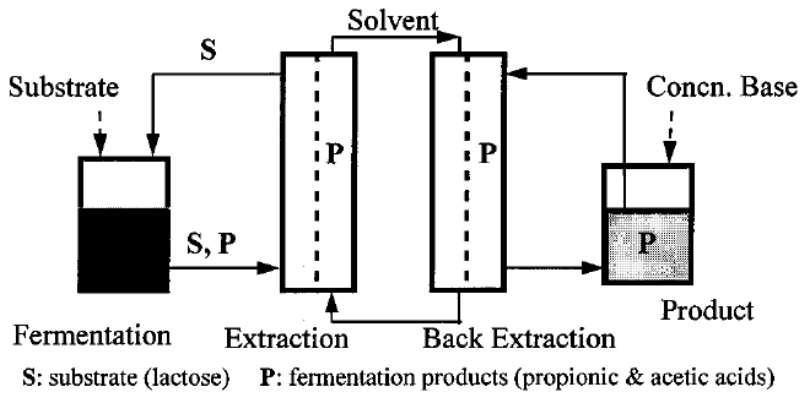
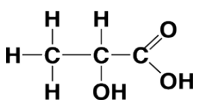
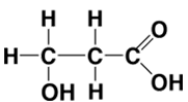


Figure I.2.12 : Montage expérimental du couplage fermentation et extraction liquide-liquide réactive assistée par contacteurs à membrane dans le cas de la production d'acide propionique par *Proponibacterium acidipropionici* à partir de lactose (Jin and Yang 1998)

Résumé de la deuxième partie :

Bien qu'il n'y ait à l'heure actuelle dans la littérature aucune technique de type ISPR développée dans le cas de l'extraction du 3-HP, quelques brevets suggèrent que les procédés efficaces pour la séparation et l'extraction de son isomère de position, l'acide lactique (2-HP), seraient transposables au 3-HP, du fait des similitudes structurales et des propriétés physico-chimiques comparables de ces deux molécules (Meng *et al.* 2007, Marx *et al.* 2009). Celles-ci sont en effet deux acides hydroxycarboxyliques, isomères de position, de petites tailles, peu volatils et très hydrophiles (Tableau I.2.10).

Tableau I.2.10 : Comparaison des propriétés physico-chimiques des deux isomères (2-HP et 3-HP)

	Acide 2-hydroxypropionique (2-HP)	Acide 3-hydroxypropionique (3-HP)
		
pKa	3,86	4,5
Constante de Henry* (atm.m ³ /mol)	1,13x10 ⁻⁷	2,66x10 ⁻¹¹
Log K _{O/w} *	-0,65	-0,89

* Valeurs estimées par l'intermédiaire de l'EPI SuiteTMestimation, développé par Syracuse Research corporation (SRC) et l'U.S. Environmental Protection Agency (copyright 2000).

Une technique prometteuse de plus en plus étudiée et utilisée pour l'extraction du 2-HP est l'extraction réactive assistée par contacteur à membranes dans une phase organique (diluant) contenant une molécule extractante (Coelho *et al.* 1997, Choudhury *et al.* 1998, Harington and Hossain 2008, Kyuchoukov and Yankov 2012). Par cette technique, une molécule extractante en solution dans un diluant organique est mise en contact avec l'acide à extraire à travers les pores d'une membrane qui va permettre la stabilisation de l'interface. L'extractant va alors réagir avec l'acide présent en phase aqueuse pour former un complexe soluble dans la phase organique. L'étude bibliographique réalisée a permis d'identifier différents extractants et diluants potentiels, parmi lesquels une amine tertiaire à longue chaîne, la tri-*n*-octylamine (TOA), et/ou un sel d'ammonium quaternaire tri-*n*-octylmethylammonium chloride (Aliquat 336) comme extractants, et le *n*-decanol comme diluant.

La toxicité éventuelle de la phase extractante utilisée constitue cependant l'un des paramètres clés à maîtriser afin d'envisager la réussite d'une telle approche pour l'ISPR du 3-HP.

3 – Problématique, hypothèses de travail et objectifs de la thèse

Dans un contexte de diminution des réserves d'origine fossile et de forte préoccupation environnementale, un intérêt majeur est porté à la production de molécules plateformes par voie biotechnologique. Ainsi, du fait des différents problèmes rencontrés lors de sa synthèse par voie chimique (Della Pina *et al.* 2011) et en lien avec l'augmentation des besoins pour satisfaire la demande du marché des acides organiques (Sauer *et al.* 2009), les études concernant la production de 3-HP par voie biotechnologique se développent fortement (Luo *et al.* 2012, Kumar *et al.* 2013, Dishisha *et al.* 2014). Plusieurs brevets concernant sa production (Suthers and Cameron 2005, Yasuda *et al.* 2006, Liao *et al.* 2007, Marx *et al.* 2007, Gokarn *et al.* 2012) ou sa purification (Meng *et al.* 2007, Tsobanakis *et al.* 2009, Jump 2011) ont également été déposés. En raison des faibles performances des micro-organismes naturellement producteurs (présence de co-produits, toxicité des métabolites de la voie), l'approche basée sur l'ingénierie métabolique constitue actuellement le principal levier d'optimisation. Elle concerne deux bactéries en particulier : *E. coli* (Raj *et al.* 2009, Kwak *et al.* 2013, Kim *et al.* 2014, Jung *et al.* 2014, Jung *et al.* 2015) et *K. pneumoniae* (Luo *et al.* 2011, Wang *et al.* 2012, Kumar *et al.* 2013, Ashok *et al.* 2013). Des études concernant l'amélioration ciblée de *L. reuteri* (Dishisha *et al.* 2014) ainsi que des tests chez la levure *S. cerevisiae* (Chen *et al.* 2014) ont également été menées récemment.

Le second levier d'optimisation pour la production de 3-HP réside dans la maîtrise des procédés de bioconversion et d'extraction *in situ* de la molécule d'intérêt au sein d'un procédé intégré. Cette stratégie permet en effet d'envisager d'orienter le métabolisme de *L. reuteri* jusqu'à l'obtention de 3-HP, tout en soustrayant cette molécule inhibitrice du milieu de production. Ainsi, **l'un des enjeux de la thèse porte sur la compréhension des verrous physiologiques de la bioconversion du glycérol en 3-HP et l'identification des conditions environnementales adéquates** pour favoriser cette production tout en minimisant la formation de co-produits. D'autre part, des phénomènes d'inhibition des bactéries productrices ont été mis en évidence dans la littérature (acidification du milieu liée à l'excrétion du 3-HP, perte de cultivabilité et d'activité enzymatique, vraisemblablement causée par le 3-HPA ; Cleusix *et al.* 2007, Schaeffer *et al.* 2010). **L'intégration des étapes de bioconversion et d'extraction (ISPR) constitue une stratégie innovante pour lever ces inhibitions et optimiser les performances de production du 3-HP.** De plus, la caractérisation de l'état physiologique des bactéries, soumises à différents stress (biologiques, chimiques et physiques) au sein du procédé intégré, ainsi que l'exploration des mécanismes

associés constituent une originalité de l'étude proposée, par rapport à celles rapportées dans la littérature (van Maris *et al.* 2004, Cleusix *et al.* 2007). La mise en place du système intégré permettra de **mettre en évidence les interactions à différentes échelles** (moléculaire, cellulaire, population, échelles microscopique et macroscopique) **entre procédé microbiologique et procédé de séparation.**

Le **procédé de séparation** adapté à cette approche d'*ISPR* doit permettre l'**extraction du 3-HP** du milieu de bioconversion, tout en **évitant d'éventuels effets inhibiteurs sur les micro-organismes.** Dans le cas du 3-HP, acide faible, hydrophile et peu volatil, produit en milieu aqueux à faible concentration, aucun procédé de séparation couplé à la production par voie biotechnologique n'est décrit dans la littérature. Cependant, au vu de la proximité du 3-HP avec l'acide lactique (2-HP), des brevets proposent d'employer l'électrodialyse, les résines échangeuses d'anions et l'extraction réactive pour extraire le 3-HP. Ces techniques sont habituellement utilisées pour la purification des acides organiques (Tong *et al.* 1999). Dans le cas de l'électrodialyse et des résines échangeuses d'anions, des étapes de filtration préalables sont nécessaires afin de séparer les cellules du milieu (Jump, 2011). L'**extraction réactive du 3-HP** en utilisant des amines est notamment suggérée dans un brevet (Marx *et al.* 2009). Cette méthode est en outre largement décrite dans la littérature pour l'extraction de l'acide lactique. Il s'agit, dans la plupart des cas, de l'utilisation d'amines tertiaires et quaternaires solvatées dans des phases organiques diverses (alcools, esters). Cette réaction nécessite la mise en contact dispersif de la phase aqueuse contenant l'acide avec une phase organique contenant l'extractant. En plus des problématiques de toxicité pour les cellules, cette méthode dispersive peut conduire à la formation d'émulsions stables non désirées. Une solution permet de pallier ces problèmes : l'utilisation d'un **contacteur membranaire**, déjà décrite pour l'extraction réactive de l'acide lactique (Tong *et al.* 1999). Il s'agit de membranes poreuses permettant de stabiliser l'interface entre les deux phases en évitant leur mélange. Ce système membranaire permettrait de limiter la mortalité cellulaire due à la toxicité de la phase organique d'extraction.

L'**extraction réactive assistée par contacteur à membrane (ERCM)** présente plusieurs autres avantages techniques. Ce procédé peut fonctionner en continu, ce qui facilite la conduite du système intégré. Il est plus compact et flexible que les procédés dispersifs (la compacité des contacteurs à membrane pouvant atteindre $3000 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ et les modules étant en général 5 à 20 fois plus petits que les systèmes dispersifs). De plus, l'ERCM est relativement bien documentée dans le cas de l'acide lactique (Hong *et al.* 2001, Huang *et al.* 2004,

Harrington and Hossain, 2008) : les rendements d'extraction décrits sont meilleurs que ceux rapportés pour l'électrodialyse. Malgré ces avantages, la mise en œuvre du procédé d'ERCM n'a pas encore été décrite pour l'extraction *in situ* du 3-HP.

Ce travail de thèse a pour objectifs de :

- (i) comprendre les déterminants métaboliques de la bioconversion du glycérol par *L. reuteri* afin d'améliorer la production de 3-HP ;
- (ii) coupler la bioconversion au procédé de séparation *in situ* et comprendre l'impact de ce procédé intégré sur les performances de production (concentration, rendement, pureté) et sur l'état physiologique des bactéries productrices.

Pour répondre à la problématique posée, nous nous attacherons à :

- (a) évaluer le niveau des inhibitions provoquées sur les bactéries productrices par les métabolites de la voie de biosynthèse du 3-HP et en déterminer les mécanismes ;
- (b) concevoir un procédé séparatif adapté à l'extraction du 3-HP au sein d'un milieu aqueux complexe et biocompatible avec les bactéries mises en œuvre ;
- (c) comprendre les mécanismes limitant le transfert des métabolites dans le procédé d'extraction.

Le schéma général détaillé de l'approche intégrée couplant bioconversion du glycérol par *L. reuteri* et extraction liquide-liquide réactive assistée par contacteur à membrane est présenté sur la figure I.3.1. Ce projet se situe donc à l'interface de deux champs disciplinaires, le génie microbiologique et le génie des procédés séparatifs, et mobilisera également des connaissances en génie chimique, chimie analytique et physiologie cellulaire.

Projet multidisciplinaire : **Génie microbiologique** + **Génie des procédés**

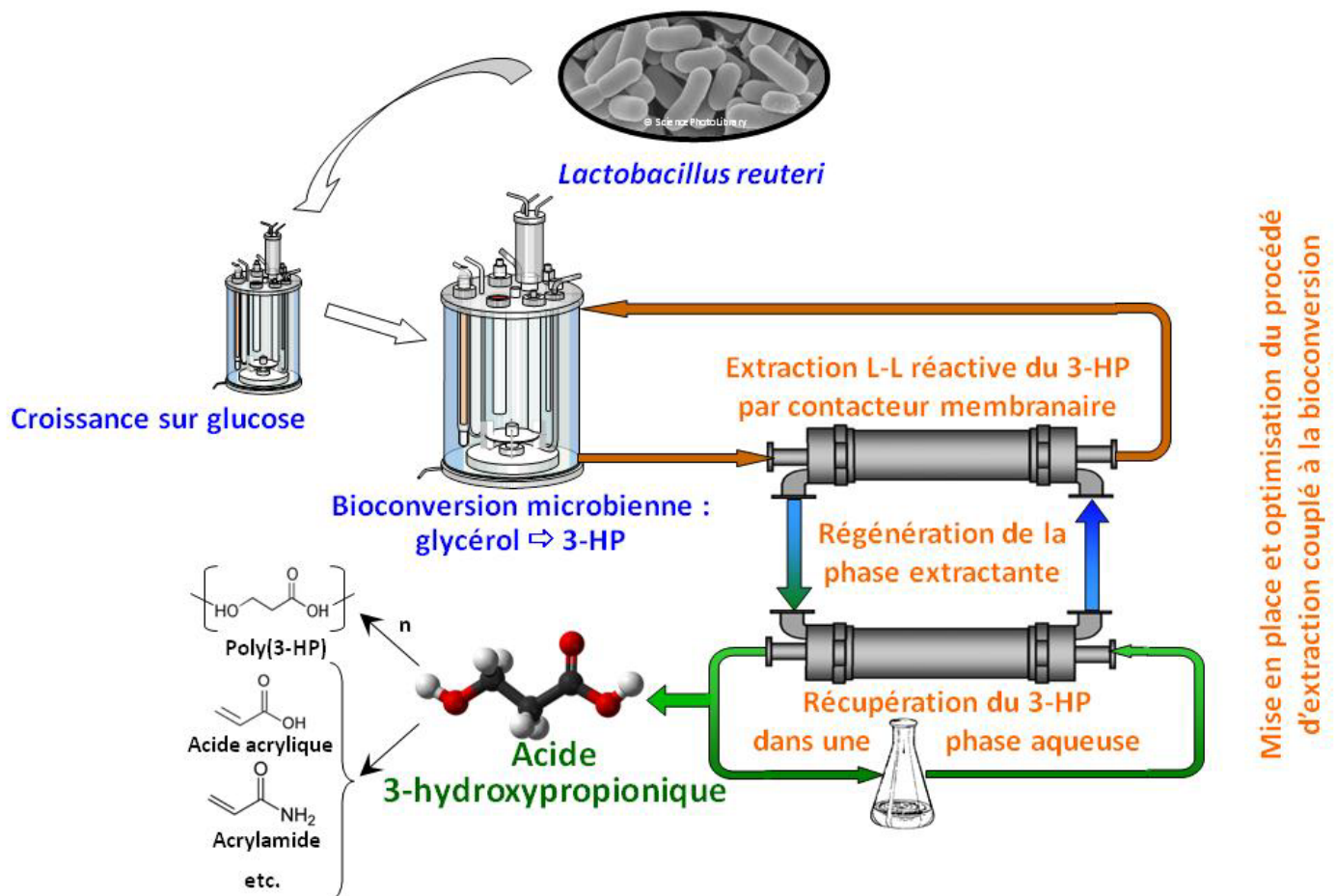


Figure I.3.1 : Schéma général détaillé du procédé intégré couplant bioconversion du glycérol par *L. reuteri* et extraction réactive liquide-liquide *in situ* du 3-HP produit en contacteur à membrane

CHAPITRE II :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 – Bioconversion du glycérol en 3-HP par voie microbienne

1.1 Bactéries et milieu de culture

1.1.1 Souches de *Lactobacillus reuteri* mises en œuvre et analyses bioinformatiques développées pour leur comparaison

Au cours de ce projet, trois souches de *L. reuteri* ont été étudiées. La souche **DSM 17938** a été obtenue par Rosander *et al.* (2008) à partir de la souche ATCC 55730 (aussi nommée SD 2112) isolée chez l'humain, par délétion de deux gènes de résistance à des antibiotiques (tet(W) et lnu(A) permettant la résistance à la tétracycline et à la lincosamide, respectivement). La souche utilisée provient de la société BioGaia AB (Stockholm, Suède). La souche **DSM 20016**, aussi nommée ATCC 53609 et également été isolée chez l'humain (Frese *et al.* 2009), est la souche type de laboratoire. Elle est issue de la collection de l'Institut Pasteur (Paris, France). Enfin, la souche **ATCC 53608**, isolée chez le cochon (MacKenzie *et al.* 2010), a été achetée à l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, États-Unis). La Figure II.1.1 représente le dendrogramme des différentes souches de *L. reuteri* dont le génome a été séquencé, basé sur la distance génétique qui sépare les souches les unes des autres. Localisées sur des branches différentes de cet arbre, les trois souches utilisées représentent une partie de la diversité phylogénétique de *L. reuteri*. Le choix de ces souches a ainsi été réalisé afin de maximiser la probabilité d'observer des différences entre elles au niveau phénotypique.

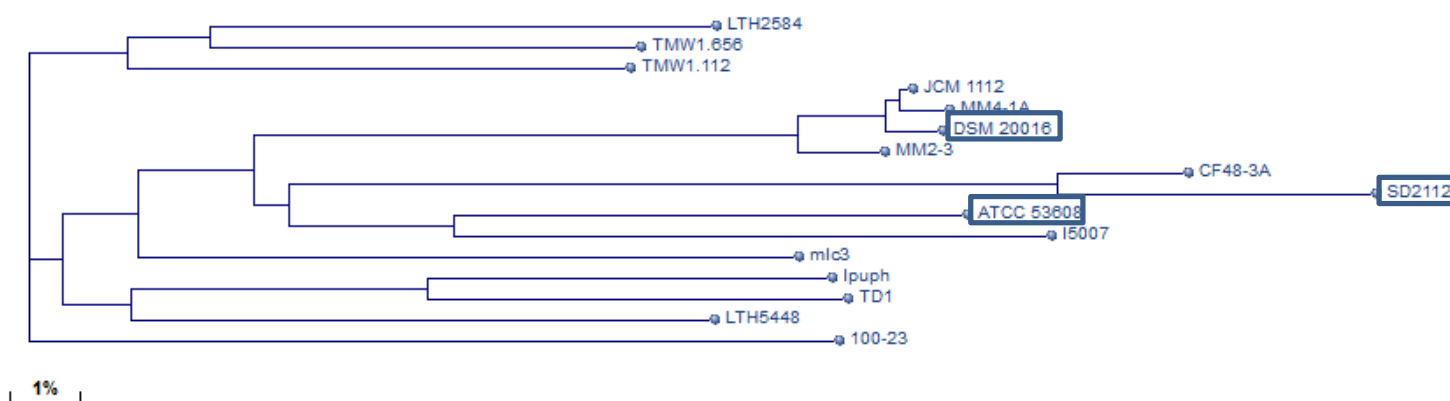


Figure II.1.1 : Dendrogramme des différentes souches de *L. reuteri* séquencées, construit sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et basé sur la distance génétique entre les souches.

Les séquences génomiques des souches de *L. reuteri* DSM 20016 (accession no. CP000705.1), ATCC 53608 (accession no. GCA_000236455.1) et ATCC 55730 (*i.e.* souche « mère » de la souche DSM 17938; accession no. CP002844.1) ont été obtenues sur GenBank²³. Toutes les prédictions de séquences nucléotidiques et peptidiques ont été réalisées en utilisant la base de données du NCBI²⁴. Les comparaisons entre séquences ont été effectuées grâce aux logiciels BLASTN²⁵ (séquences nucléotidiques) et BLASTP²⁶ (séquences peptidiques) avec toujours pour référence (arbitraire) la souche ATCC 55730.

1.1.2 Milieu de culture utilisé

Le milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe, 1960) est un milieu de culture riche, non défini et sélectif des *Lactobacillus*, utilisé notamment pour l'isolement et le dénombrement de ces bactéries. Le MRS utilisé dans cette étude (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), dont la composition est détaillée dans le Tableau II.1.1, est préparé en solubilisant 55,3 g de poudre dans 1 L d'eau osmosée.

Tableau II.1.1 : Composition du milieu MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) utilisé pour la croissance de *L. reuteri*

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
Glucose	20
Polypeptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Acétate de sodium	5
Phosphate dipotassique	2
Citrate d'ammonium	2
Tween 80	1,08
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
<i>pH à 25 °C</i>	<i>6,4 ± 0,2</i>

Ce milieu comprend tous les éléments nécessaires et indispensables à la croissance optimale des lactobacilles²⁷ :

²³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

²⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

²⁵ http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

²⁶ http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

²⁷ <https://www.biokar-diagnostics.fr>

- la peptone, le glucose, les extrait de viande et de levure, ainsi que les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des bactéries
- le Tween 80, agent tensioactif composé d'un mélange d'esters oléiques, est une source d'acides gras nécessaires à la synthèse des membranes cellulaires
- le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH au cours de la croissance
- le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium constituent les substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants tels que les streptocoques et les moisissures.

Une partie du glucose étant perdue lors de la stérilisation à l'autoclave (110 °C – 20 min) du fait des réactions de Maillard, des tests de supplémentation du milieu avec du glucose ont été réalisés. Les résultats ont montré la nécessité d'ajouter 20 g.L⁻¹ de glucose lors de la préparation du milieu afin d'éviter toute carence pendant la croissance.

1.2 Obtention de la biomasse

1.2.1 Protocole général de réalisation des cultures

Selon l'utilisation finale de la culture de *L. reuteri* (bioconversion en flacon Schott ou en bioréacteur), le protocole et la durée des étapes de culture permettant l'obtention de la biomasse diffèrent. La Figure II.1.3 résume l'ensemble des étapes, depuis le cryotube initial jusqu'à l'initiation de la bioconversion. Les différents volumes des milieux utilisés, leur composition, ainsi que les concentrations cellulaires (DO à 600 nm) initiales et finales et les durées de chacune de ces étapes sont indiqués.

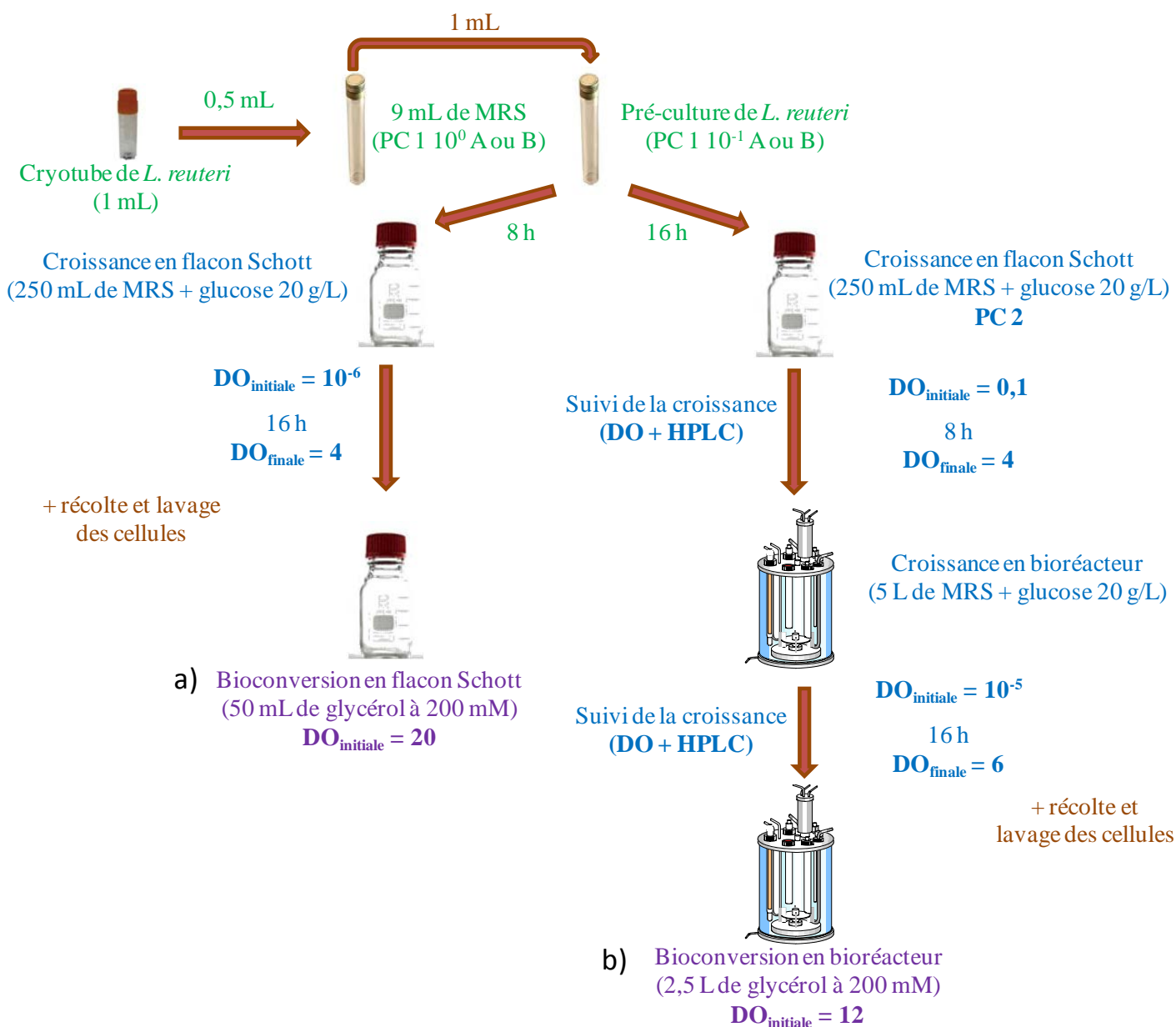


Figure II.1.2 : Schéma général des protocoles d'obtention de la biomasse pour : a) la réalisation d'une bioconversion en flacon Scott, b) la réalisation d'une bioconversion en bioréacteur.

1.2.2 Réalisation des pré-cultures

Un cryotube de 1 mL de la souche de *L. reuteri* sélectionnée pour l'étude, stocké à -80 °C, est décongelé. Le contenu de ce cryotube est réparti dans deux tubes à vis (favorisant l'anaérobiose) contenant chacun 9 mL de MRS (500 µL de cryotube dans chaque tube) et notés PC 1 10⁰ A et PC 1 10⁰ B (Figure II.1.2). Deux nouveaux tubes sont préparés par dilution au dixième à partir des tubes précédents (1 mL de PC 1 10⁰ A ou B dans 9 mL de MRS). Ces pré-cultures, notées PC 1 10⁻¹ A et PC 1 10⁻¹ B, sont ensuite placées à l'étuve à 37 °C durant 8 ou 16 h (selon l'usage ultérieur de cette pré-culture).

Après incubation, la concentration cellulaire de ces pré-cultures est déterminée par mesure de la densité optique (DO) au spectrophotomètre (Biochrom, Berlin, Allemagne) à 600 nm (notée $DO_{\text{finale PC1}}$). Un prélèvement de chaque pré-culture est également observé au microscope afin de vérifier l'absence de contamination.

1.2.3 Croissances en flacons Schott

1.2.3.1 Evaluation de la cinétique et du rendement de croissance

Les cultures, correspondant à 250 mL (V_{fiolle}) de MRS supplémenté avec 20 g.L⁻¹ de glucose (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), sontensemencées à une densité optique initiale (DO_{C1}) de 0,1 (environ 10⁸ cellules/mL). On procède au calcul suivant pour déterminer le volume de pré-culture (V_{PC1}) à introduire dans chaque flacon Schott de culture :

$$DO_{\text{finale PC1}} \times V_{PC1} = DO_{C1} \times V_{C1} \quad \text{avec } V_{C1} = V_{\text{fiolle}} + V_{PC1}$$

$$\Rightarrow DO_{\text{finale PC1}} \times V_{PC1} = DO_{C1} \times (V_{\text{fiolle}} + V_{PC1}) = DO_{C1} \times V_{\text{fiolle}} + DO_{C1} \times V_{PC1}$$

$$\Rightarrow V_{PC1} = (DO_{C1} \times V_{\text{fiolle}}) / (DO_{\text{finale PC1}} - DO_{C1})$$

Si le volume de milieu de culture est de 250 mL et la DO d'ensemencement de 0,1, on a :

$$\Rightarrow V_{PC1} = 25 / (DO_{\text{finale PC1}} - 0,1)$$

Après avoir étéensemencées (Figure II.1.3 a), les cultures sont placées à 37 °C. La croissance bactérienne est suivie par prélèvements réguliers (une fois par heure) de 900 µL, pour la mesure de la DO à 600 nm et l'observation microscopique, et de 900 µL ajoutés à 900 µL de d'acide trichloro-acétique (TCA) en vue des dosages par HPLC. Les courbes de croissance obtenues permettent d'extraire différents descripteurs, tels que la durée de la phase de latence (h), le taux de croissance maximal (h⁻¹) et la concentration cellulaire maximale en UFC.mL⁻¹ (par corrélation avec la DO, cf. partie 1.4.1). Les cinétiques de consommation du glucose et de production des métabolites permettent de déterminer les rendements de croissance et de production, ainsi que les productivités en métabolites. L'ensemble de ces résultats permettra de comparer les performances des différentes souches mises en œuvre.

1.2.3.2 Production de biomasse pour la bioconversion en flacons Schott

De manière à ce que les bactéries utilisées pour la bioconversion soient dans un état physiologique optimal, elles doivent être récoltées en début de phase stationnaire de croissance (Lüthi-Peng *et al.* 2002a). Or, pour suivre la bioconversion sur la journée en l'inoculant avec des cellules récoltées en début de phase stationnaire, la culture préalable

devra s'être déroulée pendant la nuit précédente. Du fait de la durée de cette culture (~ 16 h), il s'avère nécessaire de provoquer une phase de latence très longue au début de la croissance bactérienne. Pour cela, la culture est inoculée à une DO très faible ($0,1 \cdot 10^{-5}$, non mesurable), en effectuant une série de 5 dilutions au 1/10 de la pré-culture, puis en ajoutant dans le flacon Schott (250 mL de MRS additionné de glucose) le volume V_{PC1} calculé pour une inoculation à $DO_{initiale} = 0,1$ (Figure II.1.3 b). La pré-culture aura quant à elle été effectuée la journée précédente (durée ~ 8 h ; Figure II.1.2).

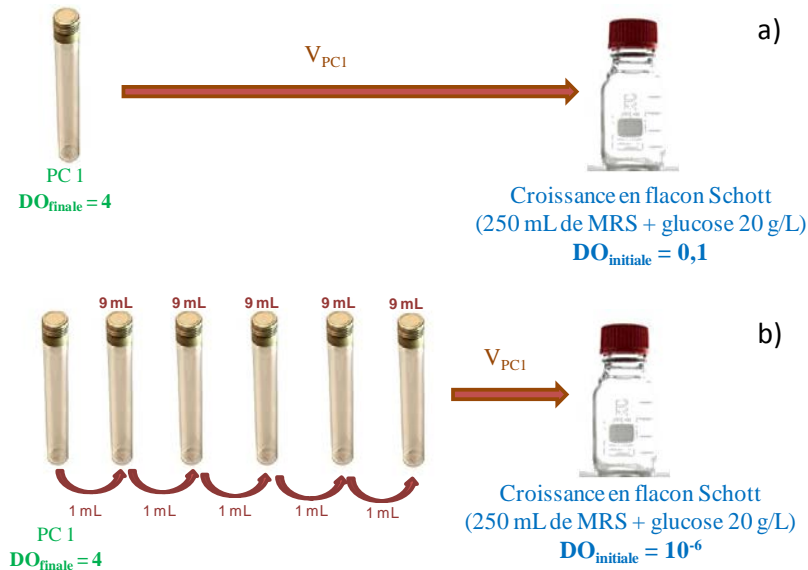


Figure II.1.3 : Protocoles d'inoculation des cultures pour : a) une croissance de 8 h (i.e. une journée) permettant un suivi de croissance ou la réalisation ultérieure d'une seconde phase de croissance en bioréacteur, et b) une croissance de 16 h (i.e. une nuit) permettant la récolte des bactéries et l'inoculation d'une bioconversion en flacons Schott (pour un suivi sur la journée).

1.2.4 Croissances en bioréacteur

1.2.4.1 Équipements utilisés et paramètres contrôlés

Les croissances sont réalisées dans un bioréacteur de 7 L (Sétric Génie Industriel, Toulouse, France ; Figure II.1.4) avec un volume utile de 5 L. Le bioréacteur est équipé d'un moteur d'agitation tournant à 100 rpm et de sondes mesurant la température et le pH (Mettler Toledo, Bussigny, Suisse), reliées à un ordinateur comprenant un logiciel d'acquisition de données (WCidus, INRA, Grignon, France). Au cours de la croissance, la température est régulée à 37 ± 1 °C (température optimale de croissance de *L. reuteri*). Le pH est contrôlé à pH 6,0 par ajout automatique d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 10 N) à l'aide d'une pompe péristaltique PPV (Sétric Génie Industriel, Toulouse, France). Les paramètres

contrôlés, ainsi que la masse de KOH apportée sont mesurés tout au long des croissances. Le protocole de préparation et d'utilisation du bioréacteur Sétric est présenté en Annexe 6.

Pour chaque expérimentation, deux stérilisations sont réalisées. Le bioréacteur est d'abord autoclavé à vide (120 °C, 20 min) afin d'assurer une décontamination de la cuve et de la platine. Il est ensuite autoclavé à nouveau (110 °C, 20 min), après avoir été rempli avec le milieu de culture (5 L de MRS supplémenté avec 20 g.L⁻¹ de glucose).

La cinétique de consommation de KOH permet de suivre en temps réel le déroulement des cultures et de comparer les croissances pour évaluer leur reproductibilité. L'arrêt de l'ajout de KOH (corrélé à l'arrêt de la production d'acide lactique par les bactéries et juste postérieur à l'entrée en phase stationnaire de croissance) constitue un indicateur du moment propice à la récolte des cellules. L'établissement de la phase stationnaire sera confirmé par deux mesures successives de la DO à 600 nm à 30 minutes d'intervalle.



Figure II.1.4 : Photographie du bioréacteur Sétric (Sétric Génie Industriel, Toulouse, France)

1.2.4.2 Inoculation du bioréacteur

Le bioréacteur estensemencé avec des bactéries issues d'une culture réalisée en flacon Schott (croissance sur une journée soient 8 h ; Figure II.1.2 b). Cette dernière correspond alors à la seconde pré-culture (notée PC 2). A l'issue des 8 heures de croissance à 37 °C, la concentration cellulaire de la PC 2 est déterminée par mesure de la densité optique à 600 nm ($DO_{finale\ PC\ 2}$). Pour la même raison qu'évoqué précédemment (partie 1.2.3.2), l'ensemencement du bioréacteur est réalisé de manière à atteindre une DO initiale égale à 10^{-5} (non mesurable). Pour cela, 4 dilutions en cascade au 1/10 sont réalisées dans des flacons Schott de 225 mL de MRS supplémenté. Le volume $V_{PC\ 2}$ calculé selon le principe décrit précédemment est ensuite prélevé dans le dernier flacon Schott puis injecté dans le bioréacteur (Figure II.1.5).

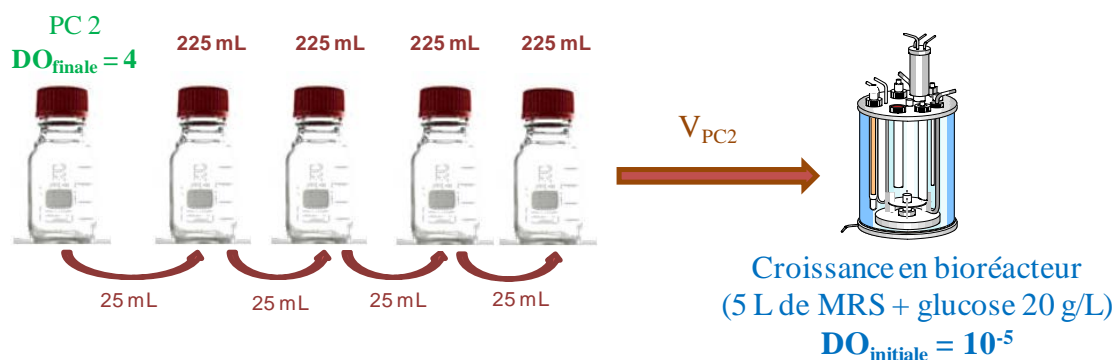


Figure II.1.5 : Protocole de lancement de la croissance en bioréacteur

1.3 Bioconversion du glycérol par *L. reuteri*

1.3.1 Protocole général de réalisation des bioconversions

Selon que la bioconversion est réalisée en flacon Schott ou en bioréacteur, le protocole et le nombre d'étapes de croissance permettant l'obtention de la biomasse varient. Le protocole général de réalisation des cultures préalables au lancement des bioconversions a été développé dans la Figure II.1.2.

1.3.2 Récolte et lavage des bactéries

Après la croissance, les bactéries sont récoltées pour réaliser la bioconversion. Des lavages sont nécessaires pour éliminer le milieu de culture et les métabolites formés au cours de la croissance (lactate et éthanol principalement) et le glucose non consommé. Deux lavages successifs au tampon « potassium phosphate buffer » (PPB) sont ainsi effectués. Au cours de cette étape, les bactéries sont également concentrées afin de disposer d'une concentration suffisante pour la bioconversion. Les protocoles de récolte et de lavages selon que la bioconversion est lancée en flacon Schott ou en bioréacteur sont décrits dans la Figure II.1.6.

Afin de préparer 1 L de tampon PPB à 0,1 M et pH 6,4, 72,2 mL de KH_2PO_4 1 M (dihydrogénophosphate de potassium, 178,18 g dans 1 L d'eau osmosée) sont mélangés à 27,8 mL de K_2HPO_4 1 M (hydrogénophosphate de di-potassium, 136,09 g dans 1 L d'eau osmosée) et 900 mL d'eau osmosée. Le pH de la solution tampon est alors mesuré afin de vérifier la valeur de consigne de 6,4.

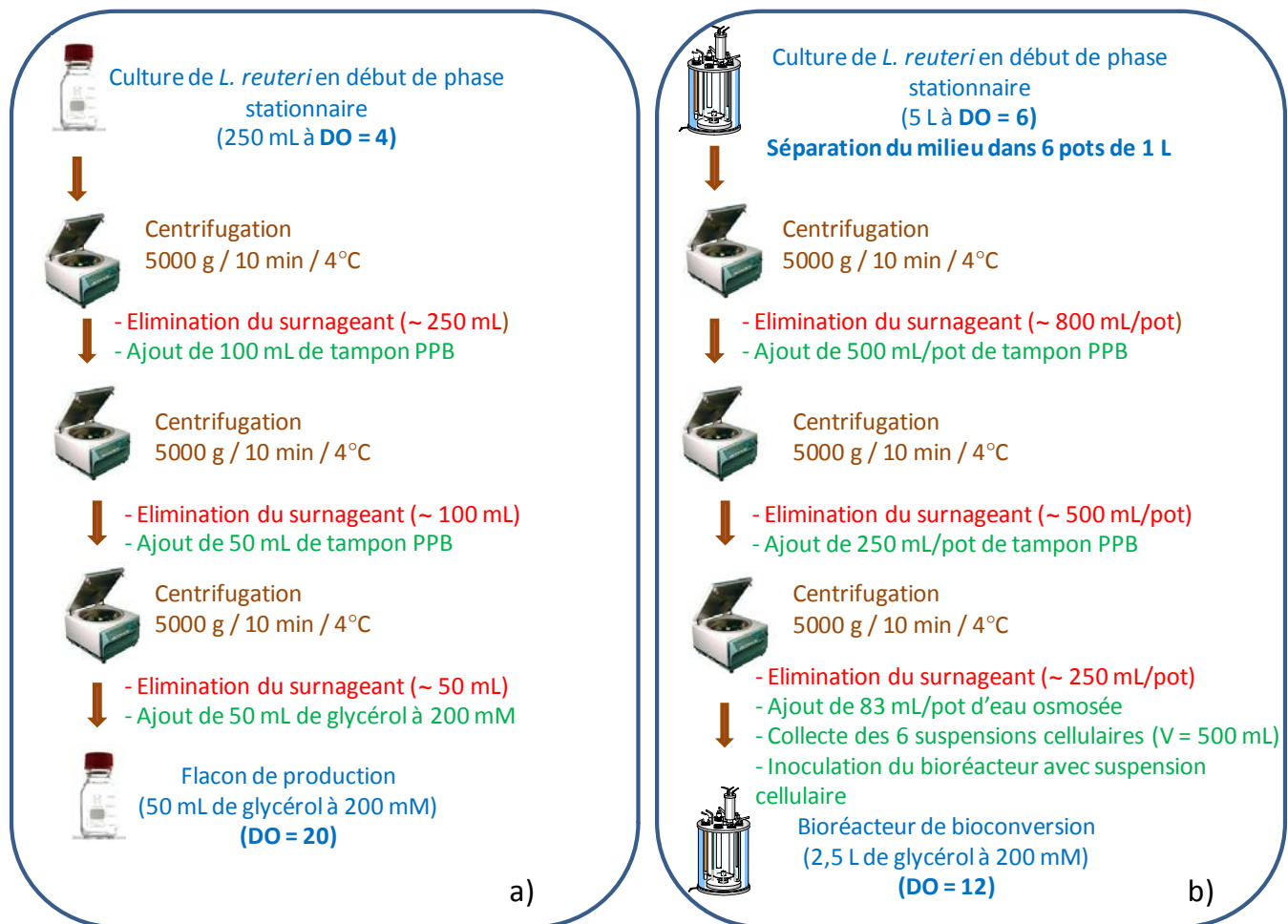


Figure II.1.6 : Protocoles de récolte et lavages préalables à la bioconversion a) en flacon Schott, b) en bioréacteur.

1.3.3 Bioconversion en mode « batch »

1.3.3.1 Bioconversions en flacon Schott

Suite à la troisième centrifugation (Figure II.1.6 a), le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu de production (50 mL de glycérol à 200 mM dans de l'eau osmosée) à une DO initiale à 600 nm de 20 (environ $1,2 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹). Les flacons de production sont placés à l'étuve à 37 °C sans agitation et un suivi de la bioconversion est réalisé par des prélèvements réguliers toutes les heures durant 5 h (mesure de la DO à 600 nm, observations microscopiques, dénombrement sur milieu MRS gélosé, analyse de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux, dosages des composants du milieu par HPLC). En parallèle de cette production sur glycérol, des flacons « témoins » (contenant des bactéries en suspension dans de l'eau osmosée sans glycérol) sont incubés dans les mêmes conditions et suivis de manière similaire.

1.3.3.2 Bioconversions en bioréacteur

1.3.3.2.1 Équipements utilisés et mesures réalisées

Les bioconversions en mode « batch » sont réalisées dans un bioréacteur Biostat® A plus de 3 L (Sartorius Stedim, Aubagne, France ; Figure II.1.7) de volume utile égal à 2,5 L. Le bioréacteur est équipé d'un moteur d'agitation tournant à une vitesse de 100 rpm et de sondes mesurant la température et le pH (Easyferm K8 325, Hamilton, Bonaduz, Suisse), reliées à un ordinateur équipé d'un logiciel de suivi et de contrôle en ligne (MFCS/DA, Sartorius Stedim) et d'un logiciel d'acquisition de données (WCidus, INRA, Grignon, France). Au cours de la bioconversion, la température est régulée à 37 ± 1 °C grâce à un manteau chauffant placé autour de la cuve et à une circulation d'eau froide dans une gaine en acier inoxydable plongeant dans le milieu. Le pH est régulé à pH 3, 4, 5 ou 6 par ajout automatique de solutions d'hydroxyde de potassium (KOH 10 N) et d'acide chlorhydrique (HCl 5 N) à l'aide de pompes péristaltiques. Les paramètres contrôlés (vitesse d'agitation, température, pH), ainsi que les masses de base et d'acide apportées dans le bioréacteur sont mesurés tout au long des bioconversions. Le protocole de préparation et d'utilisation du bioréacteur Sartorius est présenté en Annexe 7.

Au préalable, deux stérilisations sont réalisées : une première à vide (120 °C, 20 min), puis une seconde (110 °C, 20 min) après avoir rempli le bioréacteur avec le milieu de bioconversion (2 L d'eau osmosée supplémentée avec 45,5 g de glycérol, de manière à atteindre une concentration de 200 mM suite à l'inoculation avec les bactéries).



Figure II.1.7 : Photographie du fermenteur Biostat® A plus (Sartorius Stedim, Aubagne, France)

1.3.3.2.2 Mise en œuvre des bioconversions

La bioconversion du glycérol débute au moment de l'ajout des 500 mL de suspension cellulaire lavée de *L. reuteri* DSM 17938 (DO initiale à 600 nm égale à 12, soit environ $1,2 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹). La concentration initiale en glycérol est alors de 18,2 g.L⁻¹ (200 mM).

L'avancement de la bioconversion est suivi par la mesure en ligne du débit de KOH (et éventuellement de HCl) utilisé pour maintenir le pH constant. L'arrêt de l'ajout de KOH, corrélé à l'arrêt de la production de 3-HP par les bactéries, permettra de déterminer la fin de la bioconversion. Des mesures de DO à 600 nm sont effectuées toutes les heures afin de vérifier que celle-ci n'évolue pas (pas de croissance possible de *L. reuteri* sur glycérol). Comme dans le cas du suivi de la bioconversion en flacon Schott, des observations microscopiques, analyses de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux et dosages des composants du milieu par HPLC sont effectués.

1.3.4 Bioconversion en mode discontinu alimenté (mode « fed-batch »)

1.3.4.1 Équipements utilisés et suivi des bioconversions

Les bioconversions en mode « fed-batch » sont réalisées dans un bioréacteur Biolafitte Tryton_i de 2 L (Pierre Gérin Technologies – Biolafitte, Mauze, France) avec un volume utile de 1,5 L (Figure II.1.8). Les logiciels de contrôle et d'acquisition des données en ligne sont les mêmes que ceux utilisés avec le bioréacteur Sartorius. Au cours de la bioconversion, la vitesse d'agitation est fixée à 250 rpm, la température est régulée à 37 ± 1 °C par circulation d'eau dans la double enveloppe du bioréacteur, et le pH est fixé à 5 par ajout automatique de solutions d'hydroxyde de potassium (KOH 10 N) et d'acide chlorhydrique (HCl 5 N) à l'aide de pompes péristaltiques.

Avant chaque expérimentation, le bioréacteur est autoclavé à vide (120 °C, 20 min), puis à plein (110 °C, 20 min) une fois rempli avec 500 mL d'eau osmosée.



Figure II.1.8 : Photographie du fermenteur Biolafitte Tryton_i (Pierre Gérin Technologies – Biolafitte, Mauze, France)

1.3.4.2 Réalisation d'une bioconversion avec apport contrôlé de glycérol (mode « fed-batch »)

La bioconversion démarre avec l'inoculation de *L. reuteri* DSM 17938 (500 mL de suspension cellulaire lavée) à une DO initiale à 600 nm de 24 (environ $2,4 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹) et la mise en route de la pompe d'ajout du substrat (B. Braun, Melsungen, Allemagne). Le bioréacteur est ainsi alimenté à un débit volumique de 96 mL.h⁻¹ avec des solutions de glycérol de concentration égale à 2,5, 5 ou 7 g.L⁻¹, ce qui correspond à des débits massiques de 0,25, 0,5 et 0,7 g_{glycérol}.h⁻¹, respectivement. Le déroulement des bioconversions est suivi grâce au logiciel WCidus, par la mesure en ligne du débit de KOH (et HCl) utilisé(s) pour maintenir le pH constant. Comme précédemment, l'arrêt de l'ajout de KOH dans le bioréacteur indique la fin de la bioconversion. Des mesures de DO à 600 nm, des observations microscopiques et un dosage des composants du milieu par HPLC sont également réalisés toutes les heures.

1.4 Analyses effectuées à l'échelle de la population bactérienne

1.4.1 Correspondances entre les différentes mesures de la concentration bactérienne

Afin d'accéder rapidement à un dénombrement des bactéries lors des suivis de croissance et de bioconversion, des corrélations entre la densité optique à 600 nm (DO) et la concentration cellulaire, exprimée en nombre de cellules.mL⁻¹, ou en gramme de masse sèche.L⁻¹ ou en UFC.mL⁻¹ ont été effectuées pour les trois souches étudiées. Les résultats sont indiqués dans le Tableau II.1.2.

Tableau II.1.2 : Résultats des corrélations entre densité optique (DO) à 600 nm et concentration cellulaire (exprimée en nombre de cellules.mL⁻¹, ou en g.L⁻¹ ou en UFC.mL⁻¹) pour le dénombrement des bactéries correspondant aux trois souches de *L. reuteri* utilisées dans cette étude.

	<i>L. reuteri</i> DSM 20016	<i>L. reuteri</i> DSM 17938	<i>L. reuteri</i> ATCC 53608
Nb cellules /mL = f(DO)	$2,76 \cdot 10^8$ DO	$3,15 \cdot 10^8$ DO	$2,93 \cdot 10^8$ DO
R ²	0,996	0,995	0,996
Masse sèche g/L = f(DO)	0,519 DO + 0,20	0,383 DO + 0,18	0,732 DO + 0,08
R ²	0,915	0,841	0,931
UFC/mL = f(DO)	$6,64 \cdot 10^8$ DO	$9,83 \cdot 10^8$ DO	$6,14 \cdot 10^8$ DO
R ²	0,977	0,999	0,998

1.4.2 Analyse de la cultivabilité cellulaire et détermination de la masse sèche

La concentration des suspensions bactériennes est traditionnellement déterminée par dénombrement des colonies sur milieu gélosé sélectif. Ces mesures sont réalisées en boîtes de Pétri, à chaque point d'analyse au cours de la fermentation ou de la bioconversion. Le milieu sélectif utilisé est du MRS gélosé préparé à partir d'un milieu MRS (Biokar Diagnostics, 55,3 g.L⁻¹) supplémenté d'agar (Biokar Diagnostics, 15 g.L⁻¹) dans de l'eau osmosée, et stérilisé 20 min à 120 °C. Les suspensions cellulaires sont diluées au dixième en série dans de l'eau physiologique (NaCl 150 mM, 9 g.L⁻¹), afin d'obtenir entre 30 et 300 colonies par boîte. Trois dilutions successives sont ensemencées en masse et les boîtes de Pétri sont ensuite incubées 48 h à 37 °C, sous atmosphère anaérobie (GENbox anaer, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Les résultats sont exprimés en unités formant colonies par unité de volume (UFC.mL⁻¹) et correspondent à la moyenne géométrique d'au moins trois dénombrements.

Afin de déterminer la masse sèche de biomasse, un volume de 10 mL de la culture de *L. reuteri* est prélevé et filtré sur une membrane de 0,22 µm de diamètre de pore (Sartorius, Goettingen, Allemagne). Puis, le filtre est séché à 80 °C pendant 24 h. La mesure de la masse initiale de la membrane et de sa masse après filtration et séchage permet de calculer la masse de biomasse sèche produite. La mesure est réalisée en triplicat et le résultat est exprimé en masse de biomasse sèche par volume de milieu de culture (g.L⁻¹).

1.4.3 Analyse de la cinétique d'acidification des milieux de croissance et de bioconversion

1.4.3.1 Principe et descripteurs de l'activité acidifiante

Le CinAc[®] est un système permettant le suivi en continu et en parallèle de l'acidification de plusieurs milieux par des micro-organismes acidifiants, comme les bactéries lactiques. Il a été mis au point au GMPA (Spinnler and Corrieu, 1989) et est aujourd'hui commercialisé par AMS (Frépillon, France). Les différentes sondes pH utilisées sont reliées à un micro-ordinateur permettant l'acquisition en ligne des données. Les mesures fournies par les sondes permettent d'étudier en temps réel les cinétiques d'acidification (vitesse maximale d'acidification, pH à un temps t, temps de latence...) et de caractériser les micro-organismes à l'aide de descripteurs déterminés à partir de ces cinétiques. Afin de quantifier l'activité acidifiante de bactéries lactiques, et donc la croissance (en lien avec la production d'acide lactique) ou la production de 3-HP lors de la bioconversion, une série de descripteurs est calculée et affichée en temps réel par le système CinAc[®] :

- V_m : vitesse maximale d'acidification (min^{-1})
- pH_m et t_m : pH et temps (en min) correspondant à la vitesse maximale d'acidification
- t_{pHi} : temps nécessaire pour atteindre un certain pHi (en min)

1.4.3.2 Dispositif expérimental

Le système CinAc[®] utilisé dans ce projet est constitué de quatre parties fonctionnelles (Figure II.1.9) :

- un bain thermostaté réglé à $\pm 0,05$ °C ;
- 30 sondes pH (Ingold, Paris, France) et 2 sondes de température (Prosensor, Armenvillers, France) ;
- une interface électronique constituée de quatre cartes. Une carte analogique, composée de 32 transmetteurs, assure la mise en forme du signal de chaque sonde (entre 0 et 10 V). Trois cartes numériques, de type OPTO 22 (Tekelec Airtronic, Sèvres, France), permettent la conversion numérique/analogique, la gestion des actionneurs pour la régulation de la température, la communication entre l'ordinateur et les autres cartes ;
- un ordinateur relié à l'interface et fonctionnant avec le logiciel d'exploitation WCinac, qui détermine la cinétique d'acidification en temps réel.

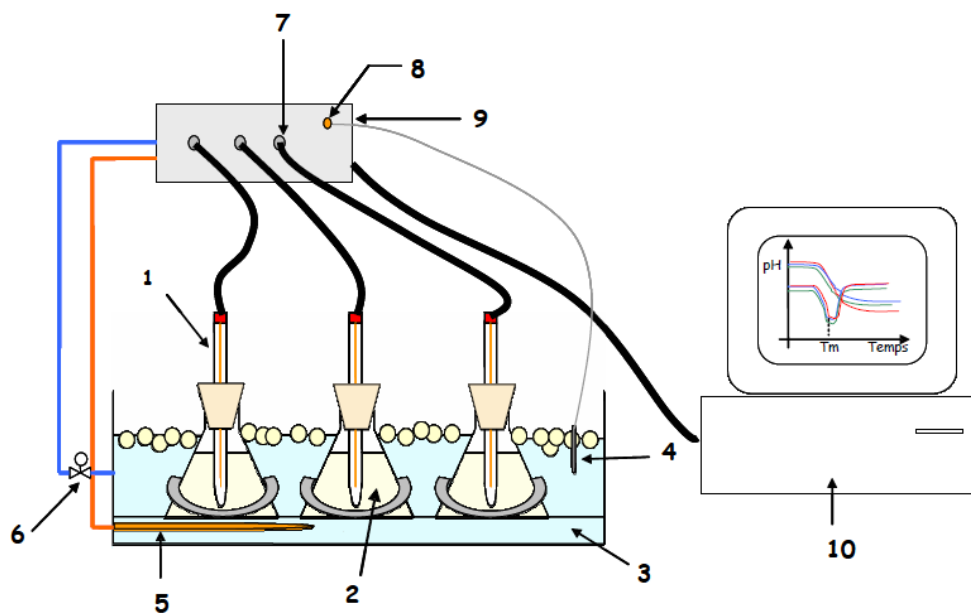


Figure II.1.9 : Schéma simplifié du dispositif CinAc[®] : 1, électrode de pH ; 2, fiole contenant le milieu de croissance ou de bioconversion ; 3, bain-marie thermostaté ; 4, sonde de température ; 5, résistance chauffante ; 6, électrovanne d'admission d'eau froide ; 7, transmetteur de pH ; 8, transmetteur de température ; 9, interface électronique ; 10, ordinateur. D'après Wang (2005).

Le logiciel WCinac effectue simultanément, sur toutes les voies, l'étalonnage des sondes pH en deux points, l'acquisition et le stockage des données de pH selon une période prédéfinie, la régulation de la température du bain thermostaté, le calcul en temps réel de la vitesse d'acidification (dpH/dt) et des descripteurs, ainsi que les représentations graphiques sur écran ($pH = f(t)$, vitesse acidification = $f(t)$ et vitesse acidification = $f(pH)$). Il réalise aussi la conversion des données sous des formats compatibles avec d'autres logiciels (Excel par exemple).

1.4.3.3 Protocole de mesure

Le milieu utilisé pour la mesure de l'activité acidifiante de *L. reuteri* lors de sa croissance ou de la bioconversion du glycérol est composé respectivement de MRS ou de glycérol (18 g.L⁻¹ dans de l'eau osmosée). Le milieu est réparti en fioles de 150 mL, stérilisées pendant 20 min à 110 °C, puis stockées à 4 °C jusqu'à leur utilisation, au plus tard 72 h après la stérilisation. 30 min avant utilisation, chaque fiole est placée dans le bain-marie thermostaté du système CinAc[®] pour une mise à la température d'incubation (37 °C). Après ensemencement des fioles dans le bain-marie thermostaté à 37 °C, l'acquisition des données de pH est réalisée en continu toutes les 3 min, pendant environ 24 h et permet de déterminer la valeur des différents descripteurs explicités précédemment et utilisés dans cette étude. Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs obtenues pour les trois répétitions.

1.4.4 Étude de l'impact du 3-HP sur la croissance de *L. reuteri*

Un lecteur de microplaques Bioscreen (Labsystems, Cergy-Pontoise, France) est utilisé pour évaluer la capacité de croissance des bactéries en milieu MRS frais en présence de 3-HP. Cette méthode consiste à suivre la croissance cellulaire, par mesure de la DO, pour plusieurs échantillons en parallèle, déposés dans les puits d'une microplaque, elle-même placée dans une enceinte thermostatée. Les résultats obtenus sont des courbes de croissance dont on peut extraire différents descripteurs, tels que la durée de la phase de latence, le taux de croissance maximal et la valeur de DO maximum, que l'on comparera en fonction des conditions expérimentales pour étudier l'impact de la présence du 3-HP sur la capacité de *L. reuteri* à croître en milieu liquide.

1.4.4.1 Système expérimental

Le lecteur de microplaques Bioscreen est composé de quatre parties distinctes (Figure II.1.10) :

- un incubateur contenant un plateau prévu pour deux microplaques stériles de 10x10 micro-puits. La température d'incubation est régulée grâce à la circulation d'un liquide caloporteur (Heat transfert fluid, Labsystems) ;
- un système d'agitation intégré ;
- un lecteur de DO, composé de 8 filtres de 405 nm à 600 nm permettant la mesure en ligne de la turbidité de chaque puits à des longueurs d'onde spécifiques et à des intervalles de temps prédéfinis ;
- un système informatique muni d'un logiciel d'analyse (Biolink, Labsystems) qui permet la visualisation en temps réel des courbes de croissance ainsi que l'exportation des données.

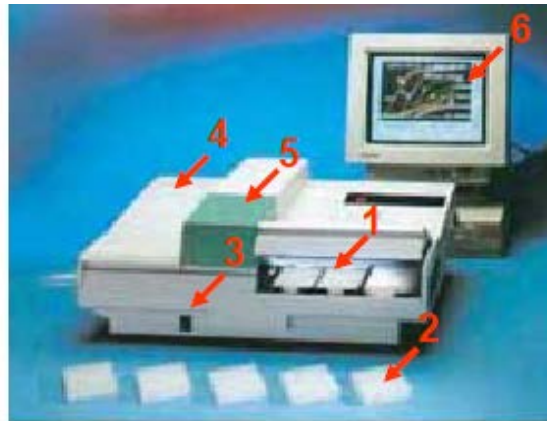


Figure II.1.10 : Système Bioscreen utilisé pour la mesure de la reprise de croissance de *L. reuteri* : 1, incubateur microbiologique contenant un plateau prévu pour deux microplaques ; 2, microplaques stériles de 10x10 micro-puits ; 3, fenêtre d'injection du fluide caloporteur pour la régulation de la température ; 4, emplacement de la lampe halogène et des filtres de longueurs d'onde ; 5, cellule de mesure de la turbidimétrie ; 6, système informatique et logiciel d'analyse Biolink.

1.4.4.2 Protocole de mesure

Les mesures de densité optique sont réalisées dans les micro-puits, dans lesquels sont introduites les suspensions cellulaires à tester (volume total par puits = 400 μ L). Un couvercle permet d'éviter toute évaporation. L'ensemble est incubé à 37 °C pendant 48 h. La densité optique à 600 nm est mesurée toutes les 15 min, après une agitation de 30 s, et enregistrée par le logiciel Biolink (Labsystems). Au minimum deux répétitions sont réalisées pour chaque échantillon.

1.4.4.3 Stress appliqué : protocole et plans de plaques

A l'issue d'une pré-culture (réalisée comme exposé dans le paragraphe II.1.2.1), des cellules de *L. reuteri* sont mises en croissance en micro-plaque sur milieu MRS supplémenté en glucose, à des DO d'ensemencement comprises entre 10^{-1} et 10^{-10} . Afin d'étudier l'impact de la présence de 3-HP sur la capacité des bactéries à croître, une solution de 3-HP est ajoutée dans le milieu de culture après ensemencement des bactéries. Quatre concentrations (0,1, 0,5, 1 et 5 g.L⁻¹) ont été choisies dans la gamme de concentration attendue lors de la bioconversion du glycérol et testées dans le cadre de cette étude. Le plan de plaque réalisé dans le cas de la souche DSM 17938 ainsi que le protocole de dilution opéré sont détaillés sur la Figure II.1.11. Des plans de plaque similaires ont été réalisés pour l'étude de l'impact du 3-HP sur les deux autres souches.

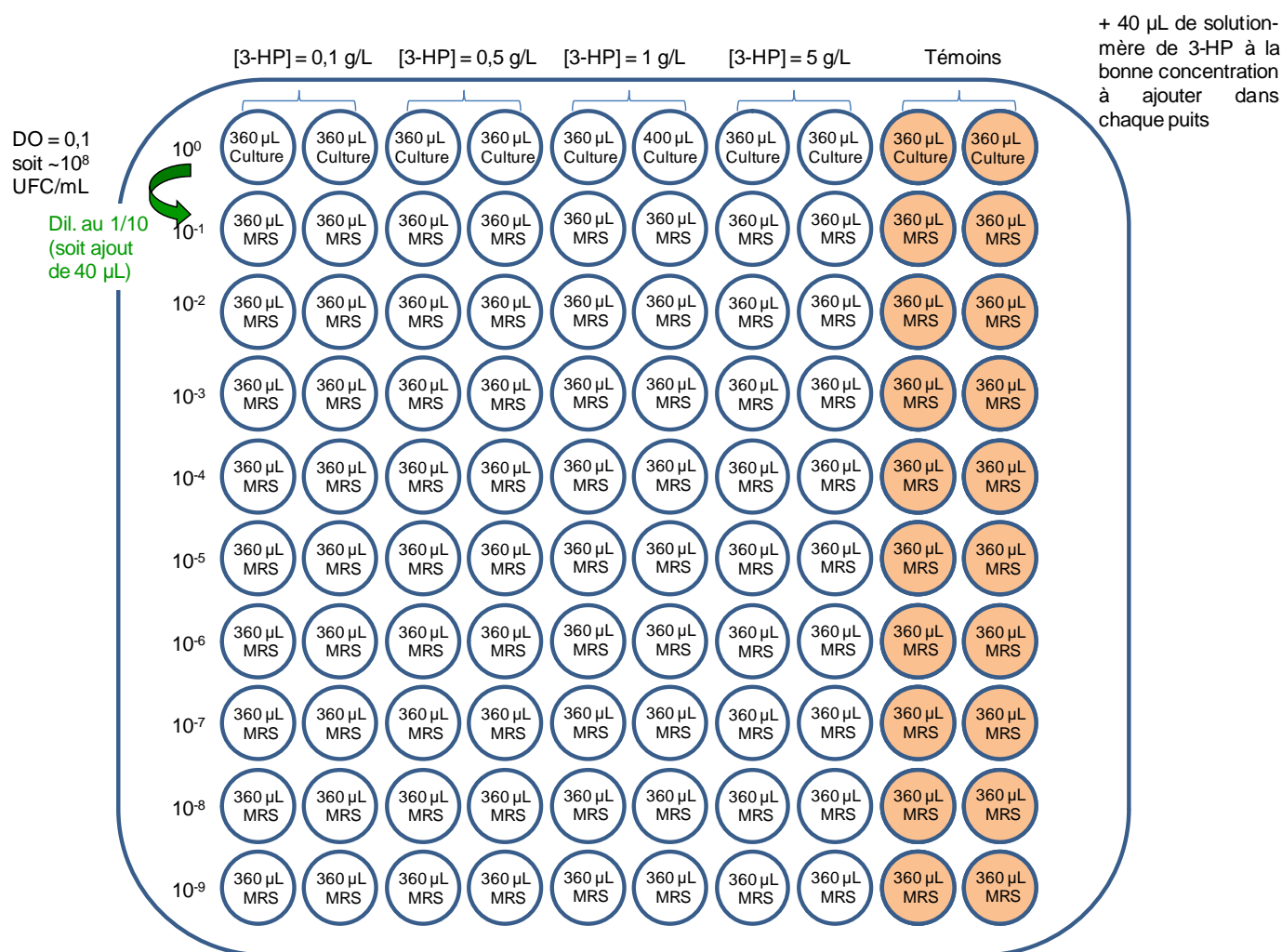


Figure II.1.11 : Plan de plaque utilisé pour le test de toxicité du 3-HP au cours de la croissance de *L. reuteri* sur milieu MRS supplémenté en glucose.

1.4.5 Analyse et dosage des constituants des milieux de croissance et de bioconversion

1.4.5.1 Identification de la nature des constituants du milieu par GC-MS

La chromatographie en phase gazeuse (GC) permet de séparer des mélanges de composés volatiles ou susceptibles d'être vaporisés, par suite d'équilibres entre une phase gazeuse mobile et une phase stationnaire. Le schéma d'ensemble d'un chromatographe en phase gazeuse est donné sur la Figure II.1.12.

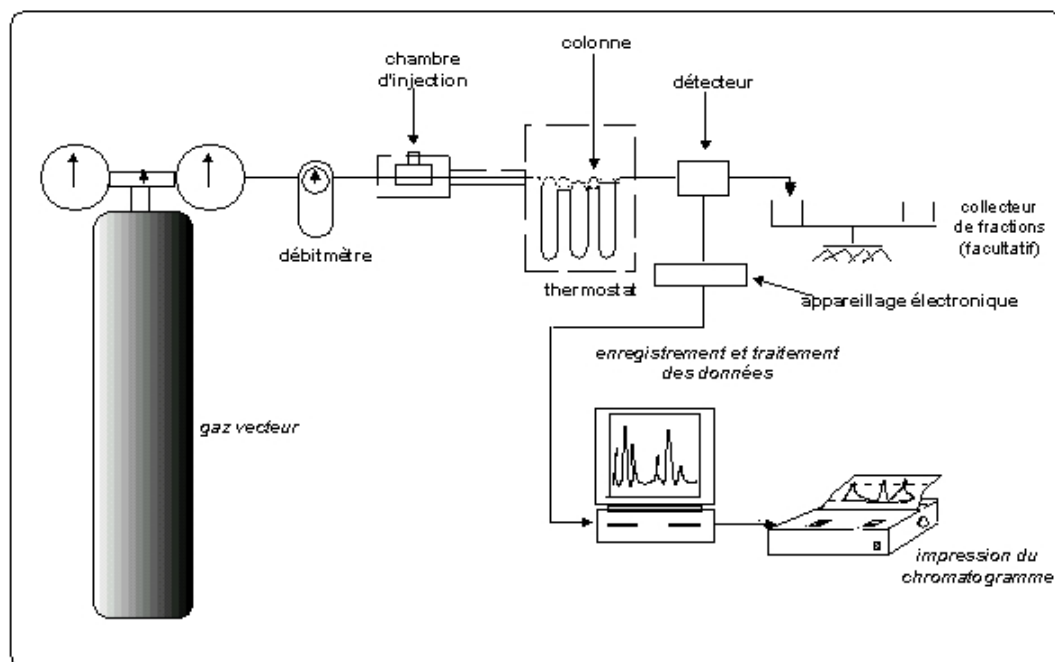


Figure II.1.12 : Schéma d'ensemble d'un chromatographe en phase gazeuse (GC)²⁸

1.4.5.1.1 Système expérimental

Le chromatographe en phase gazeuse (Saturne 2000, Varian/Agilent Technologies, Les Ulis, France) se compose de trois parties : la chambre d'injection et vaporisation, la colonne et le détecteur. 1 μ L de l'échantillon est d'abord introduit avec une micro-seringue dans la chambre de vaporisation où il est porté à l'état de vapeur puis amené dans le flux gazeux en tête de colonne. Celle-ci (colonne polydiméthylsiloxane « SPB1 », 30 m x 0,25 mm, Agilent Technologies), placée dans une enceinte thermostatée, se présente sous la forme d'un tube capillaire de silice, enroulé sur lui-même. Entraînés par un gaz vecteur inerte (de l'hélium),

²⁸ <http://www.lrmh.fr/lrmh/html/principechromato.htm> (consulté en août 2015)

les analytes sont séparés en fonction de leur capacité d'interaction avec la phase stationnaire greffée sur la silice ($e = 0,25 \mu\text{m}$). L'analyse dure 60 min pendant lesquelles la température est augmentée par palier ($40 \text{ }^\circ\text{C}/1 \text{ min}$, $80^\circ\text{C}/1,33 \text{ min}$, $260 \text{ }^\circ\text{C}/57,66 \text{ min}$). Le spectromètre de masse (MS pour « mass spectrometer ») permet ensuite la détection et l'identification de chaque composé en sortie de colonne.

En sortie de colonne chromatographique, les analytes pénètrent dans la chambre d'ionisation après avoir été séparés. Un bombardement électronique provoque alors une ionisation et une fracture plus ou moins importante des molécules. Les ions formés dans la source sont ensuite accélérés et focalisés par une électrode chargée positivement vers l'analyseur : le quadripôle. L'étude de la trajectoire suivie par chaque ion permet de déterminer son rapport « masse sur charge » (m/z). Seuls les ions qui ont une trajectoire stable vont pouvoir traverser le quadripôle (qui balaye les m/z de 50 à 500) et arriver au détecteur, les autres étant éjectés. Le détecteur recueille alors ces ions séparés par l'analyseur en fonction de leur rapport m/z . Enfin, un ordinateur va assurer le traitement des données et fournir un spectre de masse permettant l'identification de chaque molécule composant le mélange injecté, préalablement séparée par chromatographie.

1.4.5.1.2 Préparation des échantillons

Dans une première étape, les molécules à analyser sont dérivatisées à l'aide de N-O-bis-triméthylsilylène-trifluoroacétamide (BSTFA, réactif de dérivatisation ou silylation), pour obtenir des esters triméthylsilylés volatils (TMS). Une étape d'extraction préalable peut être nécessaire, lorsque la ou les molécules d'intérêt se trouvent en phase aqueuse. Cette étape permet également de concentrer les échantillons afin de s'assurer d'être au dessus du seuil de détection. Dans une seconde étape, ces esters triméthylsilylés sont analysés par GC-MS.

Dans le cas des solutions commerciales pures (glycérol, 1,3-PDO), les échantillons sont préparés directement à une concentration de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans une solution de dichlorométhane pestipur (CH_2Cl_2 , Sigma-Aldrich, Lyon, France). Ils sont ensuite aliquotés puis séchés sur du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4 , Sigma-Aldrich, Lyon, France). Une fois secs, $5 \mu\text{L}$ de ces échantillons sont placés dans des vials contenant $5 \mu\text{L}$ de pyridine (Sigma-Aldrich, Lyon, France) et $50 \mu\text{L}$ de BSTFA (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Le volume d'injection de ce mélange dans la colonne est de $1 \mu\text{L}$. La quantité d'échantillon injectée est donc de l'ordre de 200 ng. Il en va de même dans le cas du 3-HPA synthétisé par voie chimique.

Dans le cas de la solution commerciale de 3-HP (TCI-Europe, Zwyndrecht, Belgique; 3,6 M à 30 % dans l'eau) et du mélange issu de l'étape de bioconversion, l'environnement étant aqueux, il est nécessaire d'extraire les composés d'intérêt (glycérol, 1,3-PDO, 3-HPA, 3-HP). De plus, étant donnée la faible concentration des produits issus de la bioconversion du glycérol par *L. reuteri*, il convient également de concentrer ces molécules. La Figure II.1.13 résume ces deux étapes.

L'extraction est réalisée à pH acide (ajout de quelques gouttes d'HCl 6 N de façon à obtenir un pH inférieur au pKa de la molécule à extraire), par ajout de 20 mL de dichlorométhane dans 2 mL de solution commerciale de 3-HP ; ou de 30 mL dans 30 mL de mélange issu de la bioconversion. La phase organique, contenant les molécules d'intérêt et plus dense que la phase aqueuse, est récupérée (Figure II.1.13). La phase aqueuse est alors lavée deux fois au dichlorométhane, par ajout successif de deux fois 20 mL dans le cas de la solution de 3-HP et deux fois 30 mL dans le cas du milieu de bioconversion, et les phases organiques sont à nouveau collectées.

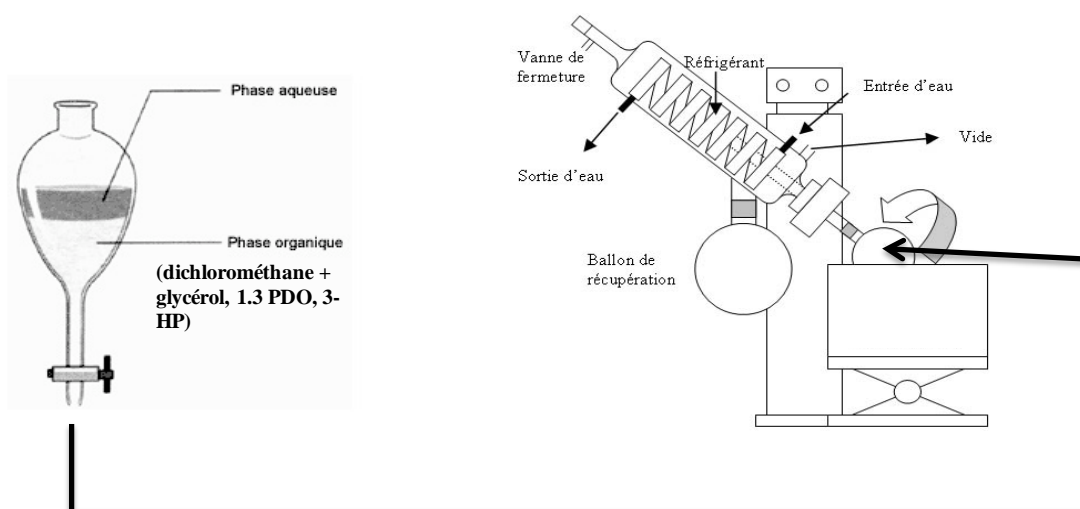


Figure II.1.13 : Schéma de synthèse des phases d'extraction et de concentration des produits de la bioconversion avant injection en GC-MS

Pour évaporer et concentrer le solvant, un évaporateur rotatif est utilisé (Figure II.1.13) afin d'éliminer rapidement le dichlorométhane par évaporation. Le principe est basé sur l'abaissement du point d'ébullition du solvant volatil avec la pression. Cette étape est effectuée à 40 °C, le ballon contenant la phase organique étant en rotation à 700 rpm.

Une fois la totalité du solvant évaporé et chassé dans le ballon de récupération, le contenu de la phase organique restant dans le ballon est récupéré dans 1,8 mL de dichlorométhane. Ces échantillons sont ensuite aliquotés puis séchés sur du sulfate de sodium

anhydre. Lorsque les échantillons sont secs, 5 μL sont placés dans des vials contenant 5 μL de pyridine et 50 μL de BSTFA. 1 μL de ce mélange est ensuite injecté dans la colonne.

1.4.5.1.3 Analyse des résultats

Les résultats obtenus se présentent sous la forme de chromatogrammes sur lesquels chaque pic correspond à une molécule identifiable par son spectre de masse. Les spectres de masse de chacune des molécules de la voie de biosynthèse du 3-HP (à l'exception des molécules du système 3-HPA dont l'analyse et l'identification ont fait l'objet d'une publication détaillée ; cf. partie II.4) sont présentés Figure II.1.14.

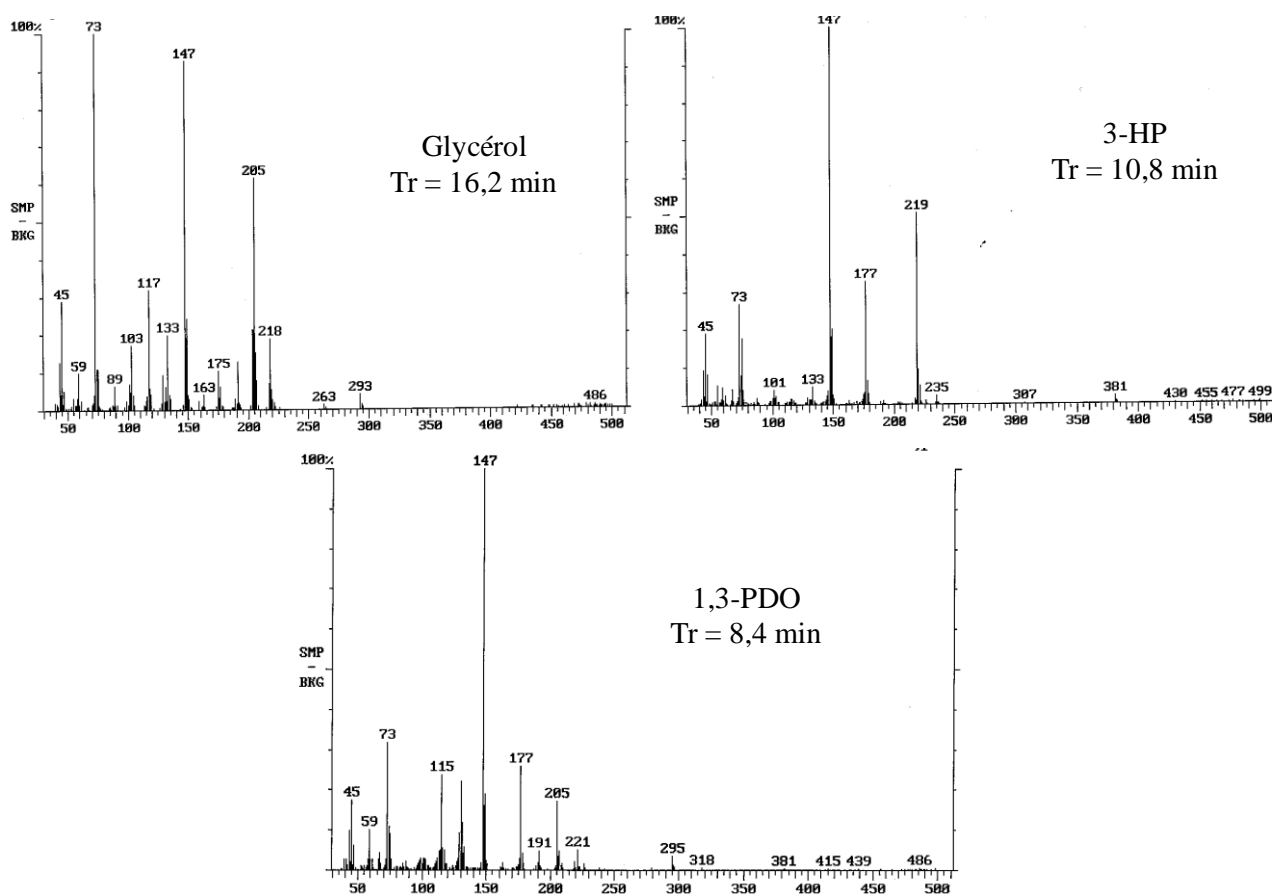


Figure II.1.14 : Spectres de masse des dérivés TMS du glycérol, du 3-HP et du 1,3-PDO, obtenus après analyses en GC-MS. Les temps de rétention sont indiqués pour chaque molécule.

1.4.5.2 Dosage des constituants du milieu par HPLC

1.4.5.2.1 Système expérimental

La chromatographie permet la séparation d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification, grâce à un étalonnage préalable avec le

composé pur. Le principe de cette analyse repose sur une séparation des composés en solution en fonction de leur affinité respective pour la phase mobile et la phase stationnaire. La colonne échangeuse de cations Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) permet l'analyse des carbohydrates, des acides carboxyliques, des acides gras à chaîne courte, des alcools, des cétones et de nombreux autres métabolites en solution. Elle est donc fréquemment utilisée pour les suivis de fermentation.

Pour effectuer le dosage, 20 µL d'échantillon sont injectés grâce à un injecteur automatique (Waters 717 plus, Molsheim, France) sur la colonne échangeuse de cations (Aminex Ion Exclusion HPX-87H 300x7,8 mm, Biorad, Richmond, USA), thermostatée à 50 °C dans un four. Le débit de la phase mobile (H₂SO₄, 0,005 M) est fixé à 0,6 mL/min (élution isocratique grâce à une pompe LC-6A, Shimadzu, Courtaboeuf, France). Les composés sont détectés par réfractométrie (RI : *Refractive Index*, Waters 410, Millipore) et UV à 210 nm (Ultra Violet, Waters 2489, Millipore).

1.4.5.2.2 Préparation des échantillons

Plusieurs étapes sont nécessaires pour préparer l'échantillon avant son injection (précipitation des composés protéiques, centrifugation, filtration et dilution). Ainsi, une fois prélevés, les échantillons sont dilués au demi dans de l'acide trichloroacétique (TCA 24 %, Prolabo, Paris, France) afin de précipiter les cellules, les débris cellulaires et les protéines. Après centrifugation à 13 000 g pendant 2 min, les surnageants sont filtrés sur nylon (0,22 µm, Millipore, Guyancourt, France) et conservés à 4 °C (7 jours au maximum). Avant analyse, les filtrats sont dilués dans de l'eau Milli-Q, pour atteindre des concentrations comprises entre les bornes inférieures et supérieures des gammes étalons de chaque composé.

Un étalon interne est utilisé afin de s'affranchir de l'éventuelle erreur sur le volume injecté et de la variation de la réponse du détecteur dans le temps. Le dosage par étalonnage interne repose sur l'ajout en quantité parfaitement connue et unique, dans toutes les solutions étalon et tous les échantillons, d'une molécule qui sert de référence durant les phases de l'analyse. Le dosage, plutôt que d'être réalisé de façon absolue à partir d'une droite d'étalonnage de l'analyte cible (étalonnage externe), se fait de façon relative par rapport à cette molécule de référence. Son temps de rétention doit donc être différent de celui des composés à doser pour que les pics soient bien distincts. L'acide propionique (1 % v/v) est utilisé comme étalon interne pour le dosage des métabolites de la croissance bactérienne

(glucose, acide lactique, acide acétique, éthanol). Dans le cas de la bioconversion (dosage du glycérol, du 3-HPA, du 3-HP et du 1,3-PDO), c'est l'acide citrique (10 g.L^{-1}) qui est employé.

Le glycérol, le 3-HPA et le 1,3-PDO sont analysés et dosés par le détecteur RI, le 3-HP par le détecteur UV à 210 nm. Comme le 3-HP et le glycérol présentent le même temps de rétention en RI dans nos conditions d'analyse, l'aire de la contribution du 3-HP au signal obtenu en RI est calculée à partir de sa concentration estimée en UV. Au pic correspondant au glycérol + 3-HP en RI, on retranchera alors la contribution du 3-HP pour calculer la concentration en glycérol. Préalablement à l'analyse des échantillons, une gamme d'étalonnage est réalisée pour chaque composé d'intérêt du milieu de croissance ou de bioconversion, en utilisant l'étalon interne adéquat. Pour chacun d'entre eux, on injecte une solution étalon (composé pur) de concentration connue, à laquelle on a ajouté l'étalon interne. On calcule ensuite le rapport entre l'aire du pic correspondant au composé et l'aire du pic correspondant à l'étalon interne. Cela permet d'établir la courbe d'étalonnage : concentration (g.L^{-1}) = f (ratio d'aire des pics).

1.4.5.2.3 Analyse des résultats

Les résultats sont enregistrés et traités par le logiciel Millenium (Waters Associates, Molsheim, France). Les composés sont alors identifiés grâce à leur temps de rétention (T_R), par comparaison avec le temps de rétention de chaque composé pur (= étalon) analysé dans les mêmes conditions. Les temps de rétention des différentes molécules d'intérêt en fonction des détecteurs utilisés sont précisés dans le Tableau II.1.3.

Tableau II.1.3 : Temps de rétention (en min) des molécules dosées par HPLC en fonction des deux détecteurs utilisés (RI : *Refractive Index* ; UV : Ultra Violet à 210 nm)

Composé	Temps de rétention RI (min)	Temps de rétention UV (min)
Glucose	9,6	/
Éthanol	21,9	/
Acide lactique	13,1	12,8
Glycérol	13,4	/
3-HPA	15,0	/
3-HP	13,4	13,1
1,3-PDO	17,7	/
Acide propionique	18,6	18,3
Acide citrique	8,3	7,9

1.4.5.3 Analyse par RMN C¹³

1.4.5.3.1 Système expérimental

La bioconversion du glycérol a été suivie *in situ* par résonance magnétique nucléaire (RMN) afin d'identifier précisément les métabolites produits et particulièrement les molécules du système 3-HPA. Les spectres ¹³C ont été obtenus grâce à un spectrophotomètre 75 MHz Bruker (Fourier 300, Bruker Biospin, Wissembourg, France) avec une largeur spectrale de 25,000 Hz et un temps de relaxation de 2 s. Les champs ont été stabilisés par verrouillage (lock) sur de l'eau deutérée D₂O (Euriso-Top, Saint-Aubin, France). Du glycérol marqué en ¹³C sur les trois atomes de carbone (Euriso-Top) a été utilisé pour réaliser les bioconversions.

1.4.5.3.2 Préparation des échantillons

Les bactéries sont récoltées en début de phase stationnaire de croissance, lavées au tampon PPB comme décrit auparavant (cf. partie II.1.3.2) et resuspendues dans 50 mL d'une solution de glycérol ¹³C (200 mM dans de l'eau osmosée) à une DO_{600 nm} de 20. 0,9 mL de milieu de bioconversion et 0,1 mL de D₂O sont introduits dans des tubes à RMN et la bioconversion du glycérol est suivie *in situ* à 37 °C pendant 3 h avec une acquisition de spectre toutes les 30 min.

1.4.5.3.3 Analyse des résultats

Les résultats obtenus se présentent sous la forme de spectres RMN, que l'on comparera avec les spectres de chaque molécule de la voie de bioconversion du glycérol (spectres de référence du glycérol, du 3-HPA, du 3-HP et du 1,3-PDO) et aux bases de données existantes.

1.5 Analyses effectuées à l'échelle de la cellule unique par cytométrie en flux

L'état physiologique des bactéries est évalué au cours des croissances cellulaires, des bioconversions et des différents tests d'inhibition, par épifluorescence couplée à la cytométrie en flux. Les méthodes associées à cette détermination sont basées sur l'utilisation de marqueurs fluorescents, jouant un rôle d'indicateurs d'activité biologique ou d'indicateurs structuraux, tels que l'activité enzymatique, le pH intracellulaire, l'intégrité membranaire ou l'état de stress oxydatif. La quantification de la fluorescence et le dénombrement des cellules sont réalisés par cytométrie en flux. Cette technique permet d'étudier sur un temps court (quelques min) un grand nombre de cellules uniques.

1.5.1 Détection de la fluorescence de cellules uniques par cytométrie en flux

1.5.1.1 Système expérimental

Après marquage des cellules, les analyses de fluorescence sont réalisées sur un cytomètre en flux de type Bactiflow (AES-Chemunex / Biomérieux, Marcy l'Etoile, France, Figure II.1.15 a). Ce système est équipé d'une source laser argon à 488 nm (bleu) et de quatre détecteurs présentant les caractéristiques suivantes :

- un détecteur FSC (forward-angle light scatter) qui détecte la lumière dans l'axe de la lumière incidente et donne des informations sur la taille cellulaire (Figure II.1.15 c)
- un détecteur SSC (side-angle light scatter) qui détecte la lumière à 90° par rapport à la lumière incidente et informe sur la granularité de la cellule. Cette granularité correspond à la complexité de la cellule (densité des organites, irrégularités internes ou de surface, Figure II.1.15 b).
- un filtre passe bande (de 530 ± 15 nm) FL1 qui détecte la fluorescence verte
- un filtre passe long (> 630 nm) FL2 qui détecte la fluorescence rouge.

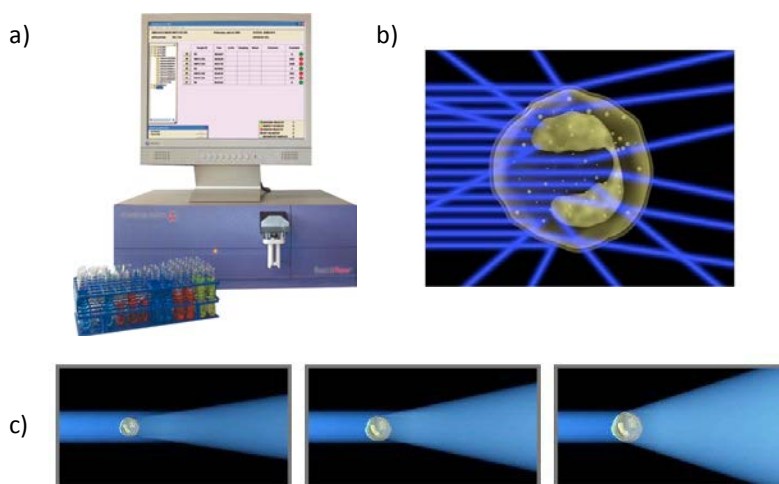


Figure II.1.15 : a) Système Bactiflow utilisé pour les analyses effectuées par cytométrie en flux. Évaluation de b) la granularité par le système SSC et c) la taille des cellules par le système FSC²⁹

Chaque faisceau lumineux sélectionné est envoyé sur un photomultiplicateur avant d'être converti en signal numérique. Par ailleurs, ce cytomètre est équipé d'un système de

²⁹ <http://acces.ens-lyon.fr>

comptage volumétrique qui permet de dénombrer les cellules contenues dans un volume de 200 μL . De l'eau ultra-pure (Milli-Q Advantage A10, Millipore, Guyancourt, France) est utilisée comme liquide de gaine pour l'entraînement et l'alignement des cellules devant le laser (Figure II.1.16). Le débit est fixé à 2 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$.

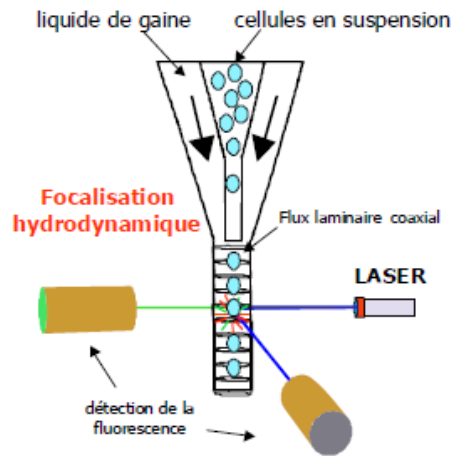


Figure II.1.16 : Principe de la focalisation des cellules devant le laser au sein de la cellule d'analyse

1.5.1.2 Acquisition et analyse des données

Les données de fluorescence sont collectées et analysées par le logiciel d'analyse Flomax (Sysmex/Partec, Villepinte, France), qui fournit des histogrammes (nombre d'évènements détectés en fonction du signal d'un détecteur, Figure II.1.17) et des cytogrammes (nombre d'évènements détectés en fonction de l'intensité de fluorescence, Figure II.1.17), auxquels sont associés des tableaux statistiques recensant le nombre, la concentration et le pourcentage de cellules présentes dans chaque zone du cytogramme ainsi que leur moyenne d'intensité de fluorescence. Un réglage préalable des gains et de la compensation est nécessaire pour interpréter correctement les histogrammes et cytogrammes. Après identification des cellules par rapport aux évènements totaux sur la base de leurs caractéristiques de taille (FSC) et de granulosité (SSC), les fluorescences issues des détecteurs FL1 et FL2 sont étudiées. Les résultats obtenus informent sur le pourcentage de cellules marquées et l'intensité de fluorescence moyenne de ces cellules.

1.5.2 Marquages des cellules

Différents marqueurs fluorescents sont utilisés au cours de ce travail afin d'évaluer :

- l'intégrité membranaire (marquage à l'iodure de propidium, IP), donnant une information sur la mortalité cellulaire

- l'activité enzymatique (activité estérasique) des cellules, donnant une indication sur la viabilité cellulaire (marquage au diacétate de carboxyfluorescéine, cFDA)
- l'état de stress oxydatif (marquage au dihydroéthidium, DHE)
- le pH intracellulaire (marquage à l'ester succinimidyl de diacétate de carboxyfluorescéine, cFDA-SE).

Avant tout marquage, les suspensions cellulaires à analyser sont diluées dans un tampon spécifique favorisant la pénétration des marqueurs, afin d'obtenir une concentration comprise entre 5.10^5 et 2.10^6 cellules.mL⁻¹. Cette concentration en cellules est optimisée pour les marquages et les analyses ultérieures par cytométrie en flux. Le tampon Mac Ilvaine pH 7,3 (acide citrique 0,1 M, Fisher Chemical, Elancourt, France ; disodium dihydrogénophosphate 0,2 M, J.T. Baker, Deventer, Pays-Bas) est utilisé pour les marquages de viabilité et mortalité. Un tampon phosphate (PBS 0,1 M ; pH 7,4) est utilisé pour l'estimation de l'état d'oxydation cellulaire et la mesure du pH intracellulaire.

1.5.2.1 Viabilité et mortalité cellulaire

Les fluorochromes Chemchrom V8 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), à base de diacétate de carboxyfluorescéine, et iodure de propidium (Sigma-Aldrich, Lyon, France) sont respectivement utilisés pour les mesures de viabilité cellulaire (*i.e.* mesure d'activité estérasique) et de mortalité (*i.e.* mesure d'intégrité membranaire). La solution de Chemchrom V8 utilisée est diluée à 10 % v/v dans de l'acétone et conservée à -20 °C. La solution d'iodure de propidium est préparée à 1 g.L⁻¹ (1,496 mM) dans de l'eau distillée et conservée à 4 °C.

Pour les mesures de viabilité, 10 µL de Chemchrom V8 sont ajoutés à 1 mL de la suspension cellulaire préalablement diluée dans le tampon Mac Ilvaine pH 7,3. Le mélange est ensuite incubé à 40 °C pendant 10 min au bain-marie, avant analyse directe au cytomètre en flux. Pour les mesures d'intégrité membranaire, 10 µL d'IP sont ajoutés à 1 mL de suspension cellulaire diluée dans le même tampon. L'analyse au cytomètre en flux est réalisée directement après une incubation à 40 °C pendant 10 min.

Des analyses biparamétriques, combinant ces deux marqueurs, sont réalisées afin de différencier simultanément les cellules viables (marquées uniquement au cFDA), mortes (marquées uniquement à l'IP) et altérées (marquées par les deux fluorochromes). Pour ce faire, les échantillons dilués sont incubés simultanément avec 10 µL d'IP et 10 µL de

Chemchrom V8 pendant 10 min à 40 °C, avant analyse par cytométrie en flux. Un exemple de cytogramme obtenu après analyses biparamétriques est présenté sur la Figure II.1.17.

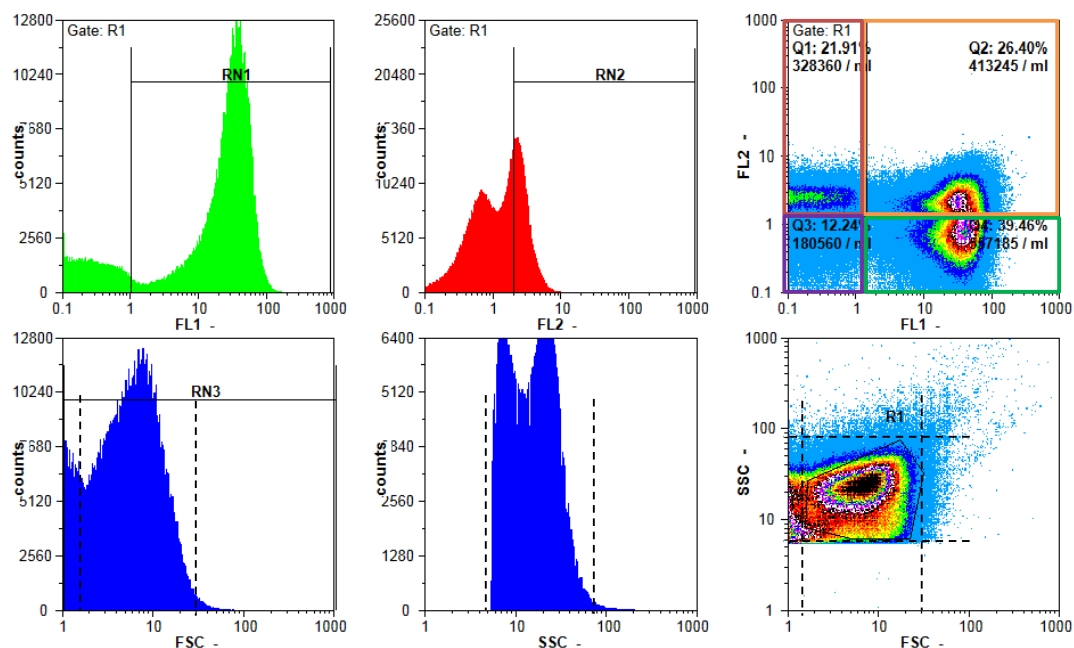


Figure II.1.17 : Cytogramme obtenu par cytométrie en flux après double marquage cFDA – IP. Les cellules marquées au cFDA (viables) peuvent être observées dans le cadran Q4, les cellules marquées à l'IP (mortes) dans le cadran Q1, les cellules doublement marquées (altérées) en Q2 et les cellules non marquées en Q3.

1.5.2.2 Stress oxydatif

L'état d'oxydation cellulaire est estimé par la quantification de l'une des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'ion hydroxyde (OH⁻), grâce au dihydroéthidium (DHE, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Avant le marquage, la suspension cellulaire est diluée à 10⁶ cellules/mL dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4), puis 10 µL de la solution mère de DHE (0,1 mM dans DMSO, stockée à -20 °C, Invitrogen-Molecular Probe, Eragny-sur-Oise, France) sont ajoutés à 1 mL de suspension cellulaire diluée. Le mélange est ensuite incubé à 40 °C pendant 10 min, avant d'être analysé par cytométrie en flux.

La mise au point du marquage du stress oxydatif des cellules par cytométrie en flux nécessite l'analyse de différentes conditions témoins (*i.e.* cellules stressées et non stressées) permettant de régler les gains du signal de fluorescence et ainsi de distinguer les différentes sous-populations. La première étape consiste à marquer une culture cellulaire "fraîche" n'ayant subi aucun stress. Au cours de la deuxième étape, une culture cellulaire stressée (chauffée à 80 °C pendant 10 min) est marquée au DHE puis analysée par cytométrie en flux.

Pour terminer, une analyse d'une suspension correspondant à un mélange 50/50 de cellules fraîches et stressées est réalisée, afin de vérifier le positionnement des pics des différentes populations cellulaires. Le résultat de cette mise au point est présenté sur la Figure II.1.18.

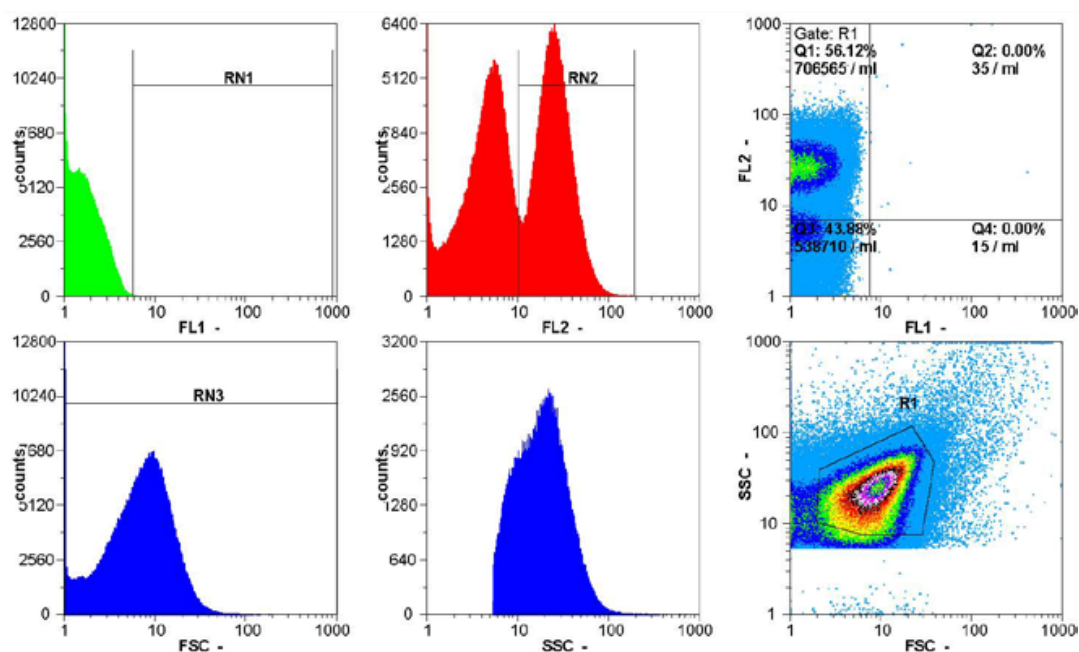


Figure II.1.18 : Cytogramme obtenu par cytométrie en flux après marquage au DHE d'un mélange constitué de 50 % de bactéries stressées (10 min à 80 °C) et de 50 % de bactéries fraîches. Les cellules marquées au DHE, dont la fluorescence rouge est détectée par FL2, sont observées dans le quadrant Q1 et les cellules non marquées dans le quadrant Q3.

1.5.2.3 pH intracellulaire

La mesure du pH intracellulaire (pHi) est réalisée par marquage des cellules avec le fluorochrome cFDA-SE (carboxyfluoresceine diacetate succinimidyl-ester) et mesure de l'intensité de fluorescence des cellules par cytométrie en flux. La solution de cFDA-SE utilisée (8,96 μM) est préparée à partir d'une solution-mère à 44,8 μM (Invitrogen-Molecular Probes) diluée dans de l'acétone. Les échantillons cellulaires sont tout d'abord dilués dans le tampon PBS pH 7,4. 5 μL de cFDA-SE sont ensuite ajoutés à 1 mL de la suspension cellulaire diluée. Le mélange est incubé à 40 °C pendant 10 min au bain-marie. Les échantillons sont alors centrifugés pendant 1 min 30 à 14 000 g et le culot cellulaire remis en suspension dans 1 mL de tampon PBS pH 7,4.

Une courbe de calibration exprimant la relation entre l'intensité de fluorescence du cFDA-SE mesurée par le cytomètre en flux et le pH intracellulaire est réalisée en parallèle de chaque prélèvement de la bioconversion/du test d'inhibition, du fait de l'évolution de l'état

physiologique des bactéries dans le temps. Cette courbe de calibration est obtenue en utilisant des cellules dont le pH intracellulaire est, au préalable, équilibré avec le pH extracellulaire (pHe). Cet équilibre entre pHi et pHe est réalisé par ajout de valinomycine, qui rend la membrane plasmique perméable aux ions potassium, et de nigéricine, qui permet l'échange des ions potassium et des protons. L'action combinée de ces deux composés dissipe la force proto-motrice, ce qui équilibre les pH intra- et extracellulaires.

Pour réaliser la courbe étalon, les cellules, prélevées à un temps t et préalablement marquées au cFDA-SE et centrifugées, sont remises en suspension dans 1 mL de tampon PBS à différents pHs (pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 et 7,5). Le pH intracellulaire des cellules de chaque mélange est ensuite équilibré avec le pH externe, par ajout de 5 μ L de valinomycine (0,2 mM, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et de 5 μ L de nigéricine (0,2 mM, Sigma-Aldrich, Lyon, France) pour une concentration finale de chaque antibiotique de 1 μ M. Après 1 min d'incubation à température ambiante, l'intensité de fluorescence de chaque suspension est mesurée par cytométrie en flux. Les courbes étalons sont établies pour chaque suspension cellulaire testée en reportant l'intensité de fluorescence moyenne de la population (IF) en fonction du pH des cellules équilibrées (Figure II.1.19).

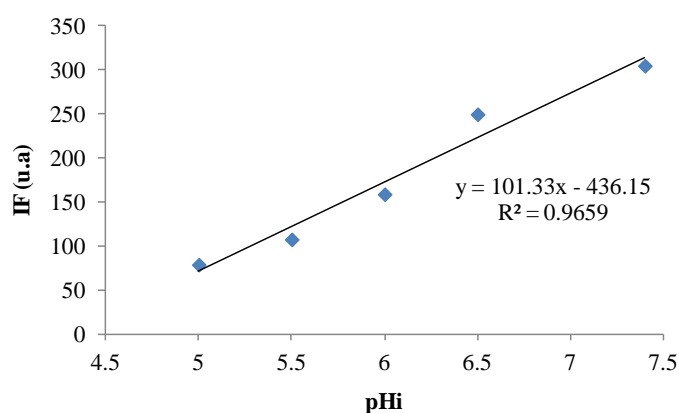


Figure II.1.19 : Courbe étalon pour la mesure du pH intracellulaire d'un échantillon cellulaire prélevé lors d'un test d'inhibition par le 3-HP sur *L. reuteri* DSM 17938

La mesure du pH intracellulaire de la suspension cellulaire est effectuée en parallèle de la gamme étalon, en utilisant le même protocole de marquage, mais sans équilibration du pHi et du pHe. A cet effet, 100 μ L de cellules marquées sont remises en suspension dans 1 mL de tampon PBS au pH du milieu. La comparaison de la mesure de l'intensité de fluorescence de cette suspension, réalisée par cytométrie en flux, avec la courbe étalon permet de déterminer le pH intracellulaire des cellules.

2 – Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP assistée par contacteur à membrane

2.1 Préparation des phases organiques et des phases aqueuses modèles

2.1.1 Préparation des phases aqueuses modèles et réelles

Les solutions aqueuses de 2-HP et 3-HP aux différentes concentrations testées (entre 0,5 et 5 g.L⁻¹) sont préparées à partir de solutions aqueuses commerciales (TCI-Europe, 30 % m/m pour le 3-HP et Sigma-Aldrich, 30 % m/m pour le 2-HP). Pour certaines expériences, le pH initial des solutions est ajusté entre 3 et 7 avec de l'HCl 12 N et du KOH 10 N. Les valeurs de pH sont mesurées avec un pHmètre Jenco vision 6071.

Les milieux modèles de bioconversion sont préparés à partir de 3-HP (TCI-Europe, 30 % m/m en solution aqueuse), de glycérol (Sigma-Aldrich, Lyon, France), de 1,3-PDO (Sigma-Aldrich, Lyon, France) et de 3-HPA synthétisé selon la méthode décrite dans la partie II.4. Les milieux réels de bioconversion utilisés sont obtenus après bioconversion du glycérol en flacons Schotts *par L. reuteri* selon le protocole décrit dans la partie II.1.3.

2.1.2 Préparation des phases organiques d'extraction

Une amine tertiaire (TOA, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et un sel d'ammonium quaternaire (Aliquat 336, Tableau II.2.1, Sigma-Aldrich, Lyon, France) sont utilisés comme extractants et dilués dans du *n*-décanol (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Quatre ratios d'amines différents sont préparés : 20/0, 18/2, 15/5 et 10/10 % v/v dans du *n*-décanol 80 %.

Tableau II.2.1 : Pureté des différents composants de la phase organique et composition de l'Aliquat 336 données par le fournisseur (Sigma-Aldrich, Lyon, France)

Molécule	Composition	Pourcentage
<i>n</i>-décanol	<i>n</i>-décanol	99 %
TOA	TOA	98 %
Aliquat 336	Triethylmethylammonium chloride	75 – 90 %
	Octan-1-ol	5 – 10 %
	Décane-1-ol	3 – 10 %
	Amines, tri-C8-10-alkyl	2 – 5 %

2.1.3 Mesure des viscosités des phases organiques

2.1.3.1 Système expérimental

La viscosité de chaque phase organique testée pour l'extraction réactive du 3-HP et du 2-HP est mesurée à 25 °C avec un rhéomètre rotationnel Contraves, Rheomat RM 115 (ProRheo GmbH, Althengstett, Allemagne) avant et après extraction.



Figure II.2.1 : Photographie du viscosimètre Contraves Rheomat 115 utilisé pour les mesures de viscosité des phases organiques extractantes testées

2.1.3.2 Protocole de mesure

La mesure consiste à soumettre les différents échantillons à 15 niveaux de vitesse de rotation différents. Le couple de rotation est alors affiché pour chaque niveau. Avec cette valeur, il est possible de calculer la viscosité de chaque échantillon en multipliant par un facteur de conversion qui dépend du système utilisé. La contrainte de cisaillement est ainsi obtenue. Afin d'obtenir la viscosité, il est nécessaire de tracer les valeurs de la contrainte de cisaillement τ en fonction du gradient de vitesse, dont les valeurs sont données en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. Si la phase organique testée est un liquide Newtonien, la courbe obtenue, appelée rhéogramme, est une droite dont la pente correspond à la viscosité de l'échantillon en $\text{mPa}\cdot\text{s}$ (Figure II.2.2).

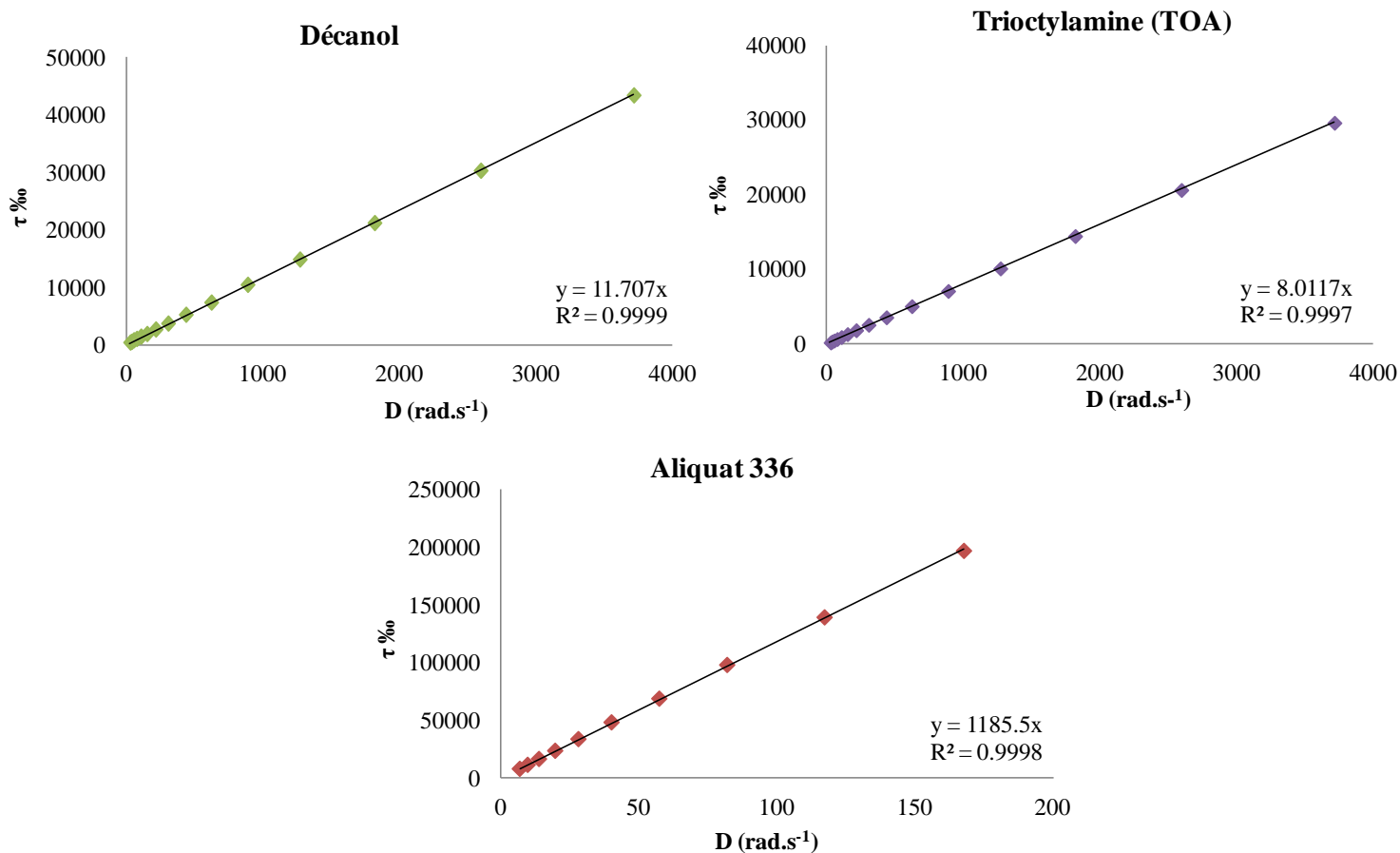


Figure II.2.2 : Exemples de rhéogrammes obtenus pour les trois composants purs de la phase organique extractante. Décanol, TOA et Aliquat 336 correspondent bien à des liquides de type Newtonien.

2.1.3.3 Analyse des résultats

Les résultats des mesures de viscosité pour l'ensemble des phases organiques extractantes testées sont récapitulés dans le tableau II.1.2. L'Aliquat 336 est extrêmement visqueux (1176,5 mPa.s) au contraire du *n*-décanol et du TOA (respectivement 11,6 et 7,9 mPa.s). Une augmentation du pourcentage d'Aliquat 336 en phase organique augmente donc significativement la viscosité du mélange.

Tableau II.1.2 : Résultats des mesures de viscosité des différentes phases organiques extractantes testées

Phase organique	Viscosité à 25°C (mPa.s)
<i>n</i>-décanol	11,6 ± 0,1
TOA	7,9 ± 0,1
Aliquat 336	1176,5 ± 3,1
TOA 10 % + <i>n</i>-décanol 90 %	11,9 ± 0,2
TOA 20 % + <i>n</i>-décanol 80 %	11,9 ± 0,1
TOA 30 % + <i>n</i>-décanol 70 %	11,0 ± 0,1
TOA 40 % + <i>n</i>-décanol 60 %	11,4 ± 0,1
Aliquat 336 10 % + <i>n</i>-décanol 90 %	14,6 ± 0,1
Aliquat 336 20 % + <i>n</i>-décanol 80 %	23,2 ± 0,2
Aliquat 336 30 % + <i>n</i>-décanol 70 %	40,2 ± 0,1
Aliquat 336 40 % + <i>n</i>-décanol 60 %	72,2 ± 0,2
TOA 10 % + Aliquat 336 10 % + <i>n</i>-décanol 80 %	15,0 ± 0,1
TOA 15 % + Aliquat 336 5 % + <i>n</i>-décanol 80 %	12,1 ± 0,1
TOA 18 % + Aliquat 336 2 % + <i>n</i>-décanol 80 %	11,5 ± 0,1

2.2 Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP en ampoules à décanter

2.2.1 Extraction réactive en mode non dispersif

Les deux phases (25 mL de phase aqueuse puis 25 mL de phase organique, Figure II.2.3) sont mises en contact délicatement dans des ampoules à décanter de 60 mL, sans mélange. Après préparation, les ampoules sont hermétiquement fermées et placées dans une enceinte thermostatée à 25 °C pendant 66 h.

Des prélèvements sont ensuite effectués dans la phase aqueuse, les échantillons sont préparés puis analysés en HPLC selon la méthode décrite précédemment (partie II.1.4.5.2) afin de déterminer la concentration en acide résiduelle dans la phase aqueuse, et donc, par bilan de matière, la concentration d'acide extraite en phase organique.

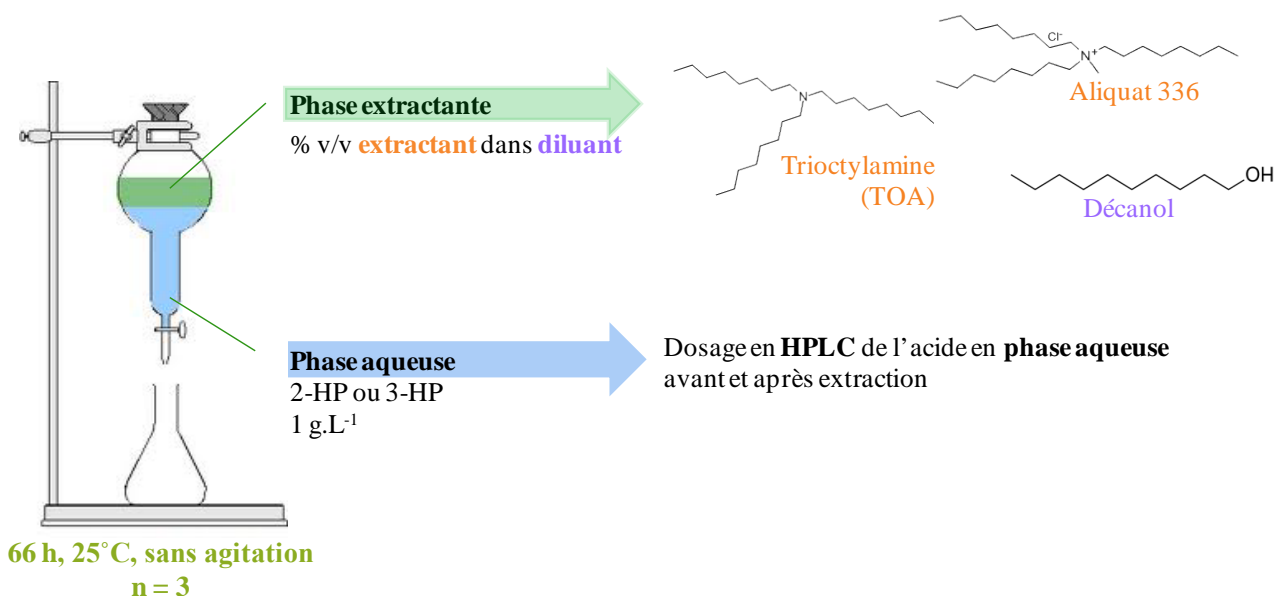


Figure II.2.3 : Protocole d'extraction réactive en mode non dispersif en ampoules à décanter

2.2.2 Extraction réactive en mode dispersif

Les deux phases (25 mL de phase aqueuse + 25 mL de phase organique) sont mises en contact dans des ampoules à décanter de 60 mL, puis mélangées en secouant vigoureusement les ampoules pendant 2 à 3 min. Après agitation, celles-ci sont hermétiquement fermées et placées dans une enceinte thermostatée à 25 °C pendant 7 jours, temps de décantation nécessaire pour que les deux phases se séparent.

Des prélèvements sont ensuite effectués dans la phase aqueuse, les échantillons analysés en HPLC et les résultats traités comme décrit dans le cas du mode non dispersif.

2.2.3 Caractérisation des performances de l'extraction

2.2.3.1 Rendement d'extraction en phase organique

Le rendement de l'extraction, ou pourcentage d'acide extrait Y%, correspond à la quantité d'acide extraite dans la phase organique par rapport à la quantité d'acide initialement présente dans la phase aqueuse. Il s'exprime de la façon suivante :

$$Y\% = 100 \times \frac{([HA]_{ini} + [A^-]_{ini}) - ([HA]_{eq} + [A^-]_{eq})}{[HA]_{ini} + [A^-]_{ini}}$$

2.2.3.2 Coefficient de distribution apparent K_D

Le principe des mesures de coefficients de distribution liquide-liquide est de mettre en contact dans une ampoule à décanter la phase aqueuse enrichie en acide avec une phase extractante composée d'un solvant et d'une ou plusieurs molécules extractantes (TOA et/ou Aliquat 336) jusqu'à l'obtention de l'équilibre apparent. On parle alors de coefficient de distribution apparent, noté K_D et défini de la façon suivante :

$$K_D = \frac{[HA]_{org} + [A^-]_{org}}{[HA]_{aq} + [A^-]_{aq}}$$

2.3 Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP en contacteur membranaire

2.3.1 Présentation et mise en œuvre de l'installation expérimentale d'extraction liquide-liquide à membrane

2.3.1.1 Description du pilote : le contacteur membranaire Liqui-Cel® X50

Le module utilisé (Liqui-Cel® 2,5 × 8, fibres X50, Membrana, États-Unis) se présente sous la forme de fibres creuses poreuses rassemblées en un faisceau composé d'environ 10 000 fibres dans une calandre cylindrique. Par conséquent, on distingue deux compartiments de circulation des fluides : l'intérieur des fibres creuses et l'extérieur (calandre). La membrane, en polypropylène, est hydrophobe. Les dimensions caractéristiques du contacteur Liqui-Cel® sont détaillées dans le tableau II.2.3.

Tableau II.2.3 : Dimensions caractéristiques du contacteur membranaire Liqui-Cel® X50 utilisé (données fournisseur)

Calandre		Fibres X50	
Matériau	Polypropylène	Matériau	Polypropylène
Diamètre interne	58,4 mm	Diamètre interne	220 µm
Longueur interne	203 mm	Diamètre externe	300 µm
Nombre de fibres	9800 approx.	Longueur effective	146 mm
		Epaisseur de pores	40 µm
		Porosité	40 %
		Taille moyenne des pores	0,03 µm

Le contacteur membranaire Liqui-Cel® a la particularité de fonctionner à courants croisés en raison de la présence d'une barrière centrale dans la calandre. Le fluide circulant dans la calandre suit en effet une trajectoire avec une composante radiale. Le liquide est introduit à une extrémité du module et remplit d'abord le volume qui se trouve au centre du

faisceau de fibres. La longueur de ce volume représente la moitié du module en raison de la présence d'une paroi radiale imperméable (barrière centrale). Une fois ce compartiment rempli, le fluide traverse le faisceau de fibres et contourne la paroi imperméable en passant en périphérie de la calandre. Dans la deuxième section du module, le fluide traverse de nouveau le faisceau de fibres (vers l'intérieur), arrive au tube collecteur central puis est dirigé vers la sortie du module. En ce qui concerne le fluide circulant dans les fibres, il décrit un mouvement axial entre chaque extrémité du module (Figure II.2.4). La dénomination « courants croisés » vient en opposition à « courants parallèles », et non à celles de « contre-courant » et « co-courant ».

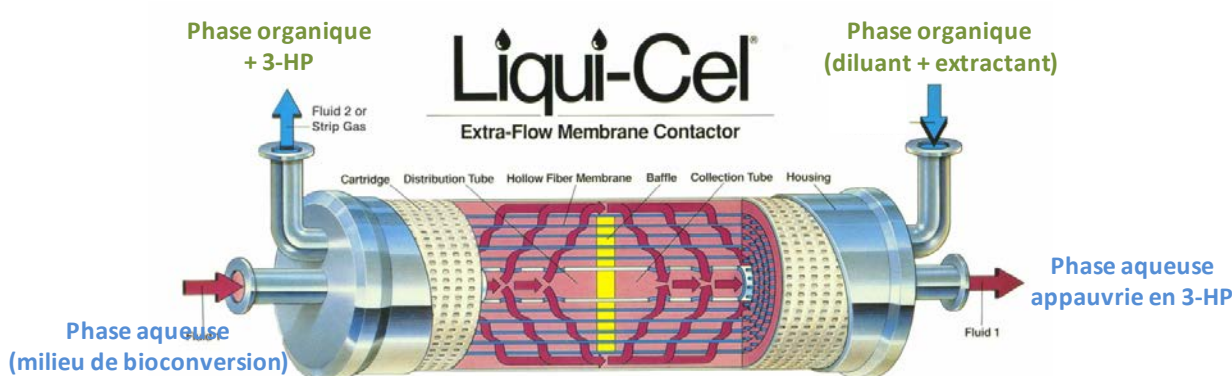


Figure II.2.4 : Schéma du contacteur membranaire Liqui-Cel utilisé pour l'extraction réactive du 3-HP

2.3.1.2 Fonctionnement de l'installation expérimentale

Lors des essais d'extraction réactive liquide-liquide, 500 mL de phase aqueuse enrichie en 3-HP, et 500 mL de phase organique extractante (solutions préparées en % v/v) sont introduits dans leurs réservoirs respectifs, mis à température dans des bains-marie à 25 °C et agités par l'intermédiaire d'un agitateur magnétique afin d'assurer l'homogénéité des deux phases durant toute la durée de l'extraction. Une fois l'ensemble des raccordements effectués, la pompe volumétrique à engrenage (MDGH2T, Iwaki France, Marcoussis, France) côté aqueux (phase non mouillante dans le cas d'une membrane hydrophobe) est d'abord mise en marche. Une dizaine de secondes plus tard, la phase organique extractante (phase mouillante) est mise en circulation, à pression plus faible que du côté aqueux pour éviter le passage du solvant à travers la membrane. Une fois que les liquides apparaissent en sortie des deux compartiments, les débits ($10 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ côté aqueux et $13 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ côté organique) et les pressions à l'entrée de chaque compartiment sont ajustées de manière à avoir une interface stable ($\text{Paq} >$

Porg sur toute la longueur du contacteur). Des manomètres (CITEC, 0 à 1,6 bar) permettent de contrôler les pressions en entrées du module pendant l'expérimentation. Les débits sont réglés sur la base de courbes d'étalonnage préalablement établies pour chacune des pompes.

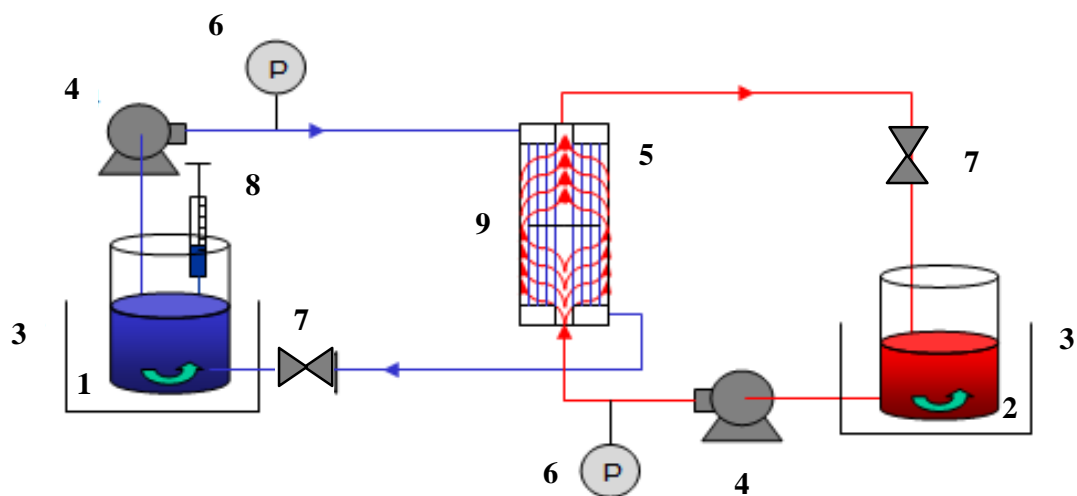


Figure II.2.5 : Schéma de l'installation expérimentale d'extraction liquide-liquide du 3-HP assistée par contacteur à membrane. 1. Réservoir de phase aqueuse; 2. Réservoir de phase organique; 3. Bain marie 4. Pompe volumétrique à engrenage; 5. Contacteur membranaire à fibres creuses; 6. Manomètre; 7. Vanne de régulation de pression; 8. Système de prélèvement.

Lorsque l'interface n'est pas stabilisée, la phase aqueuse et/ou la phase organique deviennent très rapidement troubles, phénomène lié à la dispersion d'une phase dans l'autre. Si cela arrive, l'extraction est arrêtée et le module nettoyé.

Des prélèvements réguliers (environ 1 mL) sont effectués au niveau de la phase aqueuse. Leur fréquence varie en fonction de l'état d'avancement de l'extraction. Des prélèvements sont effectués avec des pipettes en verre par l'intermédiaire de piquages sur les couvercles des deux réservoirs au temps initial, toutes les 5 min pendant les 30 premières min puis toutes les 10 min jusqu'à 100 min. Des prélèvements sont encore effectués à 120, 140 et 180 min (durée totale de l'extraction 3 h). En fin d'expérimentation le module est nettoyé et séché.

2.3.1.3 Nettoyage du module

Une fois le dernier échantillon prélevé, les deux pompes sont arrêtées simultanément. Une partie des tuyaux se vide seule. Le circuit est alors vidangé. Pour cela, les deux tuyaux d'alimentation (phase aqueuse et phase organique) sont retirés des milieux liquides et les deux tuyaux de refoulement orientés dans un réservoir à déchets. Chaque pompe est actionnée

successivement pendant quelques secondes afin de purger le contacteur. Les pompes sont ensuite éteintes et les tuyaux d'admission côté calandre et de refoulement côté fibres sont dirigés vers le réservoir à déchets. Pour terminer de vider le module, l'arrivée d'air comprimé est branchée sur la sortie côté calandre et sur l'alimentation côté fibres à l'aide du connecteur en T de telle sorte que l'air pousse les liquides restants vers le bas (le réservoir à déchet se remplit). Le débit d'air doit rester très faible de sorte que la pression ne dépasse pas 0,1 bar côté fibres.

L'étape suivante consiste à nettoyer le contacteur et à régénérer l'hydrophobicité de la membrane. Elle doit être réalisée avec attention en vue des expérimentations ultérieures. Deux solutions d'un litre d'isopropanol à 60 % (Sigma-Aldrich, Lyon, France) dans de l'eau osmosée sont ainsi préparées dans deux flacons Schott. Dans le premier, les tuyaux d'alimentation côtés aqueux organique et de refoulement côté aqueux sont plongées tandis que le tuyau de refoulement côté organique est introduit dans un flacon vide. La pompe côté aqueux puis la pompe côté organique sont actionnées en réglant les débits de façon à maintenir $P_{aq} > P_{org}$. Le flacon vide côté organique se remplit rapidement de la solution de rinçage de couleur blanchâtre. Les pompes sont arrêtées lorsque le liquide sortant devient limpide ou lorsque le flacon de solution de rinçage est vide. Le flacon côté aqueux est alors rempli aux 3/4 avec le litre de solution d'isopropanol non utilisé et l'entrée et la sortie côté organique sont plongées dans le 1/4 restant. Les deux pompes sont mises en marche en réglant toujours les débits et les pressions de façon à toujours avoir $P_{aq} > P_{org}$. On force ainsi le passage de la solution d'isopropanol à travers les pores de la membrane de l'intérieur des fibres vers l'extérieur ; le flacon côté organique se remplit lentement. Lorsque le flacon côté aqueux est vide, les pompes sont arrêtées et le circuit vidangé comme précédemment avant d'être rincé à l'eau osmosée.

Pour cela, les tuyaux d'admission des deux pompes sont plongés dans un seau de 10 L d'eau osmosée et les tuyaux de refoulement dans un seau de 10 L vide. Les pompes sont mises en marche ($P_{aq} > P_{org}$) et l'eau à la sortie est trouble. Une fois le premier seau d'eau vide, le protocole est répété avec un deuxième seau de 10 L d'eau osmosée. Le circuit est enfin vidangé comme décrit précédemment mais le débit d'air des deux côtés est laissé au moins une nuit pour s'assurer que le module soit bien sec lors de sa prochaine utilisation.

En cas d'encrassement organique, c'est-à-dire lorsque des cellules de *L. reuteri* ont circulé dans les fibres du module, celui-ci est nettoyé en fin d'expérimentation au moyen de

solutions basiques et acides. Cette étape est effectuée entre la première phase de vidange et le rinçage du circuit à l'isopropanol (Figure II.2.6). Après un premier rinçage à l'eau osmosée, une solution de KOH à 3 % m/v est mise en recirculation dans les fibres et dans la calandre durant 45 min. Après un nouveau rinçage à l'eau osmosée, la même procédure est opérée avec une solution d'acide citrique à 5 % m/v. Le circuit est alors rincé avec de l'eau osmosée jusqu'à obtention d'un pH en sortie égal au pH en entrée et le circuit séché à l'air comprimé durant au moins une nuit.

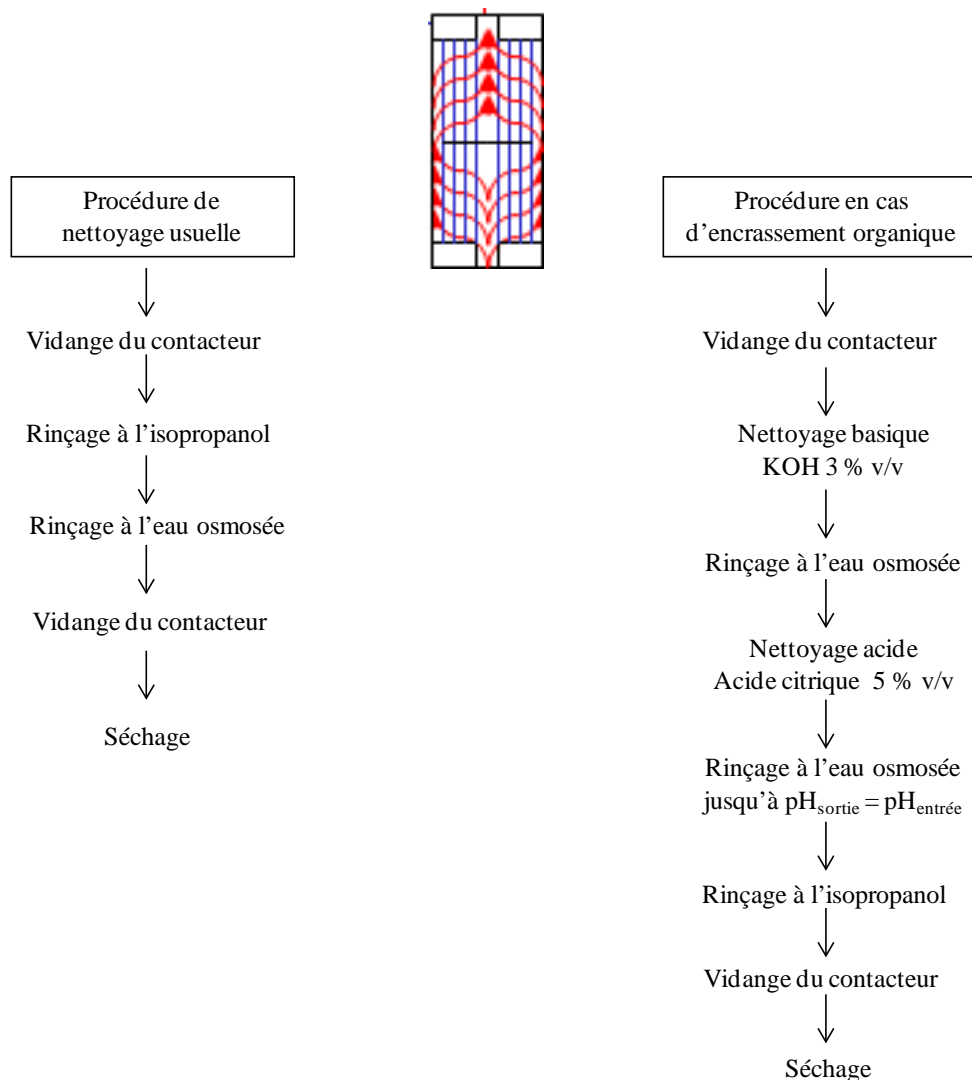


Figure II.2.6 : Protocoles de nettoyage du contacteur en cas d'encrassement organique

2.3.2. Suivi cinétique de l'extraction

Le temps caractéristique (noté τ , en s) constitue un paramètre important de l'extraction puisqu'il renseigne sur la cinétique de transfert et donc sur la dynamique du système. Ce temps caractéristique correspond au temps au bout duquel l'extraction atteint 63 % du rendement d'extraction maximum.

3 – Intégration de la production par voie microbienne et de l'extraction *in situ* du 3-HP

3.1 Description du système intégré

Le système utilisé pour l'intégration de la bioconversion du glycérol et de l'extraction liquide-liquide réactive du 3-HP assistée par contacteur à membrane est semblable à celui utilisé lors des tests d'extraction sur milieux modèles : la cuve de phase aqueuse est remplacée par le bioréacteur Sartorius Biostat® A plus (de volume utile 2,5 L) décrit précédemment (cf. partie II.1.3.3.2). Le module Liqui-Cel® X 50 (cf. partie II.2.3) est couplé au bioréacteur, afin d'extraire *in situ* le 3-HP produit au cours de la bioconversion (Figure II.3.1 b). Le milieu de bioconversion quitte donc le bioréacteur pour remplir les fibres de la membrane. En parallèle, la phase organique extractante (500 mL), maintenue à 37 °C dans un bain-marie et sous agitation, circule dans la calandre du contacteur. Les débits fixés des deux côtés correspondent à ceux décrits précédemment (10 mL.s⁻¹ côté aqueux et 13 mL.s⁻¹ côté organique). Si le bioréacteur a été autoclavé, les tuyaux d'alimentation et de refoulement du contacteur, ainsi que le contacteur lui-même, du fait de la nature organique de la membrane n'ont pas été stérilisés à la chaleur. De manière à éviter les pertes de chaleur dans les tuyaux lors du passage du bioréacteur vers le contacteur, des gaines ont été ajoutées au dispositif (Figure II.3.1 a).

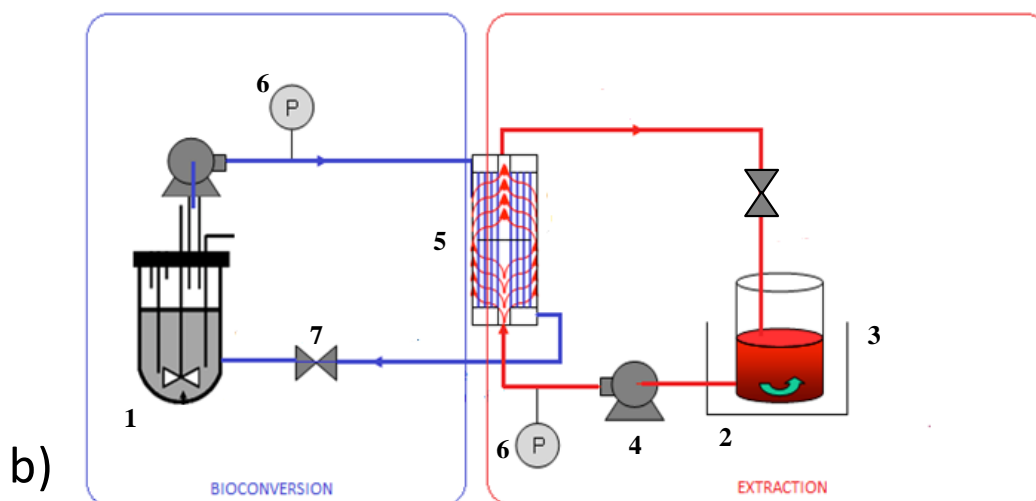
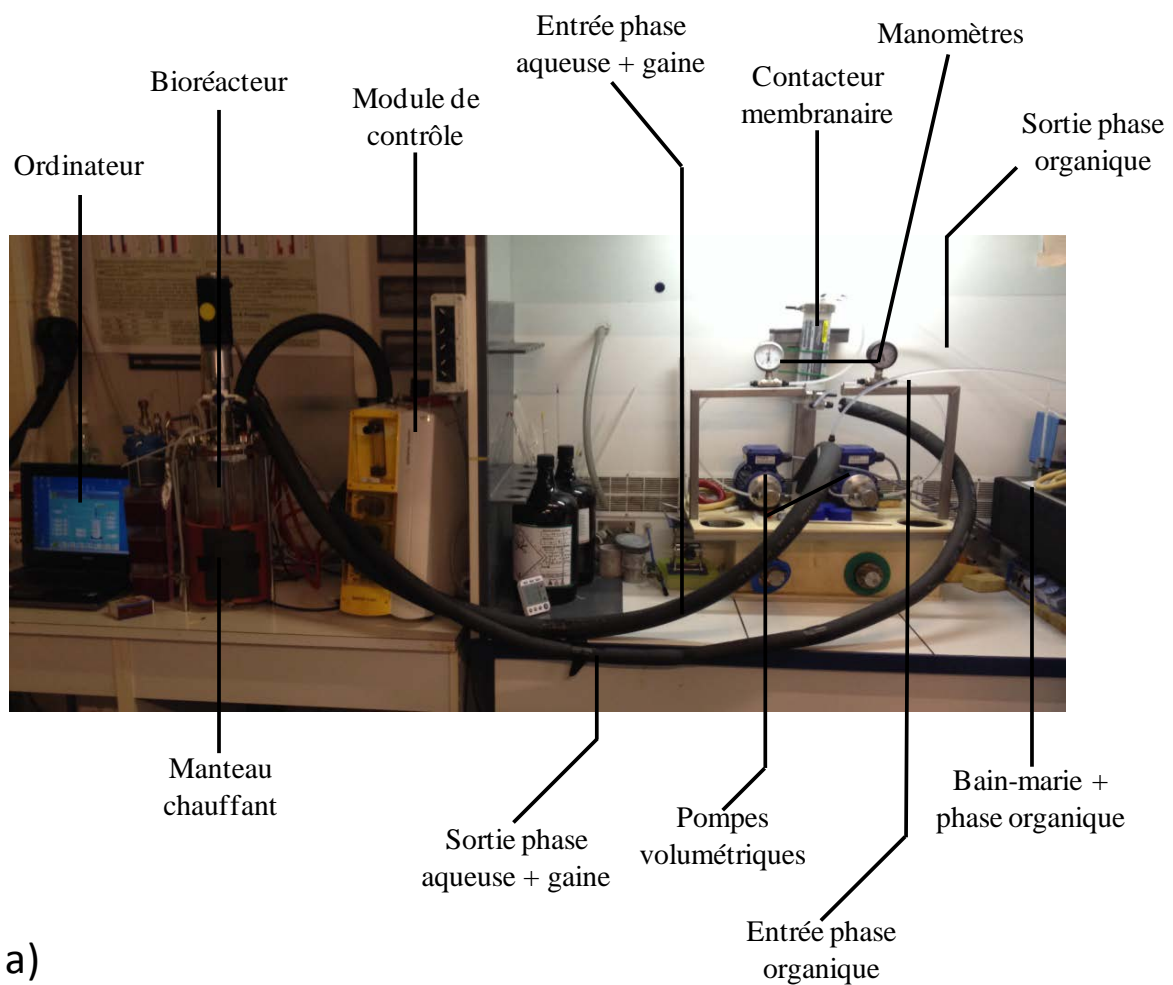


Figure II.3.1 : a) Photographie du montage expérimental du procédé intégré couplant conversion du glycérol en 3-HP en bioréacteur et extraction liquide-liquide réactive du 3-HP assistée par contacteur membranaire b) Schéma du procédé intégré. 1. Bioréacteur Sartorius Biostat® A plus; 2. Réservoir de phase organique; 3. Bain-marie 4. Pompe volumétrique à engrenage; 5. Contacteur membranaire à fibres creuses Liqui-Cel® X 50; 6. Manomètre; 7. Vanne de régulation de pression.

3.2 Mise en œuvre du procédé intégré

3.2.1 Stabilisation de l'interface entre phase aqueuse et phase organique

Comme décrit précédemment dans la partie concernant l'installation expérimentale d'extraction par contacteur membranaire, l'interface est d'abord stabilisée en mettant en contact une phase aqueuse dépourvue de bactéries (eau osmosée stérile) circulant dans les fibres, avec la phase organique extractante utilisée lors de l'essai qui circule dans la calandre. Une fois les débits et pressions fixés et l'interface stabilisée, l'entrée et la sortie de phase aqueuse au niveau du contacteur sont modifiées au moyen de vannes trois voies. Elles proviennent donc plus du flacon contenant l'eau osmosée stérile mais du bioréacteur contenant la solution initiale de glycérol (Figure II.3.2). La viscosité de la phase aqueuse avec et sans glycérol étant différente, il est nécessaire de réajuster la pression du côté de la phase aqueuse afin de stabiliser de nouveau l'interface.

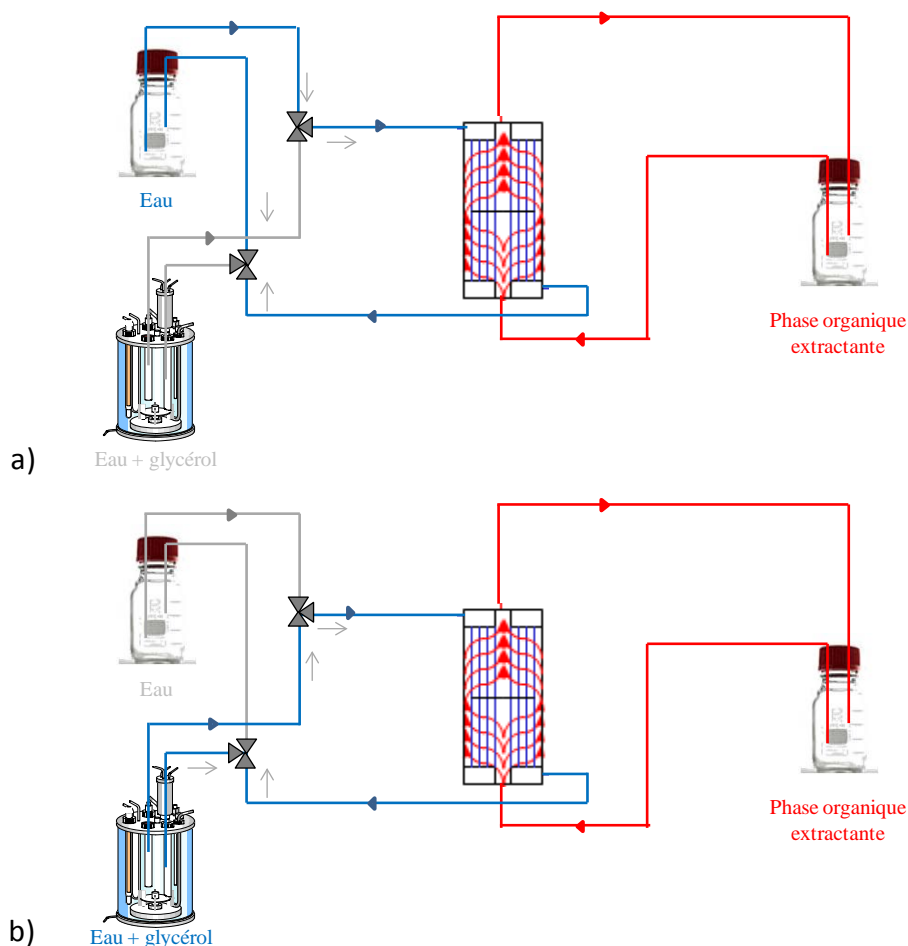


Figure II.3.2 : Protocole de stabilisation de l'interface entre phase aqueuse et phase organique lors du couplage entre bioconversion bactérienne du glycérol et extraction du 3-HP par contacteur membranaire. Des vannes trois voies permettent de modifier les entrées et sorties de la phase aqueuse.

3.2.2 Initiation de la bioconversion et début de l'extraction

La bioconversion du glycérol débute au moment de l'inoculation des bactéries, qui correspond à l'ajout dans le bioréacteur de 500 mL de suspension cellulaire de *L. reuteri* DSM 17938 issue du lavage et récoltée en phase stationnaire de croissance, afin d'atteindre une DO initiale à 600 nm de 12 (environ $1,2 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹) et une concentration initiale en glycérol de 18,2 g.L⁻¹ (200 mM). Le protocole de préparation et de lancement de la bioconversion est le même que décrit précédemment (cf. partie II.1.3).

Étant donnée la cinétique très rapide de consommation du glycérol et de production des métabolites observée dans le cas de la bioconversion non couplée, la boucle d'extraction est démarrée juste après l'inoculation et l'éventuel ajustement de pH qui suit l'introduction des bactéries dans le bioréacteur.

3.3 Déroulement des expériences

3.3.1 Suivi de la composition de la phase aqueuse

Des prélèvements sont réalisés toutes les 15 min pendant 3 h, afin de suivre l'évolution de la consommation du substrat et de la production des métabolites par HPLC et d'évaluer l'impact du procédé intégré sur l'état physiologique des bactéries productrices par marquage cFDA-IP et analyse par cytométrie en flux.

3.3.2 Suivi de la cinétique d'extraction en phase organique

Des prélèvements sont réalisés toutes les 15 min pendant 3 h, afin de suivre la cinétique d'extraction du 3-HP en phase organique. Pour permettre le dosage du 3-HP par la méthode HPLC décrite précédemment (cf. partie II.1.4.5.2), le 3-HP récupéré dans la phase extractante va être extrait et récupéré dans une nouvelle phase aqueuse. Pour cela les échantillons prélevés régulièrement de la phase organique sont supplémentés volume à volume avec une solution de NaCl à 0,2 M dans des eppendorfs de 2 mL et agités durant une nuit à 45 rpm et à température ambiante à l'aide d'un agitateur rotatif horizontal LabRoller II (Labnet International, Edison, États-Unis). Cette phase aqueuse contenant 98 % du 3-HP initialement présent en phase organique (d'après des tests préliminaires) est alors récupérée et analysée par HPLC.

3.4 Etude de l'impact du procédé intégré sur l'état physiologique de *L. reuteri*

3.4.1 Impact des métabolites de la voie de biosynthèse

Afin d'étudier l'impact éventuel des métabolites de la voie de biosynthèse du 3-HP sur l'état physiologique des bactéries productrices et leurs contributions au phénomène d'inhibition global observé lors de la bioconversion, des cellules de *L. reuteri* DSM 17938 récoltées en phase stationnaire de croissance et lavées selon le protocole décrit précédemment (cf. partie II.1.3.2) sont mises en suspensions à une concentration d'environ $1,2 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹ (correspondant à DO 12) dans des solutions aqueuses de 3-HP (2,5 g.L⁻¹), 3-HPA (5 g.L⁻¹) et 1,3-PDO (2,5 g.L⁻¹). Après 30 min et 3 h, l'activité enzymatique et l'intégrité membranaire des bactéries sont évaluées par double marquage cFDA-IP et analyse en cytométrie en flux. Les concentrations en métabolites testées correspondent à celles attendues lors des bioconversions bactériennes du glycérol en 3-HP. Le 3-HP étant un acide organique, deux pH différents sont testés (pH 3 qui correspond au pH de la solution à 2,5 g.L⁻¹ et pH 5 ajusté à cette valeur avec du KOH 5 N, valeur qui se rapproche du pH optimal de *L. reuteri* et supérieure au pKa de l'acide) afin d'étudier le rôle du pH dans l'inhibition provoquée par le 3-HP. Un contrôle négatif (bactéries en suspension dans de l'eau osmosée) est également réalisé.

3.4.2 Impact de la circulation des bactéries dans le module

Une phase aqueuse contenant des cellules de *L. reuteri* DSM 17938 à DO 12 (récoltées en phase stationnaire et lavées) en suspension dans de l'eau osmosée stérile est mise en circulation dans les fibres du contacteur membranaire. En parallèle, une phase aqueuse dépourvue de cellules circule à contre-courant dans la calandre. Les débits (10 et 13 mL.s⁻¹ pour les phases aqueuse et organique, respectivement) et pressions (0,8 bar côté aqueux et 0,4 bar côté organique) utilisés sont les mêmes que ceux utilisés jusqu'à présent. Des prélèvements sont effectués toutes les 15 min pendant 3 h et l'impact de la circulation des bactéries dans le module (c'est à dire à travers les tuyaux, les pompes et les fibres du contacteur) sur l'état physiologique est étudié après double marquage cFDA-IP par cytométrie en flux. Un contrôle négatif (bactéries en suspension dans de l'eau osmosée pendant 3 h) est également réalisé.

3.4.3 Impact de la fraction soluble de la phase organique extractante (*molecular level toxicity*)

L'impact de la fraction soluble des molécules (diluants et extractants) composant la phase organique (*molecular level toxicity*) sur l'état physiologique de *L. reuteri* est également testé. Des solutions aqueuses enrichies en molécules organiques sont d'abord préparées par mise en contact de 25 mL d'eau osmosée avec 25 mL de phase organique (100 % v/v décanol, 80 % v/v décanol + 20 % v/v TOA, 80 % v/v décanol + 18 % v/v TOA + 2 % v/v Aliquat 336) dans des tubes à centrifuger de 50 mL. Les deux phases sont ensuite mélangées par agitation manuelle pendant 3 min et mises à l'étuve à 25 °C pendant 48 h. Après décantation, les tubes sont centrifugés (10 000 rpm, 10 min, 4 °C) pour maximiser la séparation des deux phases. Des cellules de *L. reuteri* DSM 17938, récoltées en phase stationnaire et fraîchement lavées, sont alors resuspendues dans ces phases aqueuses enrichies en molécules organiques solubilisées (à une DO égale à 12) puis mises à l'étuve à 37 °C. Des prélèvements sont effectués toutes les 15 min et l'évolution de l'état physiologique est suivie pendant 3 h par double marquage cFDA-IP et analyse par cytométrie en flux.

3.4.4 Impact du contact direct entre phase aqueuse et phase organique (*phase level toxicity*)

Bien que l'utilisation du contacteur membranaire permette de limiter le contact direct entre les phases aqueuse et organique par l'intermédiaire de sa membrane hydrophobe, l'impact de ce type de contact sur l'état physiologique des bactéries a été évalué. Au cours d'une première étude, 80 mL d'une suspension cellulaire de *L. reuteri* DSM 17938 à DO 12 ont été mis en contact avec 80 mL de deux phases organiques extractantes testées au cours de l'étude (100 % v/v décanol et 80 % v/v décanol + 20 % v/v TOA) dans des flacons Scott de 250 mL. La phase aqueuse est alors agitée doucement (500 rpm) au moyen d'un barreau aimanté et d'un agitateur magnétique de manière à renouveler l'interface sans provoquer de mélange des deux phases (Figure II.3.3). Dans cette configuration, la surface de contact entre les deux phases est de 36 m².m⁻³ de phase aqueuse. Des prélèvements de phase aqueuse sont effectués toutes les 15 min pendant 3 h et l'état physiologique des bactéries caractérisé par double marquage cFDA-IP et analyse par cytométrie en flux.

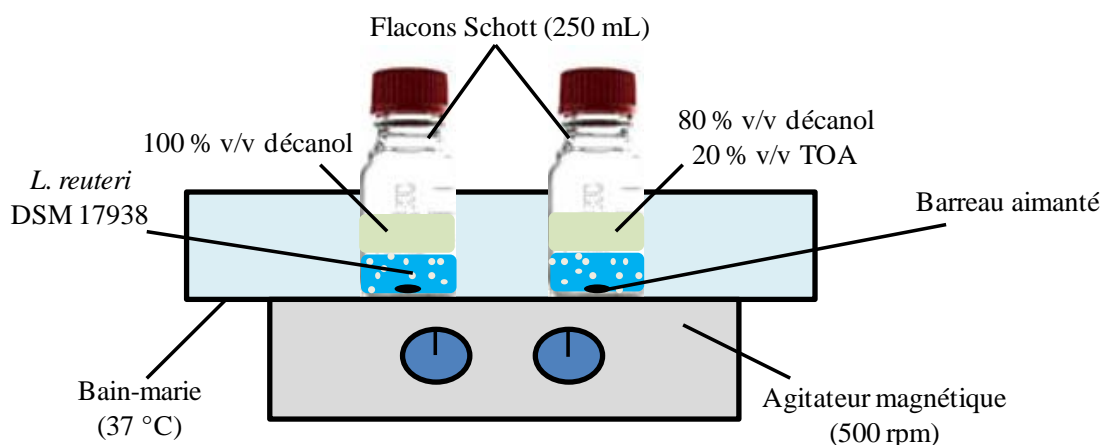


Figure II.3.3 : Schéma du montage expérimental pour la détermination de la *phase level toxicity* en flacons Schott.

Afin d'étudier l'impact d'un contact entre les deux phases au niveau des pores de la membrane du module membranaire utilisé, la même étude est réalisée en contacteur à membrane. Pour cela, 500 mL de phase aqueuse contenant des cellules de *L. reuteri* DSM 17938 à DO 12 sont mis en circulation dans les fibres, tandis que 500 mL de phase organique extractante composée de décaneol seul (100% v/v) ou de décaneol 80 % v/v contenant 20 % v/v de TOA sont mis en circulation dans la calandre. Les débits ($10 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la phase aqueuse et $13 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la phase organique) et pressions (0,8 et 0,4 bar côtés aqueux et organique, respectivement) du côté de la phase aqueuse et de la phase organique sont les mêmes que précédemment. Dans cette configuration, la surface de contact entre les deux phases est de $1980 \text{ m}^2\cdot\text{m}^{-3}$ de phase aqueuse. Des prélèvements de phase aqueuse sont effectués toutes les 15 min pendant 3 h, et l'état physiologique des bactéries productrices est évalué par double marquage cFDA-IP et analyse par cytométrie en flux.

4 – Synthèse chimique, caractérisation et dosage du 3-HPA

4.1 Contexte et objectifs de l'étude

Intermédiaire métabolique entre le glycérol et le 3-HP dans la voie de bioconversion et découvert en 1910 (Voisenet 1910), le 3-HPA, également connu sous le nom de reuterine, constitue une molécule d'intérêt en raison de ses nombreuses perspectives d'application (Vollenweider and Lacroix 2004). Les études réalisées sur la structure du 3-HPA ont révélé qu'en milieu aqueux cette molécule apparaissait sous différentes formes (3-HPA, 3-HPA hydraté, dimères, trimères) constituant un système complexe et dynamique (Talarico and Dobrogosz 1989, Vollenweider *et al.* 2003). Il a ensuite été montré qu'au sein de ce système, le 3-HPA était responsable de la toxicité observée envers de nombreux micro-organismes (bactéries à Gram-positif et -négatif, levures, protozoaires), et donc en partie à l'origine du caractère probiotique de *L. reuteri* (Vollenweider *et al.* 2010, Schaefer *et al.* 2010).

Etant donnée l'importance que revêt cette molécule, tant d'un point de vu global pour la chimie durable, que dans le cadre de notre étude pour l'évaluation des performances de bioconversion, la mise au point de méthodes de dosages rapides et fiables s'avère nécessaire. Cependant, les méthodes décrites jusqu'à maintenant, dérivées de la méthode colorimétrique de Circle *et al.* (1945), sont relativement longues à mettre en œuvre, complexes et dangereuses puisque basées sur l'utilisation d'acroléine toxique comme standard. De plus, le 3-HPA n'est pas disponible commercialement à l'heure actuelle. Il est donc nécessaire, afin de disposer de cette molécule comme standard ou comme molécule plateforme, de la synthétiser par voie chimique ou de la récupérer en milieu aqueux suite à sa production biotechnologique.

Le but de cette étude est de proposer une nouvelle voie de synthèse chimique du 3-HPA simple, rapide, efficace et sûre, de caractériser la molécule obtenue au sein de son système par différentes techniques analytiques et de montrer l'intérêt et la fiabilité d'un dosage par HPLC en comparaison aux techniques colorimétriques existantes. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication, parue dans *RSC Advances* (2015).

4.2 3-Hydroxypropionaldehyde (3-HPA) quantification by HPLC using synthetic acrolein-free 3-hydroxypropionaldehyde system as analytical standard
Publication parue dans *RSC Advances* (Burgé *et al.* 2015c)

Résumé :

Une nouvelle voie de synthèse chimique du 3-HPA à partir de 1,2,4 butanetriol disponible commercialement a été développée. Cette méthode, simple (une étape seulement), rapide (temps de réaction entre 2,5 et 6 h selon le solvant utilisé) et efficace (rendement maximal de 70 %) présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes colorimétriques décrites antérieurement, notamment grâce à une mise en œuvre plus sûre, tant pour le manipulateur que pour l'environnement, et une spécificité plus importante de la réaction. Contrairement à d'autres types de synthèse, aucune trace d'acroléine (un produit toxique issu de la déshydratation du 3-HPA) n'est retrouvée dans l'échantillon.

Le produit synthétisé a ensuite été caractérisé par différentes techniques analytiques complémentaires (HESI-MS, GC-MS, RMN ^1H et ^{13}C , FTIR et HPLC), mettant en évidence la présence d'un système complexe composé de 3-HPA mono-, di-, tri- et tétramérique en solution. Les résultats du dosage par HPLC ont ensuite été comparés à l'une des méthodes de dosage colorimétrique dérivée de celle décrite par Circle *et al.* (1945), confirmant l'intérêt et la fiabilité de la méthode chromatographique mise au point pour le dosage du 3-HPA en milieu aqueux.

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 92619

3-Hydroxypropionaldehyde (3-HPA) quantification by HPLC using a synthetic acrolein-free 3-hydroxypropionaldehyde system as analytical standard†

G. Burgé,^{‡abc} A. L. Flourat,^{‡ade} B. Pollet,^{bc} H. E. Spinnler^{bc} and F. Allais^{*abc}

HPLC-based quantification of 3-HPA using a synthetic acrolein-free 3-HPA standard obtained from commercially available 1,2,4-butanetriol through a straightforward and easy synthetic process has advantages over previous colorimetric methods of easier and safer implementation, and greater specificity. This HPLC method is very simple to implement in a lab, does not need any extra handling of the sample to be analyzed, and is suitable even in the presence of other aldehydes and 3-HPA derivatives, provided that the latter do not have similar retention times.

Received 7th September 2015

Accepted 20th October 2015

DOI: 10.1039/c5ra18274c

www.rsc.org/advances

Introduction

3-Hydroxypropionaldehyde (aka 3-HPA, β -hydroxypropionaldehyde, reuterin) was originally discovered in 1910 by Voisenet.¹ Its formation was observed during bacterial spoilage of wine by *Bacillus amaracrylus* (now classified as *Paenibacillus polymyxa*). Voisenet assumed that 3-HPA was produced by dehydration of glycerol, which was later confirmed by Abeles.² 3-HPA is a viscous and colorless liquid with a slightly acrid smell. Nowadays, the name reuterin is used as a synonym for 3-HPA. This molecule exhibits powerful antimicrobial activity against many pathogenic microorganisms (Gram-positive and Gram-negative, yeast, protozoa),³ particularly into the gastrointestinal tract.⁴ Minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) were determined for several intestinal bacteria, showing that they were very sensitive to this molecule.⁵ 3-HPA therefore participates, at least in part, on the *L. reuteri* probiotic behavior,⁶ which was confirmed by randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical studies.⁷ 3-HPA may also cause oxidative stress in cells, by reacting with thiol groups of proteins, enzymes and small molecules. However, the mechanisms responsible for this toxicity have not been

identified yet.⁸ 3-HPA finds also use as a food preservative and as a therapeutic auxiliary agent in the pharmaceutical industry.⁹

In addition, 3-HPA is a platform chemical of considerable industrial interest as it can be relatively easily converted into a number of commodity chemicals. It can be dehydrated to acrolein then oxidized to acrylic acid. 3-HPA can also be reduced to 1,3-propanediol (1,3-PDO) through the Degussa and Shell processes,¹⁰ or oxidized to 3-hydroxypropionic acid (3-HP) to produce malonic acid. All these molecules are starting materials for polymers and therefore of great interest for the industrial applications. Given the potential of this building block, biotechnological production of 3-HPA from glycerol is therefore being intensively studied¹¹ and commercial production is expected to start in the near future. The biotechnological production of 3-HPA by *Lactobacillus reuteri* is initiated during the stationary growth phase, in the presence of glycerol as substrate.¹²

In water, 3-HPA system is made of several monomeric and oligomeric components that exist in a dynamic equilibrium, and depends upon the set conditions (Fig. 1). For example, studies on the structure of 3-HPA showed that 3-HPA in water is part of a concentration- and pH-dependent dynamic system and revealed that at high concentrations (4.9 M), the 3-HPA system was predominantly composed of 3-HPA dimer along with acrolein and unspecified HPA derivatives.¹⁰

Given the great interest of 3-HPA, analytical methods for quantification of 3-HPA were developed using MIC (Minimum Inhibitory Concentration, calculated from the highest dilution showing a complete inhibition of the tested strain),⁸ colorimetry and HPLC. Although being one of the most used methods, MIC assay has a major drawback as it only provides relative 3-HPA concentrations expressed in arbitrary units (units 3-HPA mL⁻¹). Indeed, there is a definite advantage for using methods allowing

*Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI), AgroParisTech, F-51100 Reims, France. E-mail: florent.allais@agroparistech.fr; Tel: +33 326364368

^aAgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), F-78850 Thiverval-Grignon, France

^cINRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), F-78850 Thiverval-Grignon, France

^dAgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), F-78026 Versailles Cedex, France

^eINRA, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), F-78026 Versailles Cedex, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ra18274c

‡ These authors contributed equally to this work.

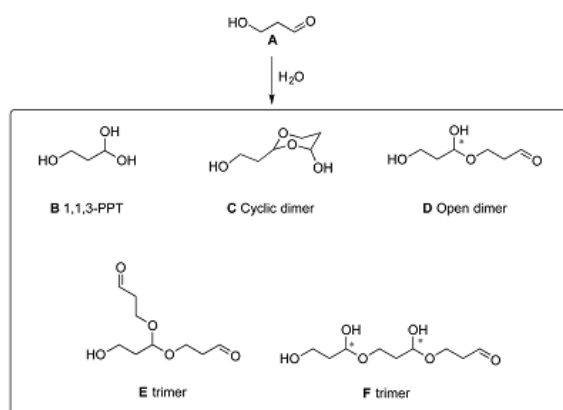


Fig. 1 3-HPA system: (A) 3-HPA monomer, (B) 3-HPA hydrate (aka 1,1,3-trihydroxypropane, 1,1,3-propanetriol or 1,1,3-PPT), (C) 3-HPA cyclic dimer (2-(2-hydroxyethyl)-4-hydroxy-1,4-dioxane), (D) 3-HPA open dimer, (E) and (F) 3-HPA trimers.

the determination of defined molar 3-HPA concentrations. To access the latter, colorimetric methods can be used.^{13–15} They all consist in transforming the complex 3-HPA system (monomers and oligomers) into acrolein by dehydrating 3-HPA, thus preventing the formation of the dynamic system. Acrolein is then further converted to UV absorbing compounds allowing its quantification through colorimetry. Though they allow the determination of the total amount of 3-HPA (mol L^{-1}), these methods have two main drawbacks. Not only they require extra handling of the samples and the use of harsh conditions (toxic or harmful reagents), but they also do not distinguish between 3-HPA and eventual other aldehydes – such as acrolein – originally present in the samples, thus leading to inaccurate values. HPLC-based analytical methods were also reported,³ however pure 3-HPA (or 3-HPA system) analytical standards being not readily available from common chemical suppliers, such method requires preparing them before performing the analyses. Up to now, pure 3-HPA aqueous samples were obtained through bioconversion of glycerol using *Lactobacillus reuteri*,³ followed by purification of the resulting fermentation broth involving semi-preparative HPLC^{3a} or flash chromatography on silica gel¹⁰ to remove contaminants (*e.g.*, glycerol, 1,3-PDO, acrolein). Though effective, semi-preparative HPLC and silica gel chromatography provide 3-HPA in small quantity or with relatively low yield (45%), respectively. In view of these considerations, the preparation of pure, acrolein- and water-free 3-HPA standard in high yield through a scalable chemical synthesis under mild conditions appeared as a simpler and faster alternative. The main objectives of the present work were therefore to (i) design a straightforward and efficient chemical synthesis of 3-HPA that could be either easily implemented in an analytical chemistry laboratory, or used by a chemical supplier to produce commercial 3-HPA standards, (ii) fully characterize pure synthetic compound using ¹³C NMR, HPLC, GC-MS, LC-MS and FT-IR, as well as (iii) use it to develop a reliable quantitative analytical method using HPLC.

Experimental section

Materials and methods

Chemicals (1,2,4-butanetriol, sodium periodate, acrolein (>99.0% analytical standard, 0.2% hydroquinone as stabilizer)) were purchased from Aldrich and used as received. Reagent grade solvents were purchased from ThermoFisher Scientific. Deuterated chloroform (CDCl_3) was purchased from Euriso-top.

Instrumentation

Evaporations were conducted under reduced pressure at temperature below 25 °C to avoid 3-HPA evaporation. Column chromatography was carried out with an automated flash chromatography system (PuriFlash 4100, Interchim) and pre-packed INTERCHIM PF-30SI-HP columns (30 μm silica gel).

IR and UV-Visible analyses were performed on Cary 60 UV-VIS and Cary 630 FT-IR from Agilent technologies, respectively.

HESI-MS analyses were performed on a Q-Exactive (ThermoFischer Scientific) at a flow rate of 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ in positive mode. The electrospray voltage was set to 3.70 kV, the S lens RF level was set to 55 V. The sheath auxiliary and sweep gas (nitrogen) flow rates were set to 30, 10 and 0 arbitrary units, respectively. The capillary and heater temperatures were set to 320 and 50 °C, respectively. Mass spectra were recorded from m/z 50 to m/z 300 at a resolution of 70 000.

GC-MS analyses were performed on a Varian 1200 (quadrupole) equipped with a DB5-MS capillary column 30 \times 0.25 mm, 0.25 μm film thickness (J and W scientific), operated in the temperature program (from 40 °C held 1 min to 80 °C at +30 °C min^{-1} , then 80 to 250 °C at +3 °C min^{-1}), with helium as carrier gas (constant flow 1.2 mL min^{-1}), injector at 260 °C operating in splitless mode and a transfer line to MS at 280 °C. The mass spectral analyses were run with a quadrupole in positive mode (electronic impact, 70 eV).

NMR analyses were performed on a Bruker Fourier 300. ¹H NMR spectra of samples were recorded in CDCl_3 at 300 MHz, chemical shifts were reported in parts per million relative to the internal standard tetramethylsilane (TMS, $\delta = 0.00$ ppm). ¹³C NMR spectra of samples were recorded at 75 MHz (CDCl_3 residual signal at $\delta = 77.16$ ppm).

HPLC analyses¹² were performed on a Biorad column (300 mm \times 7.8 mm; Biorad, Richmond, USA) equipped with an Aminex HPX-87H Guard column (30 mm \times 4.6 mm; Biorad) at 50 °C eluted with aqueous H_2SO_4 (0.005 M) at a flow rate of 0.6 mL min^{-1} (Waters 717 plus autosampler; Waters Associates, Millipore, Molsheim, France). Detection was performed by a refractometer (Waters 2414 refractive index) and a UV spectrophotometer (Waters 2489 UV) at 210 nm. Results were processed by Empower software (Waters Associates).

Procedure for the synthesis of synthetic 3-HPA system

1,2,4-Butanetriol (1.0 g, 9.4 mmol, 1 equiv.) was dissolved in acetone, THF or 1,4-dioxane (190 mL, $C = 0.05$ M). Water (4.7 mL) and sodium periodate (8.0 g, 37.6 mmol, 4 equiv.) were then added, and the mixture was magnetically stirred at 1100 rpm at room temperature. Reaction was followed by TLC (9/1

ethyl acetate/methanol) until completion. The crude mixture was then filtered on Celite® and the latter washed with 1,4-dioxane. The solvent was removed under reduced pressure, and the crude oil was purified by flash chromatography (100% ethyl acetate) to provide 3-HPA as a colorless viscous oil.

Heated electrospray ionization mass spectrometry (HESI-MS) analysis

The characterization of the 3-HPA system was determined by heated electrospray ionization mass spectrometry (HESI-MS). The sample was dissolved in pestipur grade acetonitrile to obtain a solution with a concentration about 10 ng μL^{-1} , then filtered through a 0.22 μm pore-size filter in nylon (Millipore). The sample was infused into the HESI source of the mass spectrometer.

Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis

Analyses of the 3-HPA system were performed on a gas chromatograph coupled to an electronic impact mass spectrometer and fitted with a 30 m \times 0.25 mm HP5 capillary column (film thickness: 0.25 μm). Extracted sample product was dissolved in pestipur grade dichloromethane to obtain a solution with a concentration of about 1 $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$, then dried over anhydrous sodium sulfate. 5 μL of dried sample solution were silylated in presence of 50 μL of *N,O*-bis-trimethyl-trifluoroacetamide and 5 μL of pyridine (one night at room temperature) before injection onto the GC-MS system.

^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) analysis

20 mg of synthetic 3-HPA system, after purification, was dissolved in CDCl_3 .

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis

To obtain calibration curves, synthetic 3-HPA was diluted in water at different concentrations. Samples were filtered through a 0.22 μm pore-size filter in nylon (Millipore). Citric acid was used as internal standard and added at 50% (v/v) to the samples before HPLC analysis (20 μL aliquot was injected).

3-HPA system quantification by colorimetric method

The assay for 3-HPA content was based on the colorimetric method of Circle *et al.* (1945),¹³ modified by Lüthi-Peng *et al.* (2002).¹⁴ To obtain standard curves, 5.6–280 mg L^{-1} of acrolein (>99.0% analytical standard, 0.2% hydroquinone as stabilizer, Sigma-Aldrich) in water and 3.9–780 mg L^{-1} of freshly diluted 3-HPA system in water were supplemented with 0.75 mL of DL-tryptophan (Sigma-Aldrich) solution (0.01 M solution in 0.05 M HCl) and 3.0 mL of 37% HCl were added immediately. For 3-HPA quantification, a 1 mL sample was mixed with 0.75 mL of DL-tryptophan (Sigma-Aldrich) solution and 3 mL of HCl 37%. Mixtures containing samples and standards were incubated for 20 min at 37 °C and the optical density was measured at 560 nm (OD_{560}). If necessary, samples were diluted with the same medium to ensure an $\text{OD}_{560} < 1.8$.

Results and discussion

Production and purification of synthetic 3-HPA

The most commonly used chemical method for producing 3-HPA is the catalytic hydration of acrolein under strong acidic conditions.¹⁶ However, it results in modest yields with many contaminants. Herein, we report the one-step synthesis and study of 3-HPA from commercially available biobased 1,2,4-butanetriol. This precursor is chemically produced *via* hydrogenation of malate¹⁷ or can be synthesized by bioconversion¹⁸ starting from xylose (*E. coli*) or arabinose (*Pseudomonas fragi*). These microbial syntheses relied on the creation of biosynthetic pathways that do not exist in nature. The aim of this study was to convert 1,2,4-butanetriol to 3-HPA by oxidative cleavage of the 1,2-diol in presence of sodium periodate (Fig. 2). The reaction was carried out at room temperature and did not need the use of an inert atmosphere. Different solvents were tested in order to evaluate their impact on reaction time (determined by TLC) and final yield (Table 1). To limit formation of oligomers, reaction media was very dilute ($C = 0.05 \text{ M}$). Solubility of sodium periodate proved to be a critical factor for the kinetic of oxidation. The more soluble sodium periodate is, the faster the reaction (*i.e.*, 2.5, 4 and 6 h for THF, acetone and 1,4-dioxane, respectively) (Table 1). Event though it required longer reaction time, 1,4-dioxane was the solvent of choice as large amount of salts were still present for reaction performed in acetone and THF, despite many filtration/evaporation cycles. It is noteworthy to mention that, due to its low molecular weight, 3-HPA is easily evaporated during sample concentration. To prevent this phenomenon, the water bath of rotavapor needs to be maintained at 25 °C (or below).

Crude 3-PA was then purified by flash chromatography on silica gel. Ethyl acetate was used as eluent because of its high polarity, low toxicity, and its inactivity towards aldehydes. Isolated spot of 3-HPA ($R_f = 0.58$ with 9/1 ethyl acetate/methanol) was actually composed of monomeric, dimeric and few trimeric forms, as identified by NMR spectroscopy and GC-MS.

To summarize, these quick and simple synthetic and purification procedures allowed 3-HPA to be obtained in very good yield (70%) through a one-step synthetic pathway without any

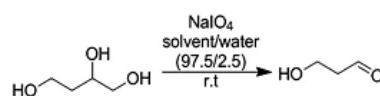


Fig. 2 Oxidative cleavage of 1,2,4-butanetriol into 3-hydroxypropionaldehyde.

Table 1 Impact of solvent on reaction yield

Solvent	Reaction time (h)	Yield (%)
Acetone	4	30
THF	2.5	28
1,4-Dioxane	6	70

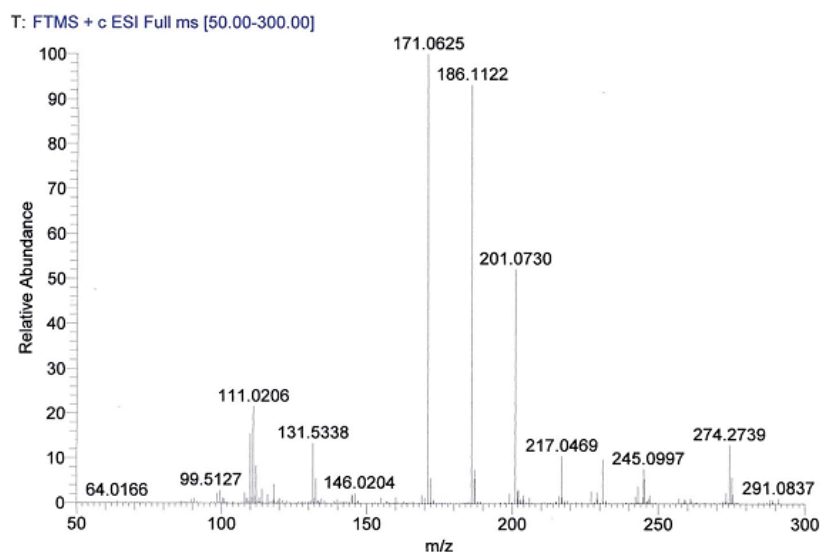


Fig. 3 HESI-MS spectrum of purified 3-HPA ($100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) in acetonitrile. m/z values of 23, 39, 55, 71, 87, 119, and 141 correspond to 3-HPA and its derivatives and their Na^+ , K^+ , $\text{CH}_3\text{CN} + \text{Na}^+$, and $\text{CH}_3\text{CN} + \text{K}^+$ adducts. A detailed description of the m/z values is given in Table 2.

Table 2 m/z values of synthesized 3-HPA system ($100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) in acetonitrile measured by HESI-MS

3-HPA	3-HPA dimer (C)	3-HPA trimer (E)	3-HPA trimer (F)
74 [$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$]	148 [$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4$]	204 [$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_8$]	222 [$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_6$]
97 [$+\text{Na}^+$]	171 [$+\text{Na}^+$]	227 [$+\text{Na}^+$]	245 [$+\text{Na}^+$]
113 [$+\text{K}^+$]	187 [$+\text{K}^+$]	243 [$+\text{K}^+$]	261 [$+\text{K}^+$]
138 [$+\text{CH}_3\text{CN} + \text{Na}^+$]	212 [$+\text{CH}_3\text{CN} + \text{Na}^+$]	268 [$+\text{CH}_3\text{CN} + \text{Na}^+$]	286 [$+\text{CH}_3\text{CN} + \text{Na}^+$]
154 [$+\text{CH}_3\text{CN} + \text{Na}^+$]	228 [$+\text{CH}_3\text{CN} + \text{K}^+$]	284 [$+\text{CH}_3\text{CN} + \text{K}^+$]	302 [$+\text{CH}_3\text{CN} + \text{K}^+$]

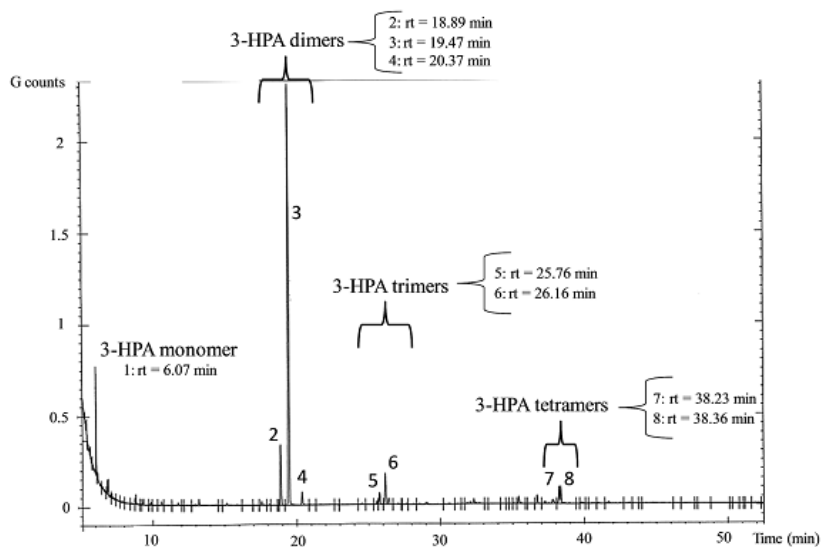


Fig. 4 GC-MS chromatogram of 3-HPA system. Identification of each peak has been made thanks to the mass spectrum of each trimethylsilyl derivative (see ESI†). The peaks with retention times around 6, 20, 25 and 38 minutes correspond to 3-HPA monomer, 3-HPA dimers, 3-HPA trimers and 3-HPA tetramers, respectively.

temperature or atmosphere regulation. This method can be easily scaled-up if larger amounts of 3-HPA are needed. It is also noteworthy to mention that, sealed under nitrogen and stored in a freezer (4 °C), this synthetic 3-HPA can be used over a long period of time (*ca.* 6 months). In addition, in water for concentrations between 0.5 and 10 g L⁻¹ and without citric acid, no change in signal area and calibration curve coefficients has been observed for both IR and UV detections over several weeks, demonstrating that no deterioration of synthetic 3-HPA system was observed for several weeks.

Synthetic 3-HPA system characterization by HESI-MS

Analysis of 10 ng μL⁻¹ 3-HPA solution in acetonitrile with HESI-MS (Fig. 3) showed signals for compounds with a *m/z* of $n \times 74$ (n integer: 1, 2 or 3) corresponding to 3-HPA monomers, dimers, trimers, as well as signals for their Na⁺ and K⁺ adducts. It is noteworthy that 3-HPA hydrate could not be detected with this method. Table 2 gives the mass to charge (*m/z*) ratio of the components of the 3-HPA system. Under these conditions, the 3-HPA dimer was the most ionized form of 3-HPA as shown by peaks with the highest intensity with *m/z* of 171 corresponding to the sodium adduct of 3-HPA dimer ([C₆H₁₂O₄Na]⁺). Smaller amounts of monomeric 3-HPA (*m/z* 74 + 23 = 97 and *m/z* 74 + 39 = 113), 3-HPA trimer (*m/z* 222 + 23

= 245) were also found in the mixture and observed in the spectrum. Conversely, acrolein ($M = 56 \text{ g mol}^{-1}$, $m/z 56 + 23 = 79$) was not detected in the synthesized 3-HPA system.

Synthetic 3-HPA system characterization by GC-MS

In the total ion current (Fig. 4), several forms of 3-HPA (monomeric 3-HPA at 6.1 min, 3-HPA dimers between 18.9 and 20.3 min, 3-HPA trimers between 25.8 and 26.2 min and 3-HPA tetramers at 38.3 min) can be observed. Under these conditions, the 3-HPA dimers were the most abundant. The spectra corresponding to the different species are shown in the additional data. Results thus confirm that dimers are the major components of the 3-HPA system.

3-HPA system characterization by FT-IR

In infrared spectra (Fig. 5), in addition to the aldehyde band (1714 cm⁻¹), bands in the ether area confirmed a dynamic system rather than pure 3-HPA as these bands correspond to the acetals and hemiacetals belonging to dimeric and trimeric forms (Fig. 5). Furthermore, no alkene band (around 1650 cm⁻¹) has been detected, confirming the absence of acrolein (Table 3).

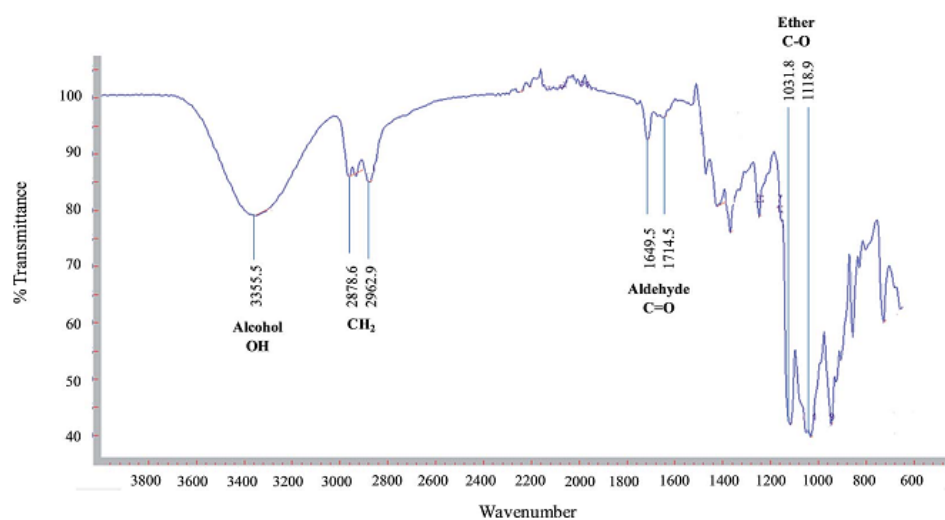


Fig. 5 FT-IR analysis of 3-HPA system after purification by flash chromatography on silica gel. The sample purity was tested by HESI-MS and GC-MS analyses before FT-IR analysis. The transmittance of the major functional groups of 3-HPA system are noted.

Table 3 Identification of characteristic vibration bands

Wavelength (cm ⁻¹)	Groups	Bonding	Vibration type
3355.5	Alcohol	Hydrogen bonded OH	Stretch
2962.9–2878.6	Alkanes	CH ₂	Stretch
1714.5	Aldehyde	C=O	Stretch
1247.7–1368.7–1424.3	Alcohol	O–H	Bend
947.8–1031.8–1118.9	Ether (hemiacetal and acetal)	C–O	Stretch

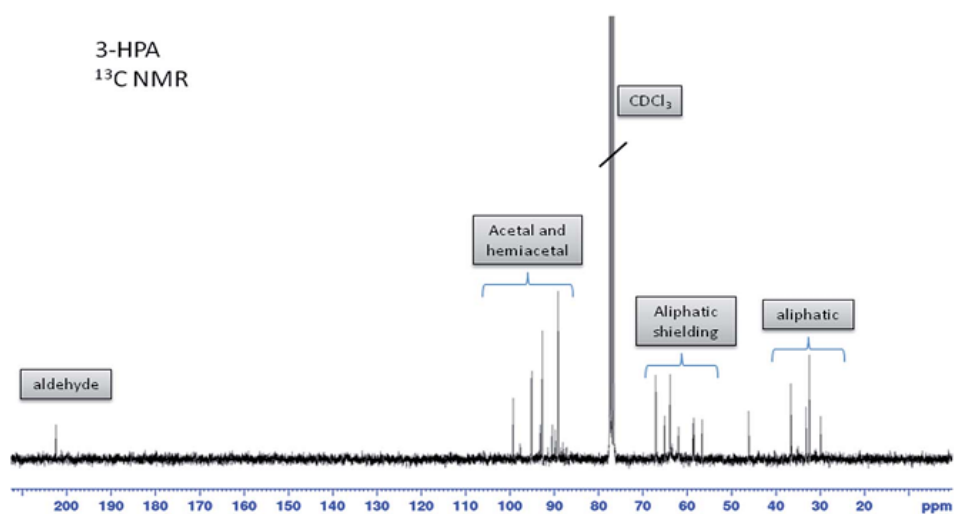


Fig. 6 ^{13}C NMR spectrum of pure synthetic 3-HPA system in CDCl_3 .

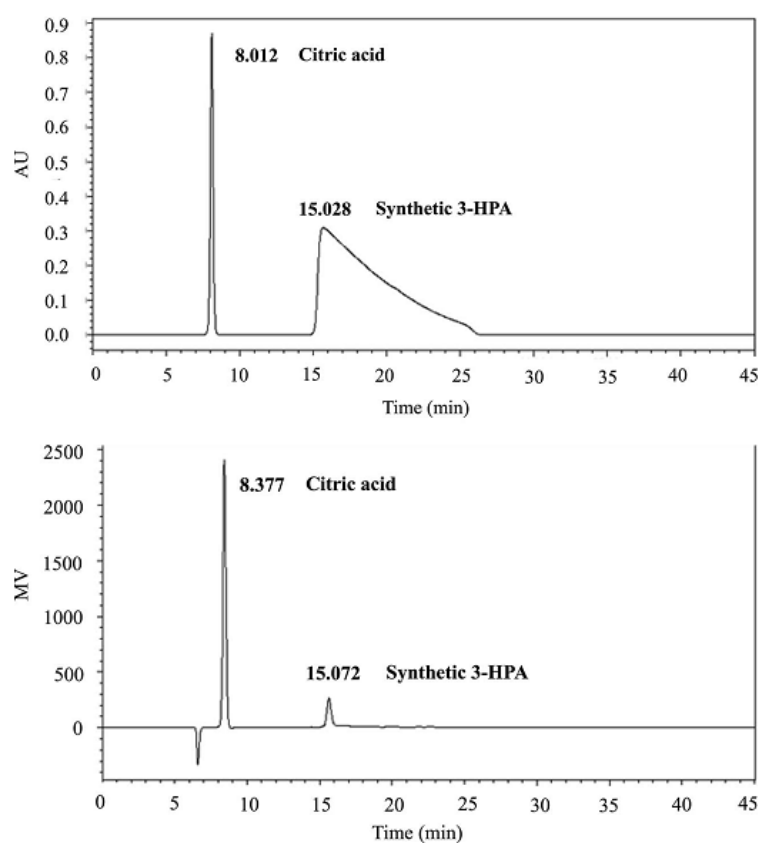


Fig. 7 Analysis of 3-HPA by HPLC (distilled water supplemented with 4 g L^{-1} of synthetic 3-HPA system). Chromatogram obtained by (Top) Refractive Index detection and (Bottom) UV detection at 210 nm. Citric acid solution ($C = 5\text{ mM}$) was used as internal standard and added at 50% (v/v) to the sample before HPLC analysis.

Synthetic 3-HPA system characterization by ^1H & ^{13}C NMR

Monomer analysis. ^1H NMR (ppm, CDCl_3 , 300 MHz) δ = 2.75 (td, J = 5.4 Hz and 0.9 Hz, H_2), 3.95 (m, H_3), 9.86 (t, J = 0.9 Hz, H_1).

It is noteworthy to mention that the chemical shifts obtained here are in accordance with those reported by Kächele *et al.*²⁰ (^1H NMR in D_2O at 400 MHz: 2.78, 3.96 and 9.74 respectively).

^{13}C NMR (ppm, CDCl_3 , 75 MHz) δ = 46.1 (t, C_2), 56.6 (t, C_3), 202.4 (d, C_1).

Dimers and trimers analysis. ^{13}C NMR (ppm, CDCl_3 , 75 MHz): between 88 and 100 ppm: C belonging to acetal and hemiacetal; between 57 and 68 ppm: $\text{CH}_2\text{-OH}$; between 29 and 37 ppm: $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}$.

In the acetal and hemiacetal areas (88–100 ppm, Fig. 6), various signals can be distinguished. They correspond to 1,1,3-PPT (B), the two diastereomers of the cyclic dimer (C), the opened dimer (D) and the trimers (E) and (F) (Fig. 1).

In addition, the major signal in the aldehyde area (see ^1H NMR in ESI †) corresponds to monomeric 3-HPA as proved by the correlations in 2D NMR spectra (see ESI †). In accordance with the literature,^{14,19} the four most intense signals observed in the acetal area (89.1, 92.7, 95.1 and 99.2 ppm) belong to the two diastereomers of cyclic dimer (C), demonstrating that cyclic dimer (C) is the most abundant form in our conditions. The other signals probably belong to 1,1,3-PPT (B), the open dimer (D) and trimers (E) and (F). No signal corresponding to the double bond of acrolein (around 140 ppm) was detected. This irrefutably demonstrates that no dehydration of 3-HPA into acrolein occurs during this chemical synthesis.

Synthetic 3-HPA system characterization by HPLC and its use as analytical standard for the quantification of 3-HPA in fermentation broth using HPLC

As the efficient separation and analysis of glucose, glycerol, formate, lactate, ethanol, 1,3-PDO, 3-HP and 3-HPA by HPLC using RI detection was already reported in the literature,¹² the conditions published were used to assess the suitability of the synthetic 3-HPA system as analytical standard. Under these conditions, retention times of 3-HPA system and citric acid (internal standard) were: citric acid (8.01 and 8.38 min by UV and RI detectors, respectively), 3-HPA system (15.03 and 15.07 min with UV and RI detectors, respectively).

On the RI chromatogram (Fig. 7 Top), only one peak (retention time = 15.07 min) was obtained. On the contrary, on the UV chromatogram (Fig. 7 Bottom), at least two peaks were obtained (retention times = 15.03 and 27.34 min), indicating that at least two forms of 3-HPA were detected. The unexpected asymmetric shape of the peak is probably due to the dynamic equilibrium between the different forms of 3-HPA system. Unfortunately, despite many attempts (modification of column temperature and/or mobile phase flow), we were not able to improve further the resolution of the peaks in UV detection.

The linearity of the method was assessed by analytical curves of 3-HPA system with citric acid as internal standard for both detections (RI and UV). The calibration curves obtained showed linear regression with R^2 coefficients >0.999 in the

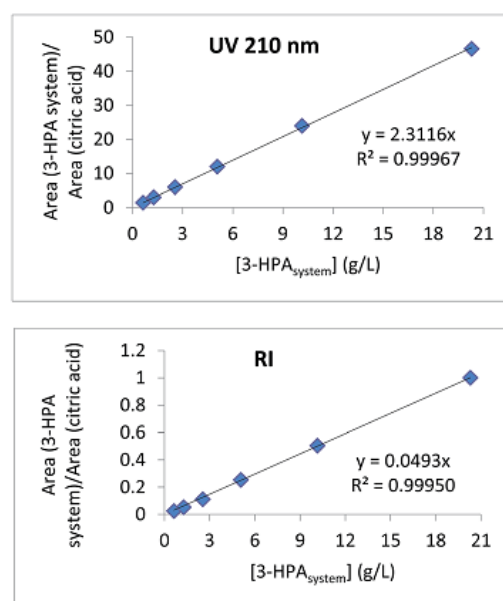


Fig. 8 Quantification using HPLC of synthetic 3-HPA system by (Top) UV detection at 210 nm and (Bottom) Refractive Index detection.

concentration range tested (Fig. 8). Repeatability was evaluated by measuring intra-day and inter-day variations of one sample 5 times in one day and in triplicate for three consecutive days. The overall intra- and inter-day relative standard deviations were less than 1.3% and 1.8%, respectively. This analytical method is

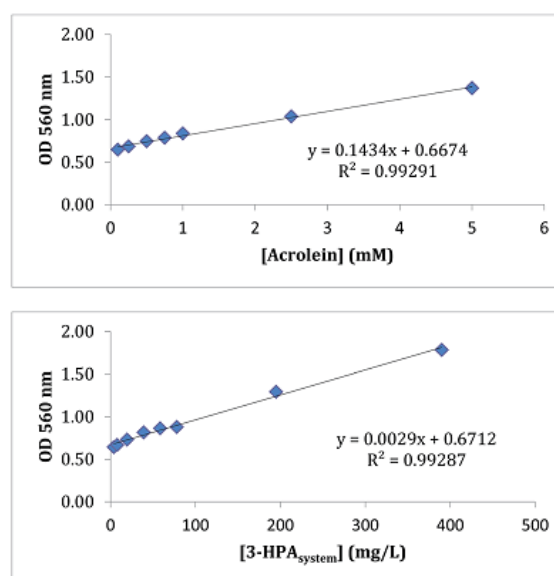


Fig. 9 Calibration curves obtained for (Top) aqueous acrolein solutions and (Bottom) aqueous synthetic 3-HPA system, using L uthi-Peng's method.

Table 4 Quantification of 3-HPA in two fermentation broths

Sample	[3-HPA] ^a using HPLC				[3-HPA] ^a using colorimetry		Difference (%)
	UV		RI		mmol L ⁻¹	g L ⁻¹	
	mmol L ⁻¹	g L ⁻¹	mmol L ⁻¹	g L ⁻¹			
Broth 1	165.42	12.25	161.98	12.00	169.06	12.52	4.2% (RI) – 2.2% (UV)
Broth 2	191.48	14.18	172.50	12.78	175.73	13.02	1.8% (RI) – 9.0% (UV)

^a [3-HPA] in g L⁻¹ is obtained by multiplying [3-HPA] in mol L⁻¹ by 74.08 g mol⁻¹ ($M_{(3\text{-HPA})}$).

therefore appropriate for the detection and quantification of 3-HPA system.

To demonstrate that synthetic 3-HPA system can be used as analytical standard to quantify efficiently and effectively 3-HPA using HPLC, we realized the following experiments (Fig. 9). Using Lüthi-Peng's method,¹⁴ a calibration curve of the optical density at 560 nm ($OD_{(560\text{ nm})}$) for different concentrations of the synthetic 3-HPA system in water (mg L^{-1}) was obtained and provided the following equation:

$$OD_{(560\text{ nm})} = 0.0029 [\text{3-HPA system}] + 0.6712 \quad (1)$$

The same methodology was then applied on aqueous acrolein solutions (mmol L^{-1}) at different concentrations and gave the following equation:

$$OD_{(560\text{ nm})} = 0.1434 [\text{acrolein}] + 0.6674 \quad (2)$$

Using the two equations above, the concentration of the 3-HPA system ([3-HPA system] in mg L^{-1}) can now be correlated to the actual quantity of 3-HPA in the synthetic 3-HPA system ([3-HPA] in mmol L^{-1}) knowing that [acrolein] = [3-HPA] and with the approximation that the two curves have the same intercept:

$$[\text{3-HPA}] = (0.0029/0.1434) [\text{3-HPA system}] \quad (3)$$

$$[\text{3-HPA}] = 0.0202 [\text{3-HPA system}] \quad (4)$$

$$[\text{3-HPA}] = [\text{3-HPA system}]/49.4483 \quad (5)$$

It is noteworthy to mention that 49.4483 g mol⁻¹ is lower than the molecular weight of monomeric 3-HPA (*i.e.*, 74.0790 g mol⁻¹) which is consistent with the fact 3-HPA is in the form of a mixture of oligomers.

Using eqn (5) and the above calibration curves (Fig. 8 and 9), two different fermentation broths containing 3-HPA have been analyzed using both methods (*i.e.*, HPLC and Lüthi-Peng's). Results are reported in Table 4.

In summary, even though synthetic 3-HPA system is a complex mixture, it can be used as analytical standard to reliably quantify 3-HPA using HPLC. However, because of the less resolved peak in UV detection, more reliable data are obtained with RI detection. This HPLC method based on the use of synthetic 3-HPA has been recently applied to monitor 3-HPA in a study dedicated to the production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains.²¹

Conclusion

Herein, we propose an efficient and straightforward procedure to synthesize and purify an acrolein- and water-free 3-HPA system in high yield and in only one-step from commercially available 1,2,4-butanetriol under mild conditions (*e.g.*, room temperature, atmospheric pressure). NMR, HPLC and IR analyses confirmed that acrolein was not produced during the course of the chemical reaction. Analyses also indicated that the dimeric form (C) was predominant in the 3-HPA system among several multimeric forms which is consistent given that the composition of the 3-HPA systems is concentration dependent.

This pure synthetic 3-HPA system was then successfully used as analytical standard and allowed a reliable quantitative analysis of 3-HPA using HPLC. Unlike the HPLC and colorimetric methods used so far to quantify 3-HPA, this HPLC method based on synthetic 3-HPA is very simple to implement in a lab, does not need any extra handling of the sample to be analyzed, and is suitable even in the presence of other aldehydes and 3-HPA derivatives, provided that the latter do not have similar retention times.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all named authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Region Champagne-Ardenne, the Conseil Général de la Marne and Reims Métropole for their financial support.

References

- M. E. Voisenet, *C. R. Acad. Sci., Ser. Gen. Vie Sci.*, 1910, **150**, 1614–1616.
- R. H. Abeles, A. M. Brownstein and C. H. Randles, *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **41**, 530–531.
- (a) T. L. Talarico, I. A. Casas, T. C. Chung and W. J. Dobrogosz, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, **32**,

- 1854–1858; (b) J. K. Spinler, M. Taweechoitipatr, C. L. Rognerud, C. N. Ou, S. Tumwasorn and J. Versalovic, *Anaerobe*, 2008, **14**, 166–171.
- 4 W. J. Dobrogosz, I. A. Casas, G. A. Pagano, B. M. Sjöberg, T. L. Talarico and M. Karlsson, *Lactobacillus reuteri and the enteric microbiota in the regulatory and protective role of the normal microflora*, ed. R. Grubb, T. Midtvedt and E. Norin, Macmillan Press Ltd., London, 1989.
- 5 V. Cleusix, C. Lacroix, S. Vollenweider, M. Duboux and G. Le Blay, *BMC Microbiol.*, 2007, **7**, 101.
- 6 I. A. Casas and W. J. Dobrogosz, *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2000, **12**, 247–285.
- 7 N. Valeur, P. Engel, N. Carbajal, E. Connolly and K. Ladefoged, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 1176–1181.
- 8 L. Schaefer, T. A. Auchtung, K. E. Hermans, D. Whitehead, B. Borhan and R. A. Britton, *Microbiology*, 2010, **156**, 1589–1599.
- 9 H. W. Sung, C. N. Chen, H. F. Liang and M. H. Hong, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1335–1347.
- 10 S. Vollenweider, G. Grassi, I. König and Z. Puhan, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 3287–3293.
- 11 (a) Q. Lüthi-Peng, F. B. Dileme and Z. Puhan, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **59**, 289–296; (b) Q. Lüthi-Peng, S. Schärer and Z. Puhan, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **60**, 73–80; (c) C. Ulmer and A. P. Zeng, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 2007, **21**, 321–326; (d) H. Krauter and K. D. Willke Vorlop, *New Biotechnol.*, 2012, **29**, 211–217.
- 12 M. G. El-Ziney, N. Arneborg, M. Uyttendaele, J. Debevere and M. Jakobsen, *Biotechnol. Lett.*, 1998, **20**, 913–916.
- 13 S. J. Circle, L. Stone and C. S. Boruff, *Ind. Eng. Chem.*, 1945, **17**, 259–262.
- 14 Q. Lüthi-Peng, S. Schärer and Z. Puhan, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **60**, 73–80.
- 15 S. Vollenweider, S. Evers, K. Zubriggen and C. Lacroix, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 10315–10322.
- 16 R. H. Hall and E. S. Stern, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 490–498.
- 17 K. N. G. Valdehuesa, H. Liu, G. M. Nisola, W. J. Chung, S. H. Lee and S. J. Park, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, **97**, 3309–3321.
- 18 W. Niu, M. N. Molefe and J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 12998–12999.
- 19 A. T. Nielsen, D. W. Moore and A. Schuetze Jr, *Pol. J. Chem.*, 1981, **55**, 1393–1403.
- 20 M. Kächele, Y. B. Monakhova, T. Kuballa and D. W. Lachenmeier, *Anal. Chim. Acta*, 2014, **820**, 112–118.
- 21 G. Burgé, C. Saulou-Bérion, M. Moussa, B. Pollet, A. L. Flourat, F. Allais, V. Athès and H. E. Spinnler, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, **177**, 923–939.

4.3 Conclusion et perspectives de l'étude

Cette étude a d'abord permis de développer une nouvelle méthode de synthèse du 3-HPA par voie chimique, en une étape à partir de 1,2,4-butanetriol, un produit disponible commercialement et potentiellement biosourcé, produit par bioconversion du xylose ou de l'arabinose ou hydrogénation du malate (Niu *et al.* 2003). La méthode de synthèse mise au point dans ce travail présente de nombreux avantages (rapidité, simplicité, sécurité). Elle est de plus facilement adaptable et réalisable en laboratoire et permet de disposer de quantités importantes de 3-HPA, stable dans le temps, alors que ce produit n'est pas disponible commercialement à l'heure actuelle. La caractérisation du produit de synthèse obtenu par différentes techniques d'analyse (HESI-MS, GC-MS, FTIR, RMN) révèle la présence, outre de la molécule d'intérêt, de dimères, trimères et tétramères de 3-HPA qui coexistent en phase aqueuse au sein d'un système dynamique complexe, le « système 3-HPA », déjà mis en évidence dans la littérature dans le cas d'une production par voie biotechnologique.

Si des méthodes de dosage du 3-HPA ont été développées (basées sur la méthode colorimétrique de Circle *et al.* 1945), la faisabilité sa quantification par HPLC n'a pas encore été démontrée, notamment en raison de la complexité du système au sein duquel le 3-HPA est présent. Notre étude a cependant montré qu'un dosage chromatographique fiable et précis, basé sur une détection par réfractométrie ou ultraviolet était possible, conduisant à des résultats similaires à ceux obtenus avec la méthode colorimétrique de référence et validant ainsi l'HPLC comme technique de référence pour le dosage de cette molécule d'intérêt.

Ces travaux constituent donc une avancée importante pour les nombreuses études concernant le 3-HPA. Ainsi, dans le cadre de l'étude de la production microbienne de 3-HP par bioconversion du glycérol, l'HPLC pourra désormais être utilisée pour doser l'ensemble des molécules présentes en solution (glycérol, 3-HPA, 3-HP et 1,3-PDO). Etant donnée l'impact délétère provoqué par le 3-HPA sur les bactéries productrices, des tests d'inhibition pourront être réalisés avec le produit synthétisé par cette nouvelle méthode. Une étude comparée de la toxicologie et de l'éco-toxicologie d'une part, et de l'impact environnemental d'autre part, de cette méthode par rapport à la méthode de référence pourrait également s'avérer intéressante pour évaluer l'apport de cette nouvelle méthode sur ces différents plans.

CHAPITRE III :

RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1 – Bioconversion du glycérol en 3-HP par voie microbienne

1.1 Croissance sur glucose et utilisation des voies métaboliques chez *L. reuteri*

1.1.1 Contexte et objectifs de l'étude

Depuis le début des années 90, l'utilisation de bactéries lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou "probiotiques" pour des applications pharmaceutiques, alimentaires ou encore en alimentation animale s'est développée. Elle représente un marché significatif et leur production de masse constitue par conséquent un enjeu pour les sociétés productrices de ferments. Les probiotiques ont été définis comme des organismes vivants qui, après avoir été ingérés dans une certaine quantité, exercent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte. Parmi ces bactéries considérées comme probiotiques, *L. reuteri* est au cœur de nombreux travaux, notamment pour comprendre l'origine de ces effets, mais aussi pour sa capacité à produire des molécules plateformes d'intérêt comme le 3-HPA. Ainsi, quelques études se sont intéressées à la phase de croissance bactérienne et à la compréhension du fonctionnement du métabolisme associé (Arsköld *et al.* 2008, van Niel *et al.* 2012). Cependant, malgré la grande variété de souches existantes, il n'existe pas d'étude comparant les performances de croissance et l'utilisation des voies cataboliques à partir du glucose au sein de l'espèce *L. reuteri*.

Le but de cette étude est donc de comparer les performances de croissance sur glucose de trois souches de *L. reuteri* afin d'étudier la variation intra-espèce, de faire le lien avec l'équilibre entre deux voies glycolytiques, la voie d'Embden-Meyerhof (EMP) et la voie des pentoses phosphates (PKP), et enfin d'émettre des hypothèses sur l'origine de cette bascule métabolique. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication parue dans le *Journal of Microbiology* (2015).

1.1.2 Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or Phospho-Ketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains

Publication parue au *Journal of Microbiology* (Burgé *et al.* 2015a)

Résumé :

Cette étude a pour but de comparer la croissance et le métabolisme du glucose de trois souches de *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016, DSM 17938, ATCC 53608). Ces bactéries lactiques d'intérêt sont utilisées pour diverses applications, notamment en tant que probiotiques, nécessitant la production de biomasse cellulaire, ou pour la production de molécules d'intérêt pour la chimie (3-hydroxypropionaldéhyde, acide 3-hydroxypropionique, 1,3-propanediol). Malgré cela, la diversité physiologique intra-espèce de métabolismes de base, comme la capacité d'acidification ou le catabolisme du glucose, n'a pas encore été étudiée en détails. Dans ce travail, la croissance et le métabolisme de trois souches représentatives de la diversité de l'espèce ont été étudiés. Les souches ont ainsi été comparées en caractérisant leur cinétique de croissance, leur cinétique d'acidification, ainsi que la consommation de glucose et la production des métabolites.

Les résultats montrent des différences significatives entre les trois souches qui s'expliquent, au moins en partie, par des modifications dans la distribution du flux de carbone entre les deux voies de consommation du glucose pendant la croissance bactérienne : la voie de la phosphoketolase (PKP) ou voie des pentoses phosphates (hétérolactique) et la voie d'Embden-Meyerhof (EMP) ou glycolyse (homolactique). Ces résultats montrent que, avec un objectif de production de biomasse, les souches DSM 20016 et DSM 17938 sont les plus performantes du point de vue cinétique. La souche DSM 17938, pour laquelle la bascule métabolique entre les voies EMP et PKP est la plus importante quand le pH diminue, permet la production d'acide lactique la plus importante ainsi que le meilleur rendement par rapport au glucose.

Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or Phosphoketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains[§]

Grégoire Burgé^{1,2,3}, Claire Saulou-Bérion^{2,3},
Marwen Moussa^{2,3}, Florent Allais^{1,2,3},
Violaine Athes^{2,3}, and Henry-Eric Spinnler^{2,3*}

¹Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI) - AgroParisTech, 247 rue Paul Vaillant Couturier, F-51100 Reims, France

²AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

³INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

(Received Jan 27, 2015 / Revised Jul 28, 2015 / Accepted Aug 13, 2015)

The aims of this study is to compare the growth and glucose metabolism of three *Lactobacillus reuteri* strains (i.e. DSM 20016, DSM 17938, and ATCC 53608) which are lactic acid bacteria of interest used for diverse applications such as probiotics implying the production of biomass, or for the production of valuable chemicals (3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid, 1,3-propanediol). However, the physiological diversity inside the species, even for basic metabolisms, like its capacity of acidification or glucose metabolism, has not been studied yet. In the present work, the growth and metabolism of three strains representative of the species diversity have been studied in batch mode. The strains were compared through characterization of growth kinetics and evaluation of acidification kinetics, substrate consumption and product formation. The results showed significant differences between the three strains which may be explained, at least in part, by variations in the distribution of carbon source between two glycolytic pathways during the bacterial growth: the phosphoketolase or heterolactic pathway (PKP) and the Embden-Meyerhof pathway (EMP). It was also shown that, in the context of obtaining a large amount of biomass, DSM 20016 and DSM 17938 strains were the most effective in terms of growth kinetics. The DSM 17938 strain, which shows the more significant metabolic shift from EMP to PKP when the pH decreases, is more effective for lactate production.

Keywords: *Lactobacillus reuteri*, microbial growth, acidification kinetics, glucose metabolism, Embden-Meyerhof pathway, Phosphoketolase pathway, lactate production

*For correspondence. E-mail: spinnler@grignon.inra.fr; Tel.: +33-1-30-81-53-87; Fax: +33-1-30-81-55-97

[§]Supplemental material for this article may be found at <http://www.springerlink.com/content/120956>.

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) constitute a heterogeneous group of Gram-positive bacteria that share the common trait of rapidly converting carbohydrates into lactate, leading to an acidification of their environment. LAB used as transformation agents for milk and other food products have several technological roles (Rodriguez *et al.*, 2012). For instance, they participate in the formation of flavors and rheological qualities of cheeses and fermented milks (Hugenholtz and Smid, 2002; Stanton *et al.*, 2005). They also extend the shelf-life of foods, lowering the pH and producing antimicrobial compounds (Gilliland, 1990; Itoh, 1992) such as lactate, bacteriocins (Hansen, 2002), reutericyclin, N-acylated tetramic acid (Cotter *et al.*, 2005). This variety of synthesized inhibitory compounds also prevents development of undesirable or pathogenic bacteria (Casas and Dobrogosz, 2000), and is at the origin of efficient protective roles of LAB in many fermented foods. These bacteria are widely distributed in natural habitats, ranging from many fermented foods to intestinal tracts of humans and mammals. Most of the LAB thus contribute to the natural population of the human gastrointestinal tract, some of them provoking a beneficial effect on the host, called the probiotic effect (Gilliland, 1990). Among these LAB, *Lactobacillus reuteri* resides in the gastrointestinal tract of humans and animals such as poultry, swine and other mammals (Casas and Dobrogosz, 2000; Savino *et al.*, 2007) and is considered as a probiotic species (Ahrné *et al.*, 1998). This bacterium is of particular interest due to its antimicrobial behavior and, which is linked to the production of a substance called reuterin (Talarico *et al.*, 1988; Morita *et al.*, 2008) explaining for a great part its probiotic mode of action. In addition, *L. reuteri* is relevant for the biotechnological synthesis of valuable chemical products and building blocks from glycerol such as 1,3-propanediol (1,3-PDO) (Talarico *et al.*, 1990; Drozdzyńska *et al.*, 2011), 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) (Lüthi-Peng *et al.*, 2002a, 2002b; Vollenweider *et al.*, 2003; Doleyres *et al.*, 2005; Rütli *et al.*, 2011) or 3-hydroxypropionic acid (3-HP) (Jiang *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2011).

Various species of LAB employ different glycolytic pathways to metabolize carbohydrates (glucose, fructose, sucrose...) into the common, three-carbon intermediate stage of glycolysis (dihydroxyacetone phosphate, glyceraldehyde 3-phosphate, pyruvate...). Homofermentative LAB convert carbohydrates into lactate as an end-product using the Embden-Meyerhof pathway (EMP), whereas heterofermentative LAB produce lactate, acetate, ethanol and carbon dioxide using the phosphoketolase pathway (PKP). When fructose was pre-

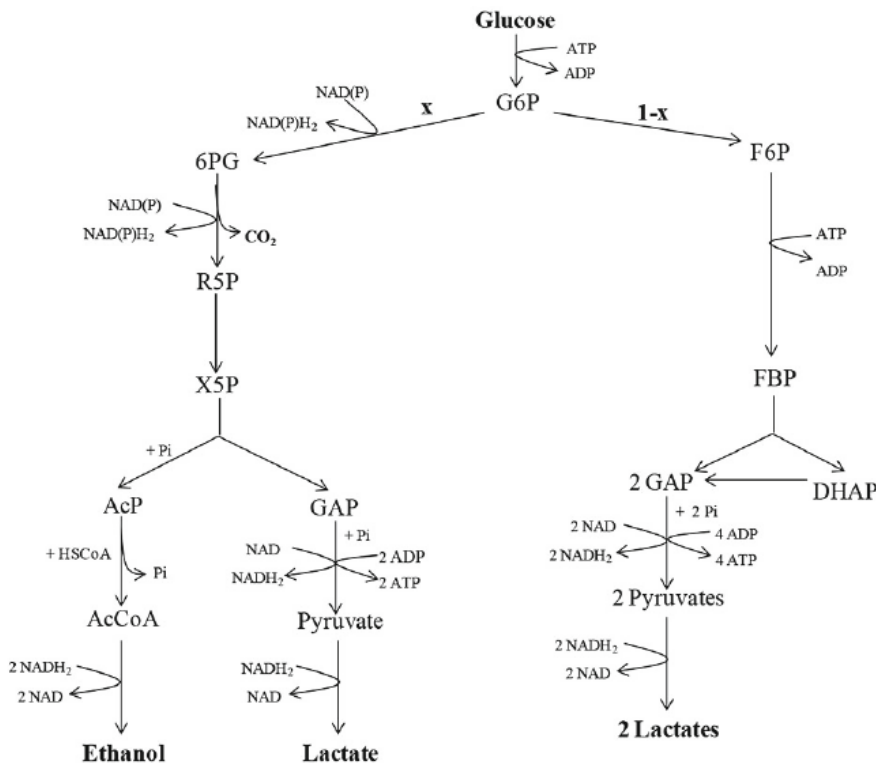


Fig. 1. Pathways of glucose metabolism in *L. reuteri*. The phosphoketolase pathway (PKP) is displayed on the left while the Embden-Meyerhof pathway (EMP) is on the right (G6P, glucose-6-phosphate; 6PG, 6-phosphogluconate; R5P, ribulose-5-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate; AcP, acetyl-phosphate; AcCoA, acetyl-coenzyme A; F6P, fructose-6-phosphate; FBP, fructose-1,6-bisphosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate). Glucose consumption is equal to x through the PKP and to $1-x$ through the EMP.

sent, the redox balance could be maintained by the production of mannitol, which enabled the formation of acetate instead of ethanol (Årskold *et al.*, 2008). The PKP has a lower energy yield in the form of ATP compared to that of the EMP (2 ATP for the EMP vs. only 1 for the PKP) but it is used by LAB to ferment pentoses (Kandler, 1983). As demonstrated by Årskold *et al.* (2008), *L. reuteri*, which displays a heterofermentative metabolism, simultaneously exploits these two operating glycolytic pathways starting from glucose (Fig. 1). These findings have been recently corroborated by van Niel *et al.* (2012) who expressed the relative importance of each pathway in glucose metabolism during the exponential phase of growth (87.8% for the PKP flux and 12.2% for the EMP flux in the case of the ATCC 55730 strain). The EMP is therefore used as a shunt to provide energy.

To the best of our knowledge, the combined approach between the characterization of bacterial growth and the study of glucose metabolism has never been performed on various strains of *L. reuteri* to evaluate potential intra-species diversity. In this framework, the present study focuses on comparing three strains of *L. reuteri*, namely DSM 20016, DSM 17938 and ATCC 53608 under batch growth conditions, mainly in terms of growth and metabolism. To this aim, complementary approaches were carried out to compare these three strains at the genomic and the metabolic levels. Growth kinetics and bacterial cultivability were thus characterized while acidification kinetics was studied. In parallel, the growth medium composition was assessed by high performance liquid chromatography (HPLC) and the evolution in the use of each pathway during bacterial growth was discussed.

Materials and Methods

Lactobacillus reuteri strains

The DSM 20016 strain (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen, GmbH), also classified as ATCC 53609, is the type strain of *L. reuteri* and was purchased from the Pasteur Institute Collection. The ATCC 53608 strain was ordered from the American Type Culture Collection (ATCC). The SD 2112 strain, also called ATCC 55730, had been cured of two independent plasmids carrying unwanted antibiotic resistance traits resulting in the daughter strain DSM 17938 (Rosander *et al.*, 2008). This strain was obtained from Bio-Gaia AB.

Chemicals

Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. All solutions and media in contact with *L. reuteri* were autoclaved at 110°C for 20 min.

Bioinformatics analyses

Three different *L. reuteri* strains (DSM 20016, ATCC 53608 and SD 2112) were chosen and bioinformatic tools were used (i.e. Kegg pathways, Artemis, Clustal W) to compare them at a genomic level based on the sequencing and annotation data (Rosander *et al.*, 2008; Frese *et al.*, 2011). The aim was to compare the selected strains from the genomic and phenotypic points of view in order to try to explain the differences in metabolic behavior, particularly glucose metabolism through EMP and PKP.

Inoculum preparation

Stock cultures of *L. reuteri* strains were kept at -80°C in a solution containing 25% (w/v) glycerol. For inoculum preparation, 500 μl of frozen *L. reuteri* stock was placed in 10 ml of de Man, Rogosa, and Sharpe medium (MRS: polypeptone 10.0 g/L, meat extract 10.0 g/L, yeast extract 5.0 g/L, glucose 20.0 g/L, Tween 80 1.08 g/L, dipotassium phosphate 2.0 g/L, sodium acetate 5.0 g/L, ammonium citrate 2.0 g/L, magnesium sulfate 0.2 g/L, manganese sulfate 0.05 g/L, Biokar Diagnostics) in a sealed tube. Then, 1 ml of this tube was transferred into a sealed tube containing 9 ml broth, and incubated anaerobically at 37°C for 16 h (20 h for the ATCC 53608 strain). This suspension was used as pre-culture. This operation was repeated three times to obtain three independent pre-cultures. After 16 h (20 h for the ATCC 53608 strain), the cell concentrations of the pre-cultures were checked by measuring the optical density at 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) with a spectrophotometer (Beckman, DU 640 B).

Initiation of growth and growth monitoring

In order to avoid glucose limitation (Supplementary data Fig. S1), subsequent cultures were performed in MRS broth with the previous composition, but supplemented with glucose (20 g/L). A part of the total glucose disappeared during the sterilization process, probably due to Maillard reactions. In fact, the measured glucose concentration after sterilization was 30 g/L. Three Schott bottles containing 250 ml of supplemented MRS broth were inoculated with pre-cultures to an initial $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.1 (corresponding to a cell concentration of around 10^8 CFU/ml). Cultures were then incubated in batch mode at 37°C under anaerobic conditions created during the culture. The bacterial growth kinetics was followed by sampling 1 ml of culture and measuring the $\text{OD}_{600\text{nm}}$, enabling determination of maximal specific growth rate μ_{max} (in h^{-1}) and generation time t_g (in h). The maximal specific growth rate was determined using the semi-logarithmic plot of $\text{OD}_{600\text{nm}}$ versus time. The stationary phase was considered as reached when the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ did not significantly vary between two consecutive measurements. Reported data correspond to the mean values (\pm standard deviations) of dual measurements from three independent batch cultures.

Determination of cell cultivability

The concentration of cultivable cells (expressed in CFU/ml) was evaluated by plating serially diluted samples in physiological water (NaCl 150 mM, GPR Rectapur) onto MRS agar medium (MRS with 15 g/L agar; Biokar Diagnostics). Plates were incubated under anaerobic conditions (GENbox anaer, bioMérieux) at 37°C for 48 h. Reported results are expressed as the means \pm standard deviations of duplicates from three independent experiments.

Acidification measurements

The acidification activity of bacteria during their growth at 37°C was followed in triplicate using the CinAc[®] device (BioVal, Spinnler and Corrieu, 1989). Cultures were carried out in 150 mL flasks of MRS broth supplemented with glucose, seeded at $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.1$. The time necessary to reach

different pH values ($t_{\text{pH}5.5}$, $t_{\text{pH}5.2}$, $t_{\text{pH}5.0}$, $t_{\text{pH}4.5}$, $t_{\text{pH}4.0}$, in h) as well as the acidification kinetics (pH as a function of time) and the acidification rate (dpH/dt as a function of time or pH) were chosen to characterize the acidification activity of bacterial suspensions during microbial growth. Results were reported as the means \pm standard deviations of three acidification kinetics for each strain.

Analysis of substrates and metabolites

Each sample (900 μl collected each hour during growth monitoring) was mixed (50% v/v) with trichloroacetic acid 21% (v/v), in order to precipitate proteins and therefore to stop fermentation reactions (Prolabo) and then centrifuged at $13,000 \times g$ for 2 min at 4°C before filtration through a 0.22 μm pore-size filter (Millipore). The supernatant was stored at 4°C . Propionic acid 1% (w/w) was used as an internal standard and added at 50% (v/v) to an equal volume of the sample, before HPLC analysis. Glucose, lactate, acetate and ethanol quantifications were performed at least in replicate and expressed as the means \pm standard deviations of duplicates from three independent experiments. Separation was performed on a Biorad Aminex HPX-87H column (300 mm \times 7.8 mm; Bio-Rad) equipped with a cation H^+ Micro-Guard column (30 mm \times 4.6 mm; Bio-Rad) at a H_2SO_4 (0.005 M) flow rate of 0.6 ml/min (600 pump; Waters Associates, Millipore) and a temperature of 50°C . Quantification was performed by a Waters ultra-violet (UV) detector set at 210 nm and a Waters 2414 refractive index (RI) detector put in series, with external standards of known amounts of commercially pure substances prepared fresh in filtered, deionized water. Results were analyzed by Millennium software (Waters Associates).

Growth and metabolism data analysis

The fitting of the bacterial growth curves allowed obtaining growth descriptors in order to compare the three strains. This fitting was performed using the modified Gompertz equation (1) (Zwietering *et al.*, 1990), with X = biomass concentration expressed in $\text{OD}_{600\text{nm}}$, X_0 = initial biomass concentration ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ at $t = 0$ h), A = asymptotic value of $\ln(X/X_0)$, λ = lag phase duration (h), μ_{max} = maximal specific growth rate (h^{-1}). For the fitting of the glucose consumption kinetics and those of the lactate and ethanol production kinetics, the modified Gompertz equation was applied to $(S_0 - S(t))$ and $(P(t) - P_0)$, respectively (expressed in g/L; equations 2 and 3). In these equations, μ_{max} was replaced by r_{Smax} or r_{Pmax} , the maximal rates of consumption and production (in g/L/h), respectively. The A parameter represents the asymptotic value ($S_0 - S_{\text{final}}$) or $(P_{\text{final}} - P_0)$ (in g/L), respectively. For each strain, the product yields ($Y_{\text{lactate/glucose}}$, $Y_{\text{ethanol/glucose}}$, $Y_{\text{CO}_2/\text{glucose}}$, expressed in mol/mol) were calculated using the formula (4) and (5) and the fitted concentrations of glucose, ethanol and lactate determined as described above.

The percentage of use of each glycolytic pathway (PKM and EMP) was calculated using equations (6) and (7). The percentage of use of the PKP was calculated from the ratio of ethanol concentration produced through this pathway to the sum of both product concentrations divided by 2 because one mole of glucose produces 2 moles of products

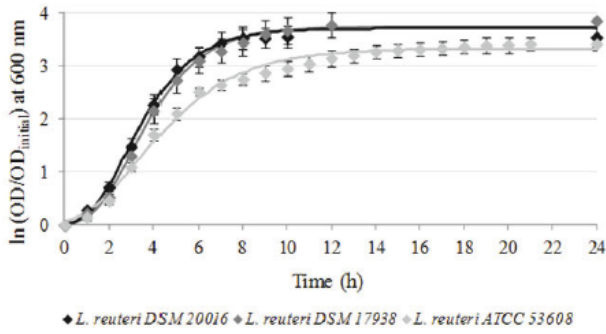


Fig. 2. Growth curves of the three *L. reuteri* strains cultivated in MRS medium supplemented with 20 g/L of glucose. Solid lines correspond to a data fitting performed by the modified Gompertz method. Reported data correspond to the mean values (\pm standard deviations) of dual measurements from three independent batch cultures. Maximal specific growth rates were equal to 0.82, 0.80, and 0.50 h^{-1} , respectively for the DSM 20016, DSM 17938 and ATCC 53608 strains.

(lactate or ethanol).

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = A \cdot \exp\left(-\exp\left[\frac{\mu_{\max} \cdot \exp(1)}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right) \quad (1)$$

$$S_0 - S(t) = A \cdot \exp\left(-\exp\left[\frac{r_{S_{\max}} \cdot \exp(1)}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right) \quad (2)$$

$$P(t) - P_0 = A \cdot \exp\left(-\exp\left[\frac{r_{P_{\max}} \cdot \exp(1)}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right) \quad (3)$$

$$Y_{\text{lactate}/\text{glucose}} = \frac{[\text{lactate}]_{\text{final}} - [\text{lactate}]_{\text{initial}}}{([\text{glucose}]_{\text{initial}} - [\text{glucose}]_{\text{final}})} \quad (4)$$

$$Y_{\text{ethanol}/\text{glucose}} = \frac{[\text{ethanol}]_{\text{final}} - [\text{ethanol}]_{\text{initial}}}{([\text{glucose}]_{\text{initial}} - [\text{glucose}]_{\text{final}})} \quad (5)$$

$$\text{Use of PKP (\%)} = \left(\frac{2 \cdot [\text{ethanol}]_{\text{produced}}}{[\text{ethanol}]_{\text{produced}} + [\text{lactate}]_{\text{produced}}}\right) \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Use of EMP (\%)} = 100 (\%) - \text{use of PKP (\%)} \quad (7)$$

Results

Study of growth kinetics under batch conditions on glucose

As displayed in Fig. 2, for the DSM 20016 strain, the exponential phase started after 2 h and lasted 2.5 h. The high seeding rate ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.1$, i.e. 10^8 CFU/ml) may explain the brevity of the latency and the exponential phases. In these cul-

ture conditions, the maximal specific growth rate of the DSM 20016 strain was equal to 0.82 h^{-1} (Table 1), corresponding to a generation time of 0.85 h. The stationary phase was reached after 10 h. The growth profile of the DSM 17938 strain was comparable to the DSM 20016 in terms of beginning and duration of the exponential phase, specific growth rate of 0.80 h^{-1} and generation time of 0.87 h (Table 1). The stationary phase was reached after 12 h. After 24 h, the maximal cell concentration of the DSM 17938 culture was similar to that of the DSM 20016 strain. In contrast, the ATCC 53608 strain showed significant differences in terms of growth kinetics. The exponential phase started after 2 h but lasted 3.5 h (Fig. 2), with a specific growth rate of 0.50 h^{-1} corresponding to a generation time of 1.39 h (Table 1). The stationary phase was reached after 21 h. For the ATCC 53608 strain, a slight difference between the fitting and the experimental data was observed between 8 and 12 h (Fig. 2), which may be due to the flocculation of bacterial cells observed for this strain during growth.

The ATCC 53608 strain displayed clearly the slowest growth performance under the performed conditions, while the two other strains grew faster. Furthermore, the maximal biomass concentrations were similar for the DSM 20016 and the DSM 17938 strains, while inferior for the ATCC 53608 strain. All these results indicated that *L. reuteri* DSM 20016 and DSM 17938 were very close in terms of high growth performance on glucose.

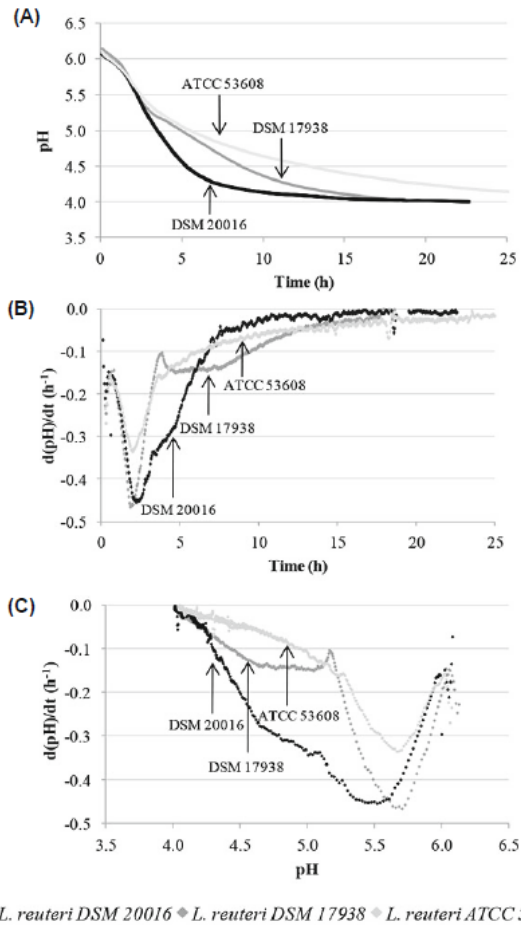
Study of acidification kinetics during growth on glucose

With the aim to better understand the differences in growth kinetics between the three *L. reuteri* strains, the acidification kinetics were further assessed using the CinAc[®] device. This system aims at monitoring in real time the pH evolution of several simultaneous cultures of acidifying microorganisms. During the experiment, various kinetic parameters are automatically calculated. The obtained values characterize the strains used and their conditions of implementation. The following specific parameters were evaluated: V_{\max} (i.e. the maximal acidification rate), $t_{V_{\max}}$ (i.e. the time to reach V_{\max}), $\text{pH}_{V_{\max}}$ (i.e. the pH corresponding to V_{\max}) and t_{pH} (time to reach a given pH). According to Picque *et al.* (1992), these values are relatively constant for a given LAB strain, at least in a given range of biomass concentrations, and allow characterizing and differentiating the acidification behavior of studied strains.

For the three *L. reuteri* strains, the parameters characterizing the acidification kinetics and the times necessary to reach different pH values are summarized in Supplementary data Table S1. The time required to reach a pH of 5.5 from an initial pH of 6.2 was comparable for all three strains ($t_{\text{pH}5.5}$ comprised between 2.25 h and 2.53 h). From pH 5.5 and more clearly from pH 5.2, the acidification kinetics significantly varied depending on the strain (Fig. 3A). At pH 4.5, the deviation between strains increased as $t_{\text{pH}4.5}$ varied from 5.30 h for the DSM 20016 strain to 13.37 h for the ATCC 53608 strain. A minimum pH of about 4.0 was reached for the three strains, but the time to reach it was dependent on the strain (15.27 h for DSM 20016, 17.67 h for DSM 17938 and 35.22 h for ATCC 53608; Fig. 3A). A ranking based on the acidification performance of the three studied strains un-

Table 1. Growth kinetics characteristics of the three *L. reuteri* strains

	DSM 20016	DSM 17938	ATCC 53608
Maximal $\text{OD}_{600\text{nm}}$	4.42 \pm 0.09	4.31 \pm 0.11	3.04 \pm 0.06
latency phase (h)	1.12 \pm 0.13	1.31 \pm 0.15	0.87 \pm 0.11
μ_{\max} (h^{-1})	0.82 \pm 0.04	0.80 \pm 0.05	0.50 \pm 0.01
t_g (h)	0.85 \pm 0.04	0.87 \pm 0.05	1.39 \pm 0.02



◆ *L. reuteri* DSM 20016 ◊ *L. reuteri* DSM 17938 ◊ *L. reuteri* ATCC 53608

Fig. 3. Acidification kinetics of the three *L. reuteri* strains during their growth in MRS medium supplemented with 20 g/L of glucose: (A) pH profile as a function of growth time; (B) acidification rate profile as a function of growth time; (C) acidification rate profile as a function of pH. Measures were stopped when minimum pH (here pH = 4.0) was reached, that is an acidification rate equal to zero.

der the performed growth conditions can thus be established: the DSM 20016 strain was the quickest, followed by the DSM 17938 strain while the ATCC 53608 strain was significantly slower.

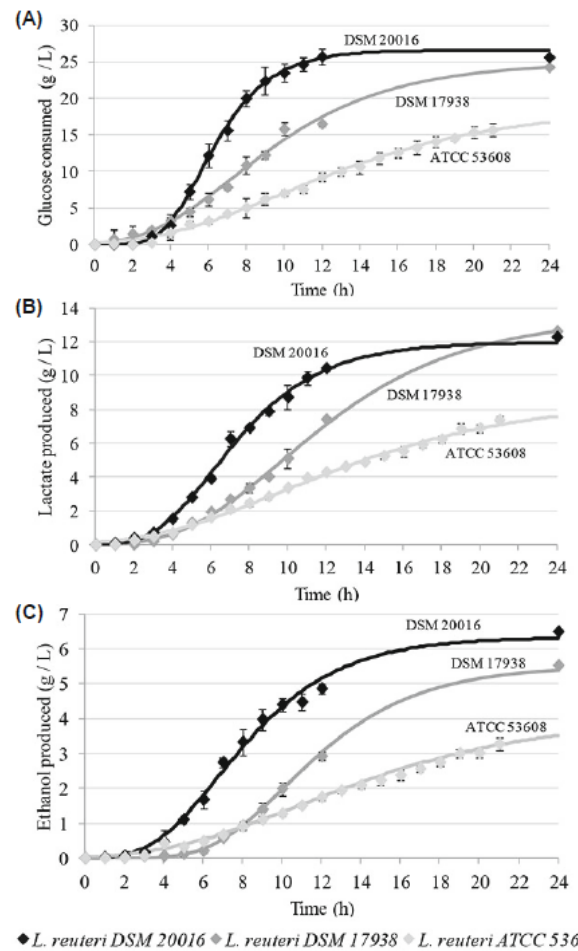
As observed on Fig. 3C, the $\text{pH}_{V_{\max}}$ values were similar for the three strains, being equal to 5.68 for the DSM 17938 and ATCC 53608 strains and to a slightly lower value of 5.46 for the DSM 20016 strain. On the contrary, significant differences were observed between the strains in the case of the V_{\max} absolute values (0.46 h⁻¹ and 0.47 h⁻¹ for the DSM 20016 and the DSM 17938 strains respectively, vs. 0.34 h⁻¹ for the ATCC 53608 strain, Fig. 3B). The acid stress resistance of the DSM 20016 strain to low pH is also shown by the range in pH where the acidification rate remains over 50% of V_{\max} (1.35 pH units), though for the ATCC 53608 this value was only of 0.71 pH units and 0.69 pH units for the DSM 17938.

Besides, the time at which this maximal acidification rate was reached (i.e. $t_{V_{\max}}$) differed for the three bacterial strains (Fig. 3B), as it was lower for the DSM 17938 and ATCC

53608 strains (1.87 h and 1.92 h, respectively) than for the DSM 20016 strain (2.30 h). However, the study of the duration where the speed of acidification stays over $V_{\max}/2$ clearly shows that the high acidification rate was maintained longer for the DSM 20016 strain (237 min) than for the ATCC 53608 (168 min) and DSM 17938 (114 min).

Glucose consumption and products formation during batch growth

As shown in Fig. 4, for the three *L. reuteri* strains, the glucose consumption was related to the production of lactate and ethanol. Moreover, it is noteworthy that there was no production of acetate (results not shown) during glucose fermentation in the three cases. The production of CO₂ has been observed but not measured. In comparing Figs. 2 and 4, lactate and ethanol production was observed throughout bacterial growth and further. Indeed, these concentrations increased until 22 h of culture for the DSM 20016 strain, while production continued at least until 24 h of culture



◆ *L. reuteri* DSM 20016 ◊ *L. reuteri* DSM 17938 ◊ *L. reuteri* ATCC 53608

Fig. 4. Evolution of (A) glucose concentration, (B) lactate, and (C) ethanol concentrations (determined by HPLC) as a function of growth time for the three *L. reuteri* strains. At the beginning of the growth, [glucose] = 30 g/L for each strain. Solid lines correspond to a data fitting by the modified Gompertz method.

Table 2. Characterization of glucose consumption and metabolites production for the three studied *L. reuteri* strains

		DSM 20016	DSM 17938	ATCC 53608
Glucose	r_{Smax} (g/L/h)	4.84 ± 0.10	2.02 ± 0.10	1.07 ± 0.08
	$t_{r_{Smax}}$ (h)	5.6	7.4	10.0
Lactate	r_{Pmax} (g/L/h)	1.44 ± 0.06	0.96 ± 0.03	0.46 ± 0.01
	$t_{r_{Pmax}}$ (h)	6.2	9.8	10.0
	$Y_{lactate/glucose}$ (mol/mol)	0.90	1.08	0.91
Ethanol	r_{Pmax} (g/L/h)	0.70 ± 0.04	0.55 ± 0.04	0.22 ± 0.02
	$t_{r_{Pmax}}$ (h)	7.0	10.2	10.0
	$Y_{ethanol/glucose}$ (mol/mol)	0.93	0.87	0.82

for the DSM 17938 and the ATCC 53608 strains. These results corroborate the acidification profile (Fig. 3A). As initial glucose concentration in the medium was equal to 30 g/L, this substrate was not totally consumed by any of the three strains (Fig. 4A). The end of the bacterial growth was thus not caused by a lack of glucose but probably by an inhibition due to the low pH conditions and/or the presence of lactate and ethanol.

Lactate and ethanol production yields are shown on Table 2. In the case of lactate, the DSM 20016 and ATCC 53608 strains exhibited the lowest yields of conversion (0.90 and 0.91 mol/mol, respectively), while the DSM 17938 strain displayed the highest (1.08 mol/mol). Due to the stoichiometry of the metabolic pathways, these yields are equal to those of ATP produced. Moreover, the yield of ethanol production is different from one strain to another. The ATCC 53608 strain

had the lowest value (0.82 mol/mol), whereas the DSM 17938 and the DSM 20016 strains showed higher values (0.87 and 0.93 mol/mol, respectively). Significant differences were also observed in the case of maximal rates of substrate consumption and metabolite production (Table 2). The rates r_{Smax} and r_{Pmax} were the lowest in the case of the ATCC 53608 strain and the highest for the DSM 20016 strain while the DSM 17938 strain displayed intermediate values. In the case of the DSM 20016 and DSM 17938 strains, the time needed to reach these maximal rates ($t_{r_{Smax}}$ and $t_{r_{Pmax}}$) varied (Table 2). On the contrary, the time to reach r_{Smax} and r_{Pmax} was the same (10.0 h) for the ATCC 53608 strain.

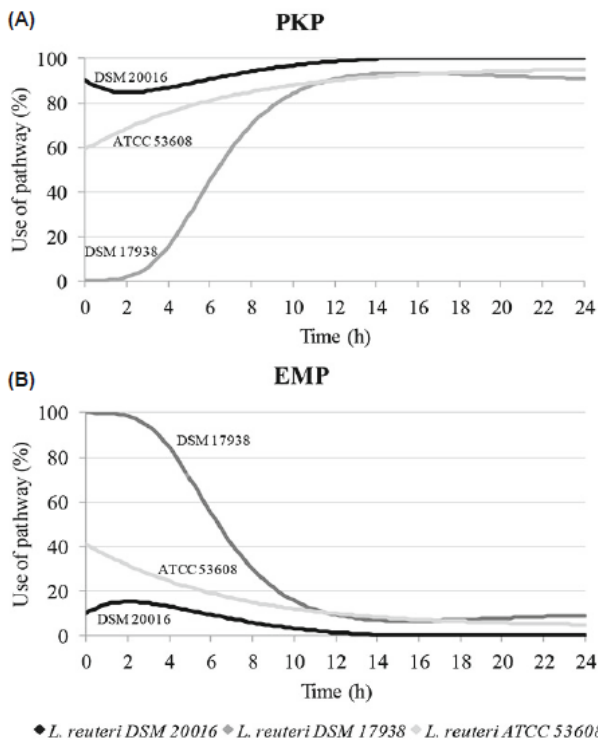
Balance in the glycolytic pathways

The heterofermentative *L. reuteri* simultaneously exploits the PKP and the EMP starting from glucose as initial substrate. By calculating the ratio of ethanol concentration produced to the sum of products divided by 2, the relative percentages of glucose consumed in each pathway can be determined for each strain (Fig. 5). It is notable that, for each strain, the relative importance of these two pathways varied all along the growth. Furthermore, the profile of the orientation through each pathway significantly varied when comparing the three strains (Fig. 5).

In the case of the DSM 17938 strain, the proportion of PKP use moved from 0 to 93% during bacterial growth. The increasing use of this pathway started after 2 h, which corresponds to the beginning of the exponential phase of growth (Figs. 2 and 6). After 14 h, a slight slowdown in the use of this pathway was observed (Fig. 5) together with a slowdown in the kinetic of acidification (Fig. 3A) and therefore in the production of lactate (Fig. 4B). For the ATCC 53608 strain, the use of PKP increased moving from 59 to 95% between 0 and 12 h (Fig. 5) but no correlation with the growth curve was observed. For both strains, there was therefore an increase in the use of this pathway over time. The profile of the DSM 20016 strain appeared to be different as two phases can be distinguished: in the first, the use of the PKP slightly decreased at the expense of the EMP (between 0 and 3 h, Fig. 6), and in the second (between 3 and 24 h) the percentage of glucose metabolized through the PKP increased again. Between 0 and 3 h, the decrease in pH was important (from 6.2 to 5.2, Fig. 3A) and the acidification rate was maximal ($dpH/dt = -0.46 h^{-1}$, Fig. 3B), which is consistent with the fact that the EMP is maximally used at this time of growth. All the three strains predominantly used the PKP at the end of bacterial growth.

Genomic comparison of the two glycolytic pathways for the three *L. reuteri* strains studied

Given the differences in the use of the two glycolytic pathways between the three strains, differences in the genes involved in these pathways could be expected. Nevertheless, no significant differences appeared after the comparison of the genes involved in the EMP and PKP. Although all of these genes are common to the three strains studied, the genomic organization was not the same and there also may be differences in the level of expression. Transcriptomic and proteomic analyses could help to better understand these various metabolic behaviors.

**Fig. 5.** Evolution of the glucose consumption between the PKP and the EMP as a function of bacterial growth time.

Discussion

This work was focused on characterizing three strains of *L. reuteri* (DSM 20016, DSM 17938, and ATCC 53608) in terms of growth and metabolism. These three strains are located on different branches of the phylogenetic dendrogram and are therefore representative of the intra-species variability. The comparison was performed based on complementary methodological approaches carried out at different levels (genomic, growth kinetics, acidification performance and metabolic behavior). This was done in order to get insights that would help in strain selection, bearing in mind the diversity of application of the species studied in this work. Growth and acidification kinetics showed significant differences between the three strains. Moreover, it was shown that the predominance use between PKP and EMP differed between *L. reuteri* strains. It is noteworthy to observe that the orientation of glucose consumed through each pathway depends not only on the fermentation time in batch mode but also, and even though it concerns the energy production, on the strain within the species. To the best of our knowledge, such a comparative study of growth and metabolism between *L. reuteri* strains has not been published yet. Indeed, only few studies concerning these characteristics of *L. reuteri* appear in the literature (Årskold *et al.*, 2008; van Niel *et al.*, 2012), characterizing only one strain (i.e. ATCC 55730) and little is known in the field to allow comparison between different *L. reuteri* strains.

The end-products of a fermentation performed by heterolactic LAB depend upon the starting substrate, as hexoses lead to lactate and ethanol, whereas pentoses lead to acetate and lactate (Årskold *et al.*, 2008). For instance, starting from glucose, all redox equivalents could only be directed to lactate and ethanol production to balance the pool and, consequently, no acetate could be formed (Årskold *et al.*, 2008). *L. reuteri* growth on glucose is therefore limited by a redox imbalance, which results in ethanol formation rather than the energetically more favorable acetate formation (Stevens *et al.*, 2011).

Although few results are available in the literature concerning glucose fermentation by *L. reuteri* (Årskold *et al.*, 2008; van Niel *et al.*, 2012), acidification kinetics presented here generated interesting information. As *L. reuteri* is a strictly heterofermentative LAB and produces lactate, CO₂ and ethanol from glucose, the decrease in pH was attributed to the production of lactate. The comparison of the acidification profiles obtained for the three strains was consistent with bacterial growth performance. The observed differences in acidification and growth kinetics may be linked to various lactate resistance behaviors between strains. As in the other well characterized LAB, the lactate production significantly slows down after the bacterial growth (Figs. 2 and 4A), indicating that lactate is a primary metabolite provoking growth inhibition. Similar results were highlighted by van Niel *et al.* (2012) in the case of the ATCC 55730 strain. It has been evidenced here that, among the three studied strains, the DSM 20016 and the ATCC 53608 ones are the two most different strains in terms of lactic fermentation, though the DSM 17938 shows an intermediate behavior under the performed experimental conditions.

Concerning the use of each glycolytic pathway, since the work of Årskold *et al.* (2008), it has been commonly assumed that the heterofermentative *L. reuteri* ATCC 55730 strain uses both the PKP (hetero-fermentation) and the EMP (homo-fermentation) to metabolize glucose into lactate, ethanol and CO₂. This work demonstrated that the main flux is through the PKP, while the EMP is used as a shunt (representing about 27% of the total flux starting from 50 g/L of glucose during the exponential phase). In addition, van Niel *et al.* (2012) recently expressed the relative percentages of glucose consumption through each pathway for the ATCC 55730 strain (PKP flux: 87.8% ± 7.4%, EMP flux: 12.2% ± 7.4%). These values were estimated for the period of maximum growth rate according to the metabolic flux analysis described by Årskold *et al.* (2008). It seemed interesting to check the distribution of the carbon flux through other strains when the fermentation proceeds. Even if some features (i.e. increase in the PKP and decrease in the EMP after the peak of lactate production as shown by comparing the HPLC and the acidification profiles) were similar for the three *L. reuteri* strains, the profile of the orientation through each pathway during glucose consumption significantly varied between them (Fig. 5). Whatever the strain, the flux through the EMP was more important during the acceleration phase (mainly in the case of the DSM 17938 strain), in the course of which, significant amounts of glucose remained in the medium, whereas the “heterolactic” behavior through the PKP was more observed when high levels of lactate were present in the culture medium. It is nevertheless worth to note that some of the results found at the beginning of bacterial growth (i.e. before 2 h) are probably excessive. The estimation of the percentages of use of the PKP and EMP were calculated from the ethanol and lactate concentrations quantified in the growth medium. However, at the start of the growth phase, the low concentrations measured can lead to errors in this estimation. Moreover, as MRS is a complex medium, a part of the ethanol produced could come from substrates other than glucose (citrate and threonine from peptones, meat extract and yeast extract). The estimated quantity produced from these sources is low compared to the final concentrations of ethanol produced (between 3.5 and 6.5 g/L, depending on the strain). Therefore, the observed differences between the metabolic behaviors of the various strains cannot be explained by this estimated part. Although the DSM 17938 and DSM 20016 strains had a similar behavior in terms of growth kinetics (Fig. 2 and Table 1), the DSM 20016 and ATCC 53608 strains were the closest in terms of use of the glycolytic pathways (Fig. 5). Conversely, the DSM 17938 strain shows an almost complete shift from EMP to PKP when pH is going down and surprisingly does not show any alteration in the lactate production observed and reached the best yield of lactate production among the three strains. This strain seems to adopt a particularly adaptable metabolism in a changing environment.

From a stoichiometric point of view, during growth of LAB, the EMP yields 2 moles of lactate and 2 moles of ATP per mole of glucose consumed (glucose + 2 ADP → 2 lactates + 2 ATP). For the PKP, the overall stoichiometric reaction is: glucose + 1 ADP → 1 lactate + 1 ethanol + 1 CO₂ + 1 ATP. Thus, the stoichiometry of the metabolic pathways shows that the molarity of ATP produced is equal to that of lactate

produced. Therefore, the PKP efficiency in terms of ATP synthesis is about half that of the EMP. Nevertheless, the advantage of the PKP is that it generates NADPH₂, an essential co-factor for reduction reactions used in biosynthesis (in particular in the synthesis of fatty acids and steroids), as well as ribulose-5-phosphate, which is the precursor for the synthesis of nucleotides and nucleic acids. In addition, in producing less organic acids, the PKP limits the acid inhibition of bacteria by their own metabolism and the growth ends up exhausting glucose while permitting the production of energy, even though it gives a lower ATP yield than EMP. Regarding the thermodynamics, the free-energy of the EMP is $\Delta_{EMP} = -205.2$ kJ/mol and the theoretical possible ATP yield based on the energy balance of the reaction is therefore $205.2 / (2 \times 51.8) = 1.98$ (51.8 kJ/mol being the free-energy necessary for ATP synthesis from ADP; Werner *et al.*, 2010). In a similar way, the free-energy of the PKP is $\Delta_{PKP} = -262.14$ kJ/mol and the theoretical possible ATP yield is thus of 2.53 (Werner *et al.*, 2010). It is therefore more interesting from a thermodynamic point of view to use the PKP during bacterial growth rather than the EMP. Nevertheless, the calculated values of the thermodynamic ATP yield (i.e. 1.98 for the EMP and 2.53 for the PKP) do not fit with the stoichiometric values (i.e. 2 for the EMP and 1 for the PKP) in the case of the PKP. The observed differences may be explained by the ecological niche of LAB. Indeed, during evolution, some pathways such as the PKP may not have reached their optimal ATP net production because energy yield is not their only and main function (Werner *et al.*, 2010) and PKP was however selected because of the environmental constraints (e.g. pentose availability, requirement of NADPH₂ production or precursor synthesis, exhaustion of the sugars in the medium, limitation of acid production).

In summary, the results of our work suggest that the orientation of the intracellular energy substrates depends on each *L. reuteri* strain. The phenotypic variability is important between these strains and significant differences were observed even for strains of the same *Lactobacillus* species. Homofermentative LAB ferment hexoses to lactate by the EMP. At slow growth and low glycolytic flux rates the homofermentative bacteria shift to mixed acid fermentation with formate, acetate, ethanol and lactate as the products. The change is caused by regulation of the lactate dehydrogenase and pyruvate formate lyase activities, which are subject to control by the catabolic and anabolic flux rates and changes in the NADH/NAD⁺ ratios (Garrigues *et al.*, 1997, 2001). For example, *Lactococcus lactis* normally employs homolactic fermentation. However, if glucose is limited, a shift towards a form of heterolactic fermentation is observed, in which 1 mole of glucose is metabolized into 1 mole of acetate, 2 moles of formate and 1 mole of ethanol. The shift between EMP and PKP could also be caused at least in part by regulation of the lactate dehydrogenase (leading to the synthesis of NAD⁺) which is subjected to control by the catabolic and anabolic flux rates. Moreover, in the presence of lactic acid at low pH (pH 4.8) and low growth rate, it has been shown in *Lactobacillus plantarum* a significant up-regulation of genes involved in the PKP (e.g. transketolase, transaldolase and alcohol dehydrogenase) (Pieterse *et al.*, 2005). A transcriptomic approach would allow confirming the origin of the observed

differences in the metabolic shift between *L. reuteri* strains.

Conclusion

The present study contributes to a better understanding of a poorly characterized LAB - *L. reuteri*, which has many application interests. Taken together, the results emphasize the intra-species variability of this species. The EMP pathway producing more lactate, the shift to the PKP pathway is clearly a way to reduce acid production and probably extends the possibility of bacterial survival in acidic environment. The DSM 17938 strain, showing the highest initial EMP level and then the highest PKP level was also the most efficient for lactate production (concentration and yield from a glucose containing medium, quick acidification kinetics). The regulation process at the origin of the shift observed in *L. reuteri*, helping its adaptation to acidic environments, warrants a further in-depth study.

Acknowledgements

The authors thank Chandanie Hunter for correcting the English version of the manuscript and Brigitte Pollet from UMR GMPA for her help in the set up of HPLC analysis. They are grateful to the Region Champagne-Ardenne, the Conseil Général de la Marne, and Reims Métropole for their financial support.

References

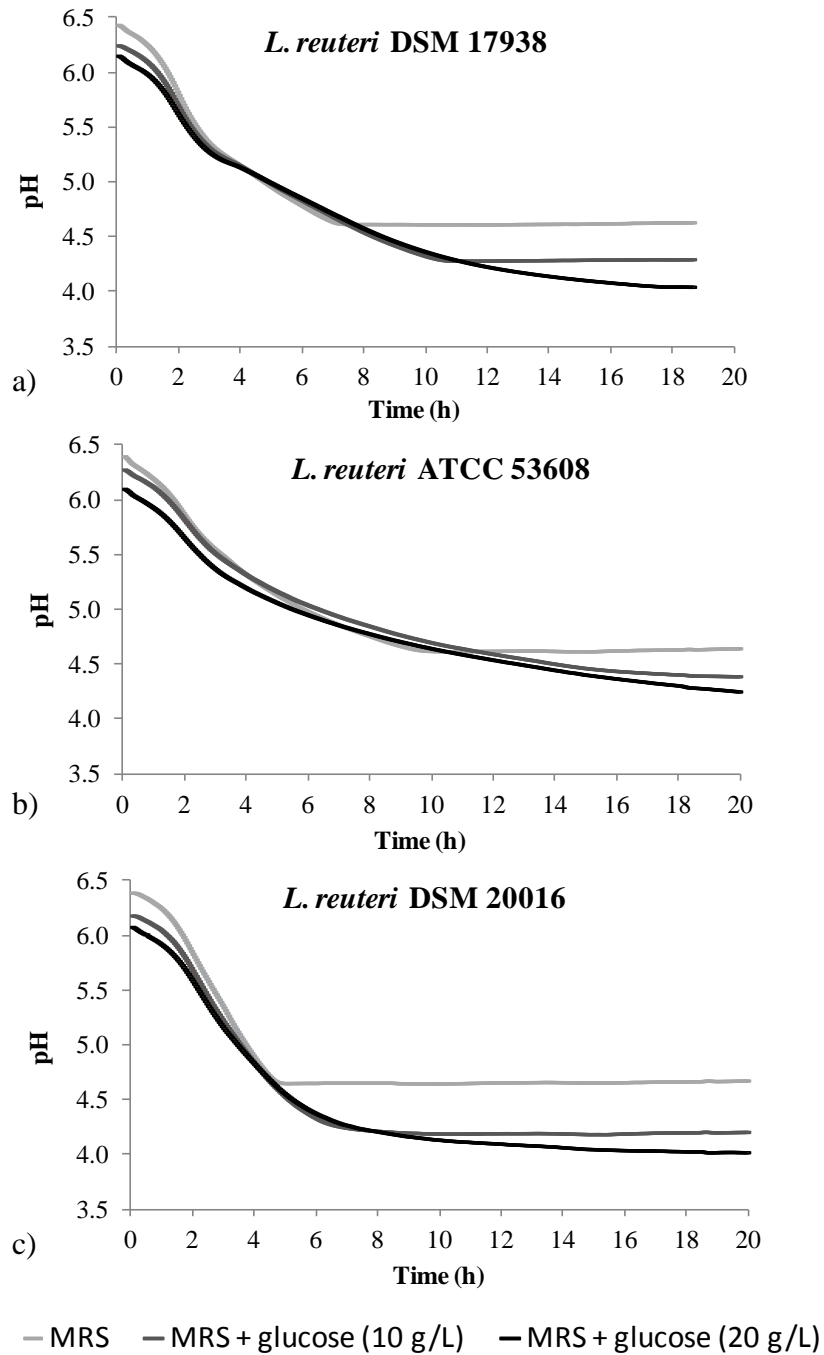
- Ahrné, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A.E., and Molin, G. 1998. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J. Appl. Microbiol.* 85, 88–94.
- Årskold, E., Lohmeier-Vogel, E., Cao, R., Roos, S., Rådström, P., and van Niel, E.W.J. 2008. Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *J. Bacteriol.* 190, 206–212.
- Casas, I.A. and Dobrogosz, W.J. 2000. Validation of probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12, 247–285.
- Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777–788.
- Doleyres, Y., Beck, P., Vollenweider, S., and Lacroix, C. 2005. Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 467–474.
- Drozdzyńska, A., Leja, K., and Czaczyk, K. 2011. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *J. Biotechnol. Comput. Biol. Bionanotechnol.* 92, 92–100.
- Frese, S.A., Benson, A.K., Tannock, G.W., Loach, D.M., Kim, J., Zhang, M., Oh, P.L., Heng, N.C.K., Patil, P.B., Juge, N., *et al.* 2011. The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*. *PLoS Genet.* 7, e1001314.
- Garrigues, C., Loubière, P., Lindley, N.D., and Coccagn-Bousquet, M. 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *J. Bacteriol.* 179, 5282–5287.
- Garrigues, C., Mercade, M., Coccagn-Bousquet, M., Lindley, N.D., and Loubière, P. 2001. Regulation of pyruvate metabolism in *Lac-*

- tococcus lactis* depends on the imbalance between catabolism and anabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 74, 108–115.
- Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 175–188.
- Hansen, E.B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 119–131.
- Hughenoltz, J. and Smid, E.J. 2002. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 497–507.
- Itoh, T. 1992. Functional benefits from lactic acid bacteria used in cultured milk. *Anim. Sci. Technol.* 63, 1276–1289.
- Jiang, X., Meng, X., and Xian, M. 2009. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 995–1003.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 209–224.
- Luo, L.H., Seo, J.W., Baek, J.O., Oh, B.R., Heo, S.Y., Hong, W., Kim, D.H., and Kim, C.H. 2011. Identification and characterization of the propanediol utilization protein PduP of *Lactobacillus reuteri* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 697–703.
- Lüthi-Peng, Q., Dileme, F.B., and Puhán, Z. 2002a. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 289–296.
- Lüthi-Peng, Q., Schärer, S., and Puhán, Z. 2002b. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 73–80.
- Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., and Oshima, K. 2008. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res.* 15, 151–161.
- Picque, D., Perret, B., Latrille, E., and Corrieu, G. 1992. Caractérisation et classification de bactéries lactiques à partir de la mesure de leur cinétique d'acidification. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* 25, 181–186.
- Pieterse, B., Leer, R.J., Schuren, F.H.J., and van der Werf, M.J. 2005. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology* 151, 3881–3894.
- Rodriguez, C., Rimaux, T., Fornaguera, M.J., Vrancken, G., Font de Valdez, G., De Vuyst, L., and Mozzi, F. 2012. Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2519–2527.
- Rosander, A., Connolly, E., and Roos, S. 2008. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6032–6040.
- Rütti, D.P., Lacroix, C., Jeremic, T., Mathis, M., Die, A., and Vollenweider, S. 2011. Development of a reversible binding process for *in situ* removal of 3-hydroxypropionaldehyde during biotechnological conversion of glycerol. *Biochem. Eng. J.* 55, 176–184.
- Savino, F., Pelle, E., Palumeri, E., Oggero, R., and Miniero, R. 2007. *Lactobacillus reuteri* (American type culture collection strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: A prospective randomized study. *Pediatrics* 119, 124–130.
- Spinnler, H.E. and Corrieu, G. 1989. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *J. Dairy Res.* 56, 755–764.
- Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Van Sinderen, D. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 198–203.
- Stevens, M.J.A., Vollenweider, S., Meile, L., and Lacroix, C. 2011. 1,3 propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microb. Cell Fact.* 10, 61–69.
- Talarico, T.L., Axelsson, L.T., Novotny, J., Fiuzat, M., and Dobrogosz, W.J. 1990. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3 propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1195–1197.
- Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C., and Dobrogosz, W.J. 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1854–1858.
- van Niel, E.W.J., Larsson, C.U., Lohmeier-Vogel, E.M., and Rådström, P. 2012. The potential of biodetoxification activity as a probiotic property of *Lactobacillus reuteri*. *Internat. J. Food Microbiol.* 152, 206–210.
- Vollenweider, S., Grassi, G., König, I., and Puhán, Z. 2003. Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. *J. Agricult. Food Chem.* 51, 3287–3293.
- Werner, S., Diekert, G., and Schuster, S. 2010. Revisiting the thermodynamic theory of optimal ATP stoichiometries by analysis of various ATP-producing metabolic pathways. *J. Mol. Evol.* 71, 346–355.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., and van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.

Supplementary data Table S1. CinAc[®] descriptors of the acidification kinetics for the three *L. reuteri* strains

	DSM 20016	DSM 17938	ATCC 53608
V_{\max} (h ⁻¹)	0.46 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.34 ± 0.03
$t_{V_{\max}}$ (h)	2.30 ± 0.01	1.87 ± 0.09	1.92 ± 0.20
$pH_{V_{\max}}$	5.46 ± 0.02	5.68 ± 0.02	5.68 ± 0.06
$t_{pH5.5}$ (h)	2.25 ± 0.06	2.32 ± 0.10	2.53 ± 0.08
$t_{pH5.2}$ (h)	2.93 ± 0.08	3.50 ± 0.30	4.05 ± 0.28
$t_{pH5.0}$ (h)	3.50 ± 0.10	5.00 ± 0.20	5.62 ± 0.49
$t_{pH4.5}$ (h)	5.30 ± 0.15	8.68 ± 0.16	13.37 ± 1.22
$t_{pH4.0}$ (h)	15.27 ± 0.32	17.67 ± 0.26	35.22 ± 0.78
$t_{V_{m>V_{m/2}}}$ (min)	237 ± 8	114 ± 12	168 ± 5
$pH_{V_{m>V_{m/2}}}$	1.35 ± 0.08	0.69 ± 0.06	0.71 ± 0.05

Supplementary data Fig. S1. Acidification kinetics of a) the DSM 17938, b) the ATCC 53608 and c) the DSM 20016 strains during their growth in MRS and MRS supplemented with glucose (10 g.L⁻¹ or 20 g.L⁻¹). The supplementation of MRS with 20 g.L⁻¹ glucose avoids the sudden stop of acidification kinetics noticeable for both growths on MRS or MRS supplemented with 10 g.L⁻¹.



1.1.3 Conclusion et perspectives de l'étude

Tout d'abord, le travail réalisé a mis en évidence l'existence d'une variabilité intra-espèce chez *L. reuteri*. En effet, bien que proches d'un point de vue phylogénétique et génomique, les trois souches étudiées diffèrent dans leurs caractéristiques de croissance et dans leur utilisation des voies cataboliques du glucose. De même, l'utilisation des deux voies glycolytiques PKP et EMP, et la bascule de l'une à l'autre varient selon les souches, ce qui peut impacter leur capacité d'adaptation aux conditions environnementales de croissance.

Chez *L. reuteri*, les raisons de cette bascule entre glycolyse et voie des pentoses phosphates ne sont pas clairement élucidées. Néanmoins, la compréhension de ce phénomène, en partie lié aux conditions environnementales (nature et quantité de substrat par exemple) repose sur celle de certains mécanismes, comme la résistance au stress acide. Cette adaptation à un milieu acide revêt en effet une grande importance dans l'optique d'utiliser *L. reuteri* tant pour la production d'acide lactique biosourcé qu'en tant que probiotique. Ainsi, le choix de la souche à utiliser selon l'objectif visé est un paramètre essentiel à prendre en compte pour maximiser les performances du procédé mis en œuvre.

Ainsi, la souche DSM 17938, qui montre la bascule métabolique la plus importante (utilisation quasi exclusive de l'EMP en début de croissance puis quasi exclusive de la PKP en fin de croissance) constitue la souche la plus intéressante pour la production d'acide lactique (12 g.L⁻¹ produit, rendement de 1,08 mol/mol par rapport au glucose), ce qui pourrait être lié au moins en partie à sa meilleure capacité d'adaptation à un milieu acide. Les processus de régulation à l'origine de cette bascule métabolique et permettant à la souche bactérienne de s'adapter à son environnement devront être investigués, par exemple par des analyses transcriptomiques.

En plus du glucose, *L. reuteri* a également la capacité de métaboliser le glycérol conduisant, entre autre, à la formation d'un isomère de position de l'acide lactique, le 3-HP. Classée dans la liste des dix molécules plateformes à produire à partir de la biomasse par le DOE, le 3-HP constitue un synthon d'intérêt pour diverses applications (formation de polymères biosourcés notamment). Dans ce cas, la capacité de résistance au stress provoqué par un acide organique est également un paramètre important, tout comme le choix d'une souche adaptée à l'objectif.

1.2 Bioconversion du glycérol en 3-HP par *L. reuteri* et impact sur l'état physiologique des bactéries productrices

1.2.1 Contexte et objectifs de l'étude

Les travaux concernant la production de 3-HP par voie biotechnologique sont récents. Les performances obtenues avec des micro-organismes naturellement producteurs étant faibles, la plupart des études mettent en œuvre une approche d'ingénierie métabolique (la plupart en utilisant *E. coli* et *K. pneumoniae*) afin d'optimiser la bioconversion du glycérol ou du glucose en 3-HP. Plusieurs approches sont ainsi envisagées (surexpression des gènes conduisant à la synthèse de la molécule d'intérêt, délétion des gènes menant au co-produit 1,3-PDO, utilisation d'un autre accepteur d'électrons afin de régénérer le NAD⁺ sans nécessiter la production de 1,3-PDO). L'utilisation de micro-organismes naturellement producteurs, comme par exemple la bactérie *Lactobacillus reuteri*, présente cependant certains avantages (statut G.R.A.S., capacité à synthétiser les co-facteurs nécessaires, meilleure tolérance au stress lié à la production des métabolites).

Cependant, très peu d'études s'intéressent à la capacité de *L. reuteri* à produire le 3-HP à partir de glycérol et à la compréhension des déterminants métaboliques permettant cette bioconversion. De plus, malgré la diversité phénotypique de l'espèce *L. reuteri*, mise en évidence dans l'étude détaillée de la croissance bactérienne et du métabolisme du glucose, la comparaison de différentes souches dans le but de synthétiser cette molécule d'intérêt n'a jamais été effectuée. De même, si la toxicité liée à l'excrétion de 3-HPA et les mécanismes d'action de cet aldéhyde sur les bactéries ont été étudiés en détails, peu de travaux se sont intéressés au stress lié à la production du 3-HP.

Les résultats de ces travaux, présentés pour une partie d'entre eux dans un article publié dans le journal *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2015), ont permis d'avancer notamment dans la compréhension des verrous physiologiques de la bioconversion du glycérol en 3-HP. Le phénomène d'inhibition global observé a été caractérisé et le rôle joué par chacun des métabolites de la voie dans celui-ci a été en partie clarifié. Enfin, parmi les trois souches de *L. reuteri* étudiées, la souche DSM 17938 a été choisie pour la suite du projet. Des essais en bioréacteur ont ainsi été menés avec un mode de conduite « batch » puis un apport contrôlé de glycérol (mode « fed-batch ») et les résultats correspondants sont présentés dans la partie 1.2.3.

1.2.2 Diversity of *Lactobacillus reuteri* strains in converting glycerol into 3-hydroxypropionic acid

Publication parue au journal *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Burgé *et al.* 2015b)

Résumé :

Cette étude a pour objectif de comparer les performances de bioconversion du glycérol en 3-HP de trois souches de *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016, DSM 17938 et ATCC 53608) et d'étudier les phénomènes d'inhibition associés. Des différences en termes de rendement de production de 3-HP et de cinétique de consommation du substrat et de production des métabolites de la voie sont ainsi mises en évidence. Avec une productivité maximale d'environ 2 g.L⁻¹.h⁻¹ en 3-HP et d'environ 4 g.L⁻¹.h⁻¹ en 3-HPA en conditions non optimales (pH non régulé) et selon la souche testée, ces résultats confirment le potentiel de *L. reuteri* pour la production de 3-HP par voie biotechnologique. De plus, les ratios molaires entre le 3-HP et le 1,3-PDO produits, calculés pour les trois souches (compris entre 1,25 et 1,65), indiquent systématiquement une production de 3-HP plus importante que celle du co-produit. Ainsi, au vue de ses performances, la souche DSM 17938 apparaît comme la plus prometteuse pour la production de ce synthon.

L'impact de la bioconversion du glycérol sur l'état physiologique des bactéries productrices (perte d'activité enzymatique d'environ 40 % de la population après 3 h de bioconversion par *L. reuteri* DSM 17938) et sur leur survie (perte totale de cultivabilité après 2 ou 3 h selon la souche) est évalué et discuté. Les effets provoqués par chaque métabolite de la voie ont ensuite été étudiés plus précisément, démontrant un impact important du 3-HPA et, dans une moindre mesure, du 3-HP mais uniquement à pH acide.

Diversity of *Lactobacillus reuteri* Strains in Converting Glycerol into 3-Hydroxypropionic Acid

G. Burgé^{1,2,3} • C. Saulou-Bérion^{2,3} • M. Moussa^{2,3} • B. Pollet^{2,3} •
A. Flourat^{1,4,5} • F. Allais^{1,2,3} • V. Athès^{2,3} • H.E. Spinnler^{2,3}

Received: 22 May 2015 / Accepted: 27 July 2015 /
Published online: 29 August 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The present study aims at comparing the performances of three *Lactobacillus reuteri* strains (DSM 20016, DSM 17938, and ATCC 53608) in producing 3-hydroxypropionic acid (3-HP) from glycerol and at exploring inhibition phenomena during this bioconversion. Differences were highlighted between the three strains in terms of 3-HP production yield, kinetics of substrate consumption, and metabolite production. With a maximal productivity in non-optimal conditions (free pH) around 2 g.L⁻¹.h⁻¹ of 3-HP and 4 g.L⁻¹.h⁻¹ of 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) depending on the strain, this study confirmed the potential of *L. reuteri* for the biotechnological production of 3-HP. Moreover, the molar ratios of 3-HP to 1,3-propanediol (1,3-PDO) obtained for the three strains (comprised between 1.25 and 1.65) showed systematically a higher 3-HP production. From these results, the DSM 17938 strain appeared to be the most promising strain. The impact of glycerol bioconversion on the bacteria's physiological state (a decrease of around 40 % in DSM 17938 cells showing an enzymatic activity after 3 h) and survival (total loss of cultivability after 2 or 3 h depending on the strains) was revealed and discussed. The effect of each metabolite on

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12010-015-1787-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ H.E. Spinnler
spinnler@agroparistech.fr

¹ Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI)-AgroParisTech, 247 rue Paul Vaillant Couturier, F-51100 Reims, France

² AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

³ INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

⁴ AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles Cedex, France

⁵ INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles Cedex, France

L. reuteri DSM 17938 was further investigated, displaying a drastic inhibition caused by 3-HPA, while 3-HP induced lower impact and only at acidic pH.

Keywords 3-Hydroxypropionic acid · *Lactobacillus reuteri* · Glycerol bioconversion · Inhibitory activity

Introduction

In recent years, the tremendous growth of biodiesel manufacturing industries resulted in a large production of available glycerol as by-product. Therefore, development of processes of glycerol bioconversion into high added-value products has become economically viable [1, 2]. One such chemical, namely 3-hydroxypropionic acid (3-HP), holds an important place in the current list of the top 10 platform chemicals among renewable biomass products [3]. 3-HP is a three-carbon non-chiral organic molecule, which is the isomer of lactic acid (2-HP). It contains two functional groups (carboxyl and β -hydroxyl) making it highly reactive and suitable for production of polymer materials through chemical synthesis [4] or bioproduction (e.g., poly(3-hydroxypropionate) or poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) [5–7]). 3-HP can also be used as a crosslinking agent for polymer coatings, metal lubricants, and antistatic agents for textiles [8]. Moreover, it is a precursor for several key chemical compounds, such as 1,3-propanediol ($C_3H_8O_2$), acrylic acid ($C_3H_4O_2$), methyl acrylate ($C_4H_6O_2$), acrylamide (C_3H_5NO), ethyl 3-HP ($C_5H_{10}O_3$), malonic acid ($C_3H_4O_4$), propiolactone ($C_3H_4O_2$), and acrylonitrile (C_3H_3N) [8–10]. This platform molecule or its derivatives can therefore be widely employed for the industrial production of many commercially valuable chemical compounds such as resins, adhesives, plastics, and latex. Currently, the high price and the potential toxicity of 3-HP synthesis [11] explain its low volume of production [12] which limits its use for mass markets. Despite the economic importance of 3-HP for its various applications, studies focusing on obtaining this building block by microbiological pathways are recent. Scientific studies demonstrated that few microorganisms, among which the Gram-positive probiotic *Lactobacillus reuteri*, are able to naturally produce 3-HP by bioconversion of glycerol [13–15]. With the aim of increasing the 3-HP concentrations, several studies lean on metabolic engineering of bacterial hosts such as *Klebsiella pneumoniae* (16.0 g.L⁻¹ [16], 22.7 g.L⁻¹ [17]) and *Escherichia coli* (14.3 g.L⁻¹ [18], 57.3 g.L⁻¹ [19], 42.1 g.L⁻¹ [20]). Nevertheless, although unmodified and without achieving these levels of production, *L. reuteri* is a very interesting candidate among the 3-HP-producing bacteria (GRAS status, ability to synthesize vitamin B12, glycerol not used as carbon source for growth but only as electron acceptor, avoiding the presence of undesirable by-products in the bioconversion medium). However, only the work of Dishisha et al. [15] focused on *L. reuteri* as 3-HP producer using the DSM 20016 strain. Moreover, bioconversion performances and mass balance analyses of various *L. reuteri* strains have never been studied.

The metabolic pathway of 3-HP biosynthesis from glycerol by *L. reuteri* comprises two steps (Fig. 1): a first enzymatic reaction in which glycerol is converted into 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) by a coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase (GDH, [21–24]). 3-HPA is subsequently oxidized in 3-HP through a three-step reaction. First a CoA-dependent propionaldehyde dehydrogenase (PduP) requires NAD⁺ and leads to 3-HP-CoA and NADH, H⁺. Then a phosphotransacylase (PduL) converts 3-HP-CoA into 3-HP-phosphate and simultaneously releases the Coenzyme A. Actually, a propionate kinase (PduW)

leads to 3-HP and ATP [13, 15, 25]. 3-HPA can also be reduced in 1,3-propanediol (1,3-PDO) by a 1,3-PDO oxidoreductase (PduQ) requiring NADH, H⁺ [26] (Fig. 1), the ratio between 3-HP and 1,3-PDO depending in part on the NADH, H⁺ availability. The whole enzymes involved in this glycerol metabolic pathway are encoded in the propanediol utilization (pdu) operon [25, 27]. Among the products of this metabolic pathway, only the toxicity of 3-HPA towards the producing strains has been studied in details [28–31]. Concerning 3-HP, one recent study [32] displayed that this organic acid produced by an endophytic marine fungi exerted an antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*, which was attributed to its free carboxylic acid group. In another work [33], minimum inhibitory concentration (MIC) for 3-HP on *E. coli* was estimated to be 15 g.L⁻¹. However, to the best of our knowledge, there are no studies focusing on the evaluation of the toxic effects of 3-HP on *L. reuteri*. At last, the 1,3-PDO was demonstrated to have no toxic effect when added in a wide concentration range from the beginning of glycerol fermentation by *Clostridium butyricum* [34].

In this framework, our study aims at comparing three *L. reuteri* strains (DSM 20016, ATCC 53608 and DSM 17938) in terms of glycerol bioconversion performances and mass balance analyses including the use of ¹³C NMR. In addition, the physiological state of producing

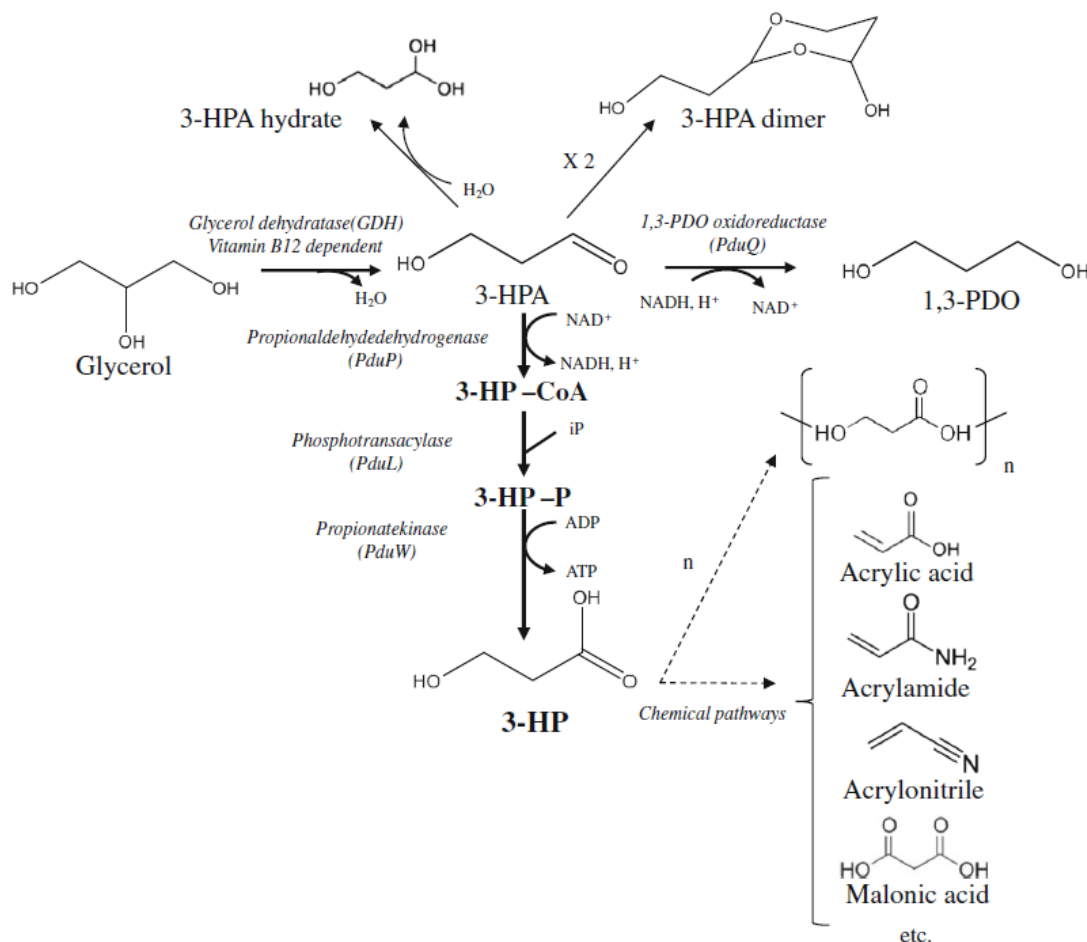


Fig. 1 Metabolic pathway of 3-HP biosynthesis from glycerol in *L. reuteri* and some potential applications of this platform chemical. **Bold arrows** correspond to metabolic pathway, **simple arrows** to chemical equilibrium of 3-HPA in the system, and **dashed arrows** to chemical pathways leading to potential 3-HP derivatives

bacteria (i.e., cell viability using flow cytometry and cultivability by plate counting) was characterized during bioconversion. Moreover, the potential toxic effect of each metabolite of the glycerol bioconversion pathway (i.e., 3-HP, 3-HPA, and 1,3-PDO) on the strain DSM 17938 was investigated. For the first time, the level of performance of the three studied strains was discussed considering the differences observed in the glycerol metabolism and in the cell resistance to the main resulting products.

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions in Schott Bottles

The DSM 20016 strain (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen, GmbH, Braunschweig, Germany), the type strain of *L. reuteri*, was purchased from the Pasteur Institute Collection (Paris, France). The ATCC 53608 strain was ordered at the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA). The ATCC 55730 strain (also called SD 2112) was cured from two plasmids, resulting in the daughter strain DSM 17938 [35], which was obtained from BioGaia AB (Stockholm, Sweden). All solutions and media in contact with *L. reuteri* were autoclaved at 110 °C for 20 min.

Bacterial growth was performed anaerobically, at 37 °C, in Schott bottles filled up with 500 mL of de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium (Biokar diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 20 g.L⁻¹ of glucose (initial pH = 6.2). The bottles were inoculated at an initial optical density at 600 nm (OD_{600 nm}) of 0.1 (corresponding to a cell concentration of 10⁸ CFU.mL⁻¹) with a preculture performed in MRS for 8 h. These cultures were conducted until the beginning of the stationary phase of growth. Cells were harvested by centrifugation (5000×g for 10 min at 4 °C) and washed twice with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) to ensure no carry-over of growth metabolites.

3-HP Production from Glycerol in Schott Bottles

Cells were re-suspended in Schott bottles (250 mL) containing 250 mL of 200 mM glycerol solution (18.2 g.L⁻¹ in distilled water, initial pH = 6.5) to an OD_{600 nm} of 20 (corresponding about 2.0.10¹⁰ CFU.mL⁻¹). In parallel, negative controls were performed by resuspending bacterial cells in distilled water without glycerol. The whole of the cell suspensions were incubated for 4 h at 37 °C. Samples were harvested each hour and immediately treated for the analyses described below. Results were reported as the means ± standard deviations of three experiments for each strain.

Acidification Kinetics

The 3-HP production during glycerol bioconversion was followed in line using the CinAc device, which continuously measured the pH values of microbial suspensions (BioVal-Process, Grignon, France; [36, 37]). Bioconversions were carried out in 150-mL flasks of glycerol (200 mM in distilled water), seeded with harvested cells at OD_{600 nm} = 20 as described above. Results were reported as the means ± standard deviations of three acidification kinetics for each strain.

Glycerol Bioconversion in Bioreactor

Growth cultures performed in Schott bottles as described above were used to inoculate a 7-L bioreactor (Setric Génie Industriel, Toulouse, France) containing 5 L of supplemented MRS at an initial $OD_{600\text{ nm}}$ of 10^{-5} (corresponding to a cell concentration of 10^4 CFU.mL⁻¹). Stirrer speed was maintained at 100 rpm, temperature at 37 °C, and pH at 6 by addition of 10 N KOH. Growth was conducted for 16 h until the beginning of the stationary phase of growth and cells were harvested as described above and re-suspended in 500 mL of distilled water. Biotransformation of glycerol was subsequently done in a 5-L Biostat®-A bioreactor (Sartorius France, Dourdan, France) with a 2.5-L working volume. The process was started by resuspending in 2.0 L solution containing 45.5 g of glycerol, the 500 mL of harvested *L. reuteri* cells, to reach an $OD_{600\text{ nm}}$ of 13 (around $1.3 \cdot 10^{10}$ CFU.mL⁻¹) and a final glycerol concentration of 18.2 g.L⁻¹ (200 mM). Glycerol biotransformation was performed at 37 °C, 100 rpm, and at pH 6 regulated with 10 N KOH. Samples were harvested each 30 min and immediately treated for measuring the metabolite concentrations. The experiment was conducted for 3 h and stopped after the end of the KOH addition and therefore of the 3-HP production. These experiments were duplicated.

Cell Cultivability

The concentration of viable and cultivable cells (i.e., cultivability, expressed in CFU.mL⁻¹) was monitored during glycerol bioconversion by plating samples serially diluted in physiological water (NaCl 150 mM) onto MRS agar medium (MRS supplemented with 15 g.L⁻¹ agar; Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Plates were incubated under anaerobic conditions (GENbox anaer, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37 °C for 48 h. Reported results were expressed as the means \pm standard deviations of two samples from three independent experiments.

Evaluation of the Cell Physiological State by Flow Cytometry

Carboxyfluorescein diacetate (cFDA) contained in Chemchrom V8 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) was used to assess *L. reuteri* viability (i.e., esterase activity assimilated to enzymatic activity) whereas the nucleic acid dye, propidium iodide (PI), made it possible to quantify dead cells (i.e., loss of membrane integrity), according to the method of Rault et al. [38]. Harvested cell suspensions of the DSM 17938 strain were diluted in Mac Ilvaine buffer pH 7.3 (0.1 M citric acid (Fisher Chemical, Elancourt, France); 0.2 M disodium dihydrogenophosphate (J. T. Baker, Deventer, The Netherlands)) to reach approximately 10^6 cells.mL⁻¹. One milliliter of each diluted suspension was supplemented with 10 μ L of PI (1.496 mM in distilled water, Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) and 10 μ L of Chemchrom V8 (formerly diluted at 10 % v/v in DMSO) and incubated for 10 min at 40 °C.

Flow cytometry analyses were performed with a BactiFlow flow cytometer (Partec, Sainte-Geneviève-des-Bois, France) equipped with a specific volumetric counting system allowing the expression of the cell concentration in number of cells per milliliter, an air-cooled argon ion laser emitting at 488 nm, and four filters: a forward-angle light scatter (FSC), a side-angle light scatter (SSC), both combined with a diode collector, a 530-nm band-pass filter (515 to 545 nm) to collect the green fluorescence of carboxyfluorescein (FL1 channel), and a 630-nm long-pass filter to collect the red fluorescence of propidium iodide (FL2 channel) with photomultiplier tubes. Milli-Q quality water was used as sheath fluid. Data were collected and analyzed with

the Flowmax software (Partec, Sainte-Geneviève-des-Bois, France). Analyses were performed by using logarithmic gains, specific detector settings, and compensation settings adjusted on samples with unstained *L. reuteri* cells in order to eliminate cellular autofluorescence. A combination of FSC and SSC was used to discriminate the bacteria from the background. The statistical tables given by the Flowmax software indicated the concentrations (in cells.mL⁻¹) and percentages of total and stained cells detected by FSC, SSC, FL1, and FL2 channels. Each result was the average \pm standard errors of two measurements on each sample from at least two independent experiments.

Data Mining and Sequence Analysis

The genome sequences of the *L. reuteri* strains DSM 20016 (accession no. CP000705.1), ATCC 53608 (accession no. GCA_000236455.1), and ATCC 55730 (i.e., the mother strain of the DSM 17938; accession no. CP002844.1) were obtained from GenBank. All predicted proteins or enzymes were searched against a non-redundant protein database (NCBI) using BLASTP. The ATCC 55730 strain was always chosen as a reference for nucleotide or amino acid sequence comparison, and the two other strains were compared to this reference strain.

3-HPA Synthesis and Quantitative Analysis of Substrates and Metabolites

Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). 3-HP was purchased from TCI-Europe (Zwyndrecht, Belgium). 3-HPA was chemically synthesized in our laboratory. 1,2,4-Butanetriol (9.4 mmol) was dissolved in dioxane (0.05 M). Water (4.7 mL) and sodium periodate (37.6 mmol) were then added, and the mixture was magnetically stirred at 1,100 rpm at room temperature. Reaction was followed by thin-layer chromatography (TLC) (9/1 ethyl acetate/methanol) until completion. The crude mixture was then filtered on Celite® and the latter washed with dioxane. The solvent was removed under reduced pressure, and the crude oil was purified by flash chromatography (100 % ethyl acetate) to provide 3-HPA as a colorless viscous oil.

Glycerol, 3-HP, 3-HPA, and 1,3-PDO concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Separation was performed on a Biorad Aminex HPX-87H column (300 mm \times 7.8 mm; Biorad, Richmond, USA) equipped with a cation H⁺ Micro-Guard column (30 mm \times 4.6 mm; Biorad) at a controlled temperature of 50 °C. Each sample (900 μ L) was mixed (50 % v/v) with trichloroacetic acid 24 % (v/v) (Prolabo, Paris, France) then centrifuged at 13,000 \times g for 2 min at 4 °C and filtered through a 0.22- μ m pore-sized filter (Millipore, Guyancourt, France). Citric acid (10 g.L⁻¹ in deionized water) was used as internal standard and added at 50 % (v/v) to the sample just before the analysis. A twenty-microliter volume of each sample was injected in a 5 mM H₂SO₄ mobile phase flowing at 0.6 mL.min⁻¹ (600 pump; Waters Associates, Millipore, Molsheim, France). Quantification was performed by a Waters ultraviolet (UV) detector set at 210 nm for 3-HP (retention time = 13.1 min) and a Waters 2414 refractive index (RI) detector put in series for glycerol, 3-HPA, and 1,3-PDO (retention time = 13.4, 15.0, and 17.7 min, respectively; Online Resource 1a and b). Injection of external standards of known amounts of fresh pure substances in filtered and deionized water permitted to establish calibration curves. Because of co-elution of glycerol and 3-HP between 13 and 14 min, the 3-HP concentration was estimated through the UV detector. The RI area corresponding to this 3-HP concentration was then calculated thanks to the corresponding RI calibration curve. The quantification of the glycerol was determined by difference between the total area of the RI peak

and the calculated contribution of 3-HP in this peak surface. Results were analyzed by the Empower software (Waters Associates). All quantifications were expressed as the means \pm standard deviations of three independent experiments.

Identification of the Products of the Glycerol Bioconversion by ^{13}C NMR Analysis

The glycerol bioconversion was followed in situ by nuclear magnetic resonance (NMR) to identify precisely the metabolites produced and especially the molecules of the 3-HPA system. The ^{13}C spectra were acquired on a 75-MHz Bruker spectrometer (Fourier 300, Bruker Biospin, Wissembourg, France) with a spectral width of 25,000 Hz and a relaxation delay of 2 s. Fields were stabilized by locking on D_2O (Euriso-Top, Saint-Aubin, France). ^{13}C glycerol was also purchased from Euriso-Top. After the end of bacterial growth, cells were washed as described above and re-suspended in 50 mL of ^{13}C glycerol (200 mM in distilled water) at an $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ of 20. 0.9 mL of bioconversion medium and 0.1 mL of D_2O were introduced in NMR tubes, and glycerol bioconversion was followed in situ at 37 °C during 3 h with one spectrum acquisition every 30 min.

Results

Monitoring of the Acidification Kinetics During Glycerol Bioconversion

To characterize and compare the 3-HP production over time between the three *L. reuteri* strains, and since 3-HP is the only organic acid produced, the kinetics of acidification during glycerol bioconversion was assessed using the CinAc system. This device aims at monitoring in real time and automatically the pH evolution of several simultaneous growth or bioconversion media of acidifying microorganisms. Figure 2 displays the pH evolution during glycerol bioconversion performed by the three studied strains. For each strain, one “control” flask (cells suspended in distilled water without glycerol) was included in the experimental design. In the case of this negative control, the slight decrease in pH observed at the beginning was due to the

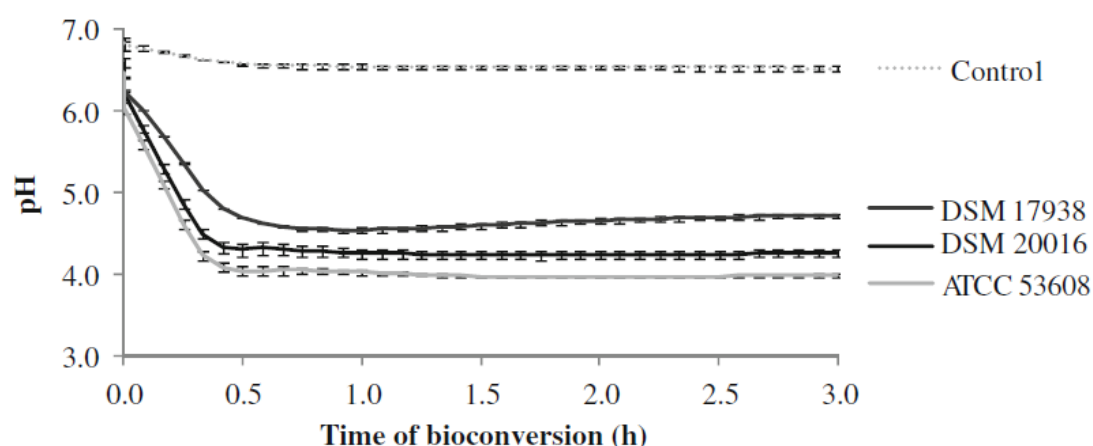


Fig. 2 Acidification kinetics of the three *L. reuteri* strains during glycerol bioconversion at 37 °C in 200 mM of glycerol in batch system: pH evolution as a function of bioconversion time. Reported results are the means \pm standard deviations of three acidification kinetics for each strain. The control corresponds to the mean \pm standard deviation of the control sample (i.e., cells in distilled water) of each strain

change in temperature. Indeed, the suspensions of cold cells from washing step needed time to reach back the incubation temperature (37 °C).

The time required to reach a minimal pH value (i.e., 4.5, 4.2, and 4.0 for the DSM 17938, DSM 20016, and ATCC 53608 strains, respectively) from an initial pH of 6.5 slightly differed between the three strains: 30 min for the two latest and 45 min for the DSM 17938 (Fig. 2). A ranking based on the acidification performance of these strains under the performed bioconversion conditions can thus be established: the DSM 20016 and ATCC 53608 strains were the fastest, while the DSM 17938 strain was slower. In addition, the ATCC 53608 strain was the best acid producer, followed by the DSM 20016, while the DSM 17938 strain produced less organic acid. Compared to the negative control, the observed pH changes were only due to the presence of glycerol in the medium and to its bioconversion into organic acid through bacterial cell activity.

Comparison of Glycerol Bioconversion into 3-HP Between the Three *L. reuteri* Strains

Figure 3 shows the evolution of glycerol, 3-HPA, 3-HP, and 1,3-PDO concentrations along the bioconversion process. In bottles without any glycerol added, neither 3-HPA nor 1,3-PDO and 3-HP were produced (data not shown). As displayed in Fig. 3, the glycerol initially present was not entirely consumed as 10.8, 6.6, and 4.4 g.L⁻¹ remained in the medium for the DSM 20016, ATCC 53608, and DSM 17938 strains, respectively. Glycerol consumption occurred during 1 to 1.5 h for all of the three strains. The highest 3-HP accumulation (i.e., 3.1 g.L⁻¹ after 2 h) was observed for the ATCC 53608 strain, whereas it reached 2.4 g.L⁻¹ for the DSM 20016 after 1 h and 2.3 g.L⁻¹ for the DSM 17938 strain after 1.5 h. These results are consistent with the previous observations made with the CinAc system (Fig. 2), especially the ranking of the kinetic parameters was the same for the three strains. The maximal 3-HPA concentration (5.0,

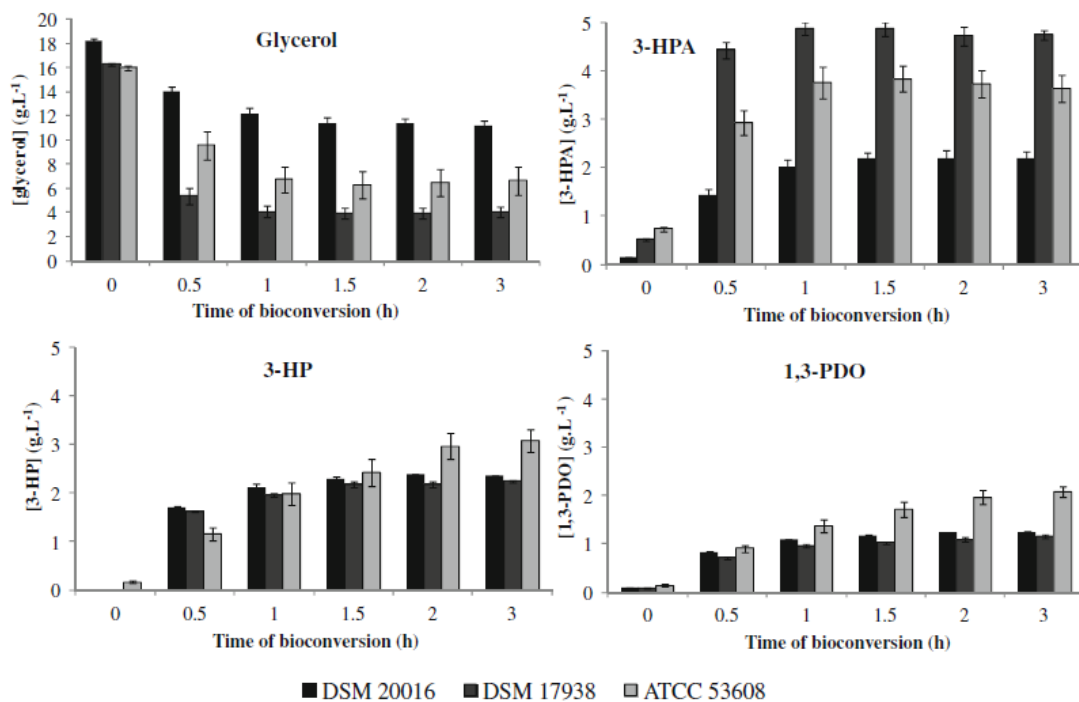


Fig. 3 Evolution of the glycerol, 3-HPA, 3-HP, and 1,3-PDO concentrations determined by HPLC analyses of the medium during bioconversion performed by the three *L. reuteri* strains in bottles

3.4, and 2.1 g.L⁻¹ for the DSM 17938, ATCC 53608, and DSM 20016 strains, respectively) was achieved after 1.5 h, which was concomitant with the end of the glycerol uptake (Fig. 3). Concerning the 1,3-PDO production, results were similar to those obtained for 3-HP: the highest accumulation (2.1 g.L⁻¹ after 2 h) was reached by the ATCC 53608 strain, whereas it was lower for the two other strains (1.3 and 1.2 g.L⁻¹ after 1 to 1.5 h for the DSM 20016 and DSM 17938 strains, respectively).

The calculation of the 3-HP, 1,3-PDO, and 3-HPA production yields, determined after 3 h of bioconversion, allowed establishing metabolic variations between the three strains (Table 1). The yield of 3-HPA production differed between strains as the DSM 20016 and the ATCC 53608 were characterized by the lowest values (0.35 and 0.37 mol/mol, respectively), whereas the DSM 17938 strain showed the highest value (0.45 mol/mol, respectively). Concerning the 3-HP production, the best yield was obtained with the DSM 20016 strain (0.33 mol/mol) whereas the worst was achieved by the DSM 17938 (0.17 mol/mol). In the case of 1,3-PDO, the DSM 20016 and ATCC 53608 strains exhibited the highest yields of conversion (0.21 and 0.22 mol/mol), while the DSM 17938 strain displayed the lowest (0.10 mol/mol).

The ratio of 3-HP on 1,3-PDO concentrations reached at the end of the glycerol bioconversions (Table 1) provides information on the balance between the two enzymatic reactions starting from 3-HPA (Fig. 1): for the three strains, 3-HPA was preferentially transformed in 3-HP (ratios >1) and the highest ratio was obtained with the DSM 17938 strain (ratio = 1.65), immediately followed by the DSM 20016 strain (ratio = 1.59).

The molar sum of products (3-HP, 1,3-PDO, and 3-HPA) should theoretically equal the amount of glycerol used. Table 1 displays for each strain the molar balance (i.e., ratio of molar concentrations of produced 3-HP, 1,3-PDO, and 3-HPA on consumed glycerol, expressed in %). In the three cases, this molar balance was lower than 100 % (73, 86, and 88 % for the DSM 17938, ATCC 53608, and DSM 20016 strains, respectively, Table 1). In order to explain these results, ¹³C NMR analyses were performed during bioconversion of ¹³C-labelled glycerol by *L. reuteri* DSM 20016 and DSM 17938, these strains displaying respectively the best and the worst molar balance. After 3 h of bioconversion in D₂O (Fig. 4), the analysis showed that glycerol, 3-HPA (in the form of monomers and dimers), 3-HP, and 1,3-PDO were the only components of the bioconversion medium for both strains. No difference was highlighted between these two strains, indicating that the degradation products of glycerol were the same in both cases.

Table 1 Characterization of the glycerol consumption and metabolite production during bioconversions performed by the three *L. reuteri* strains

	DSM 17938	DSM 20016	ATCC 53608
Glycerol consumed (g.L ⁻¹)	13.82 ± 0.06	7.39 ± 0.31	11.55 ± 1.19
(% of the initial concentration)	75.95 ± 0.30	40.60 ± 1.69	63.44 ± 6.54
$Y_{3\text{-HPA/glycerol}}$ (mol/mol)	0.45 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.04
$Y_{3\text{-HP/glycerol}}$ (mol/mol)	0.17 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.27 ± 0.01
$Y_{1,3\text{-PDO/glycerol}}$ (mol/mol)	0.10 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01
[3-HP]/[1,3-PDO] (mol/mol)	1.65 ± 0.09	1.59 ± 0.03	1.25 ± 0.03
Molar balance (%)	73 ± 1	88 ± 4	86 ± 5

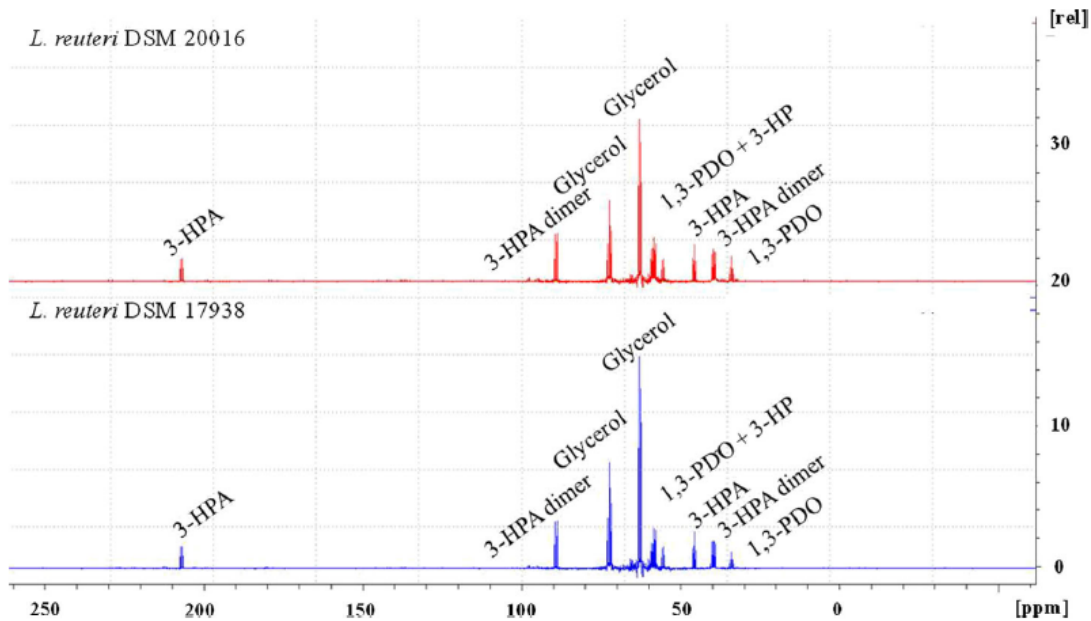


Fig. 4 ^{13}C NMR spectra after 3 h of glycerol bioconversion performed by the DSM 20016 and the DSM 17938 strains

Glycerol Bioconversion in Bioreactor Using the DSM 17938 Strain

Figure 5 displays the glycerol consumption and metabolite production by the *L. reuteri* DSM 17938 strain in bioreactor at 37 °C and pH regulated at pH = 6. The bioconversion quickly stopped (after 1 h, Fig. 5) despite pH regulation. Glycerol was less consumed than in bottles (7.9 vs. 13.8 g.L⁻¹) and 3-HP and 1,3-PDO were less produced (0.9 and 0.3 g.L⁻¹ vs. 2.3 and 1.2 g.L⁻¹, respectively). Moreover, the 3-HP production yield also decreased (0.11 vs. 0.17 mol/mol). Nevertheless, the ratio of 3-HP on 1,3-PDO increased (2.53 vs. 1.65 mol/

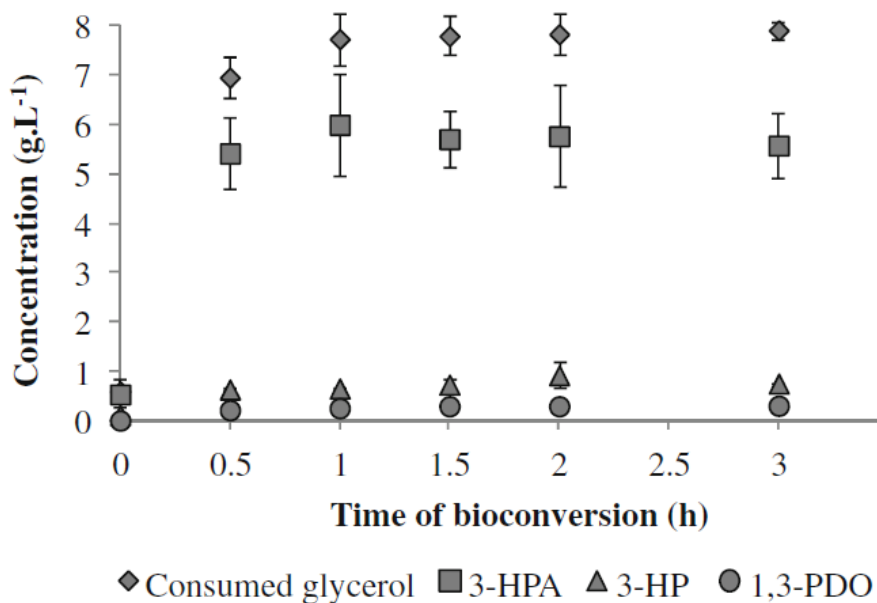


Fig. 5 Evolution of the glycerol, 3-HPA, 3-HP, and 1,3-PDO concentrations determined by HPLC analyses of the medium during bioconversion performed by the *L. reuteri* DSM 17938 strain in bioreactor at pH 6

mol). Concerning 3-HPA, the final production (5.6 g.L^{-1} , Fig. 5) was slightly higher than the one obtained in Schott bottles (5.0 g.L^{-1} , Fig. 3) and the production yield almost doubled (0.86 vs. 0.45 mol/mol).

Toxicity of the Produced Metabolites on *L. reuteri* Strains

As shown in Fig. 6, cell cultivability drastically dropped for the three strains after 1 h of glycerol bioconversion, with no more colony detected on agar plates after 2 h for the DSM 17938 and ATCC 53608 strains and after 3 h for the DSM 20016 strain (Fig. 6a). These results were consistent with the 3-HPA and 3-HP production kinetics determined by HPLC analyses (Fig. 3). In fact, the DSM 20016 strain was the lowest producer of 3-HPA and 3-HP which may explain that it is less exposed to their toxic effect. The study of the impact of pH and 3-HP and 3-HPA concentrations on cell cultivability during glycerol bioconversion showed a concomitant inhibition effect of these three parameters on *L. reuteri* but highlighted differences in the impact of each parameter on the three studied strains (Fig. 6b–d). The DSM 17938 strain seemed to be the most sensible to pH (Fig. 6b) and 3-HP (Fig. 6c) but the most resistant to 3-HPA (Fig. 6d).

Given these results and in order to better understand the role played by each parameter, *L. reuteri* DSM 17938 strain was selected and its physiological state investigated by flow cytometry analyses (Fig. 7). The bacterial cell concentration and enzymatic activity (more precisely, the esterase activity) was assessed during glycerol bioconversion (Fig. 7a, b). Total cell concentration did not change during the storage in distilled water (i.e., control samples; Fig. 7a) while the concentration of bacteria displaying an enzymatic activity and considered as

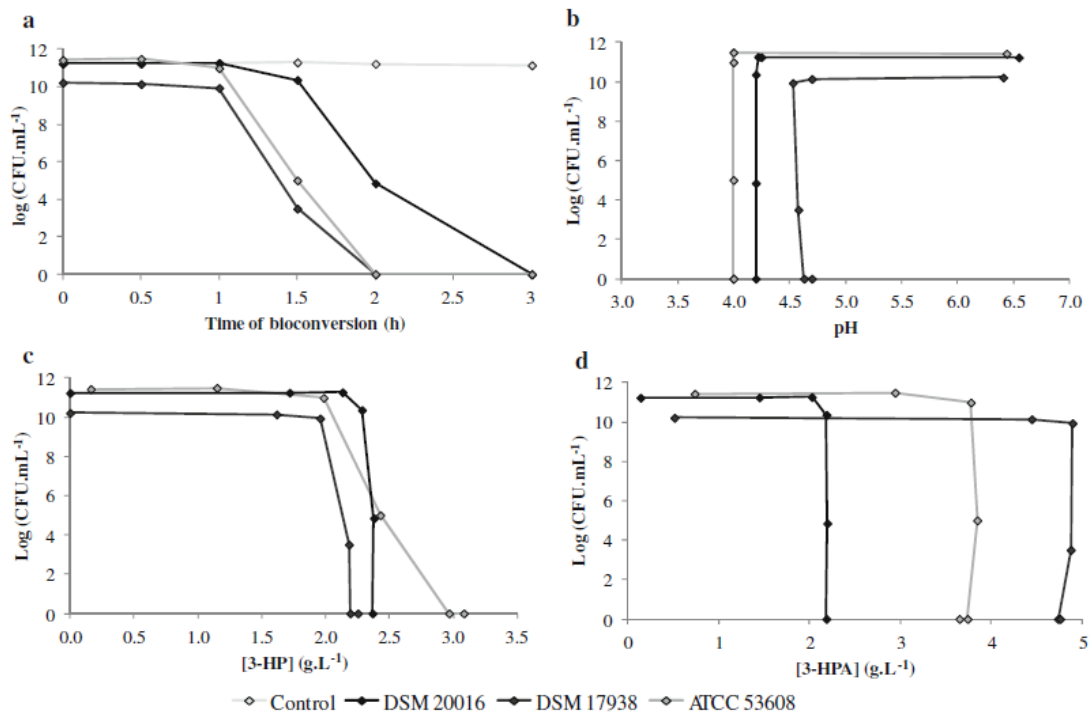


Fig. 6 Impact of glycerol bioconversion on *L. reuteri* cultivability. **a** Evolution of the cultivability of the three strains during glycerol bioconversion and impact of **b** pH, **c** concentration of produced 3-HP, and **d** concentration of produced 3-HPA on cell cultivability

viable remained stable around 90 % (Fig. 7b). Thus, there was no cell inactivation due to a long time in an aqueous medium without any energy source. On the contrary, glycerol bioconversion and therefore 3-HPA and 3-HP productions and linked pH decrease led to a decline in the percentage of cells displaying an enzymatic activity from 93.4 % of the total population to 58.3 % in 3 h and only 1.2 % after 24 h (Fig. 7b), whereas the total cell concentration did not vary (Fig. 7a). It thus demonstrated that pH, 3-HP, and/or 3-HPA produced by bacterial cells affected their physiological state and more precisely their enzymatic activity. The comparison between the flow cytometry (Fig. 7b) and the plate counting (Fig. 6) results gives complementary and interesting information, as the loss in cultivability was total after 2 h whereas the loss in enzymatic activity was only of 35 % after the same time.

To deepen the understanding of metabolite impact on *L. reuteri* physiological state and the contribution of each of them to the global inhibition phenomenon, cells of the DSM 17938 strain were suspended in aqueous solutions of 3-HP (2.5 g.L^{-1}), 3-HPA (5 g.L^{-1}), and 1,3-PDO (2.5 g.L^{-1}) during 30 min and 3 h, before evaluation of their enzymatic activity and membrane integrity by flow cytometry. These concentrations were chosen because they correspond to those reached during the glycerol bioconversion by this strain. In the case of 3-HP, two different pH were tested (the pH of the solution at 2.5 g.L^{-1} , namely pH 3 and a pH adjusted at 5 with KOH 5 N) in order to investigate the role played by the pH in 3-HP toxicity. Contrary to the 1,3-PDO showing no more deleterious effect than to the control (i.e., cells in

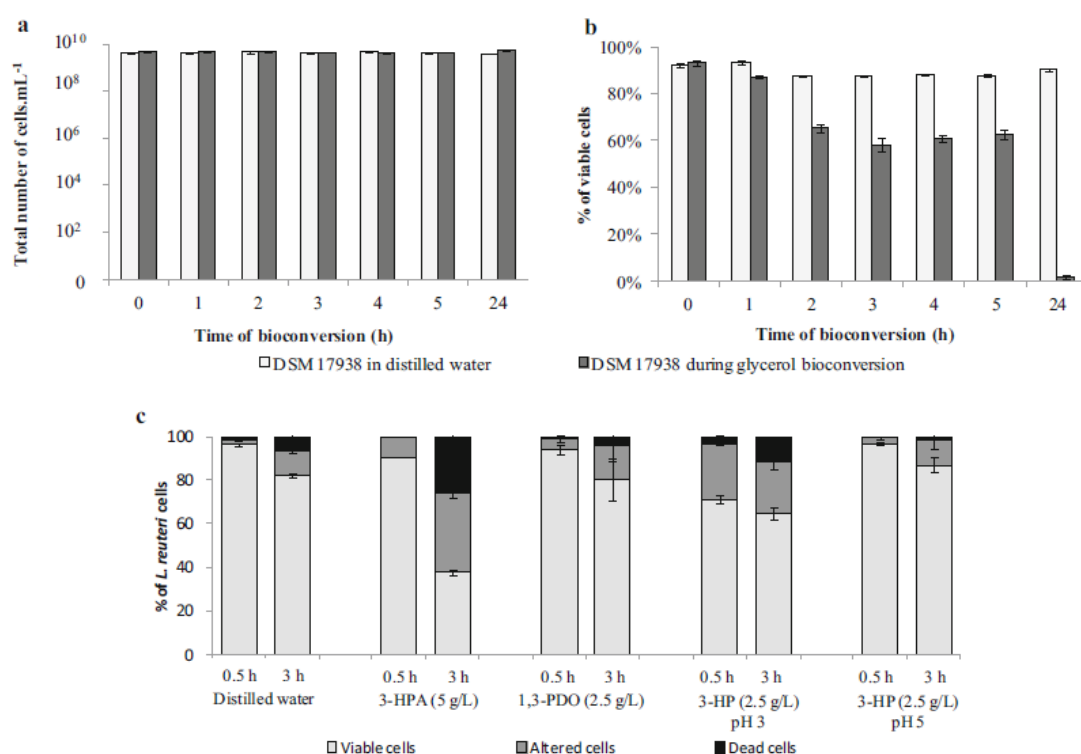


Fig. 7 Evaluation of the physiological state of *L. reuteri* DSM 17938 performed by flow cytometry during the glycerol bioconversion compared to cells in distilled water (control). **a** Evolution of the total cell concentration (expressed in cells.mL^{-1}) as a function of time, **b** evolution of the percentage of cells displaying an enzymatic activity (i.e., stained by carboxyfluorescein diacetate). **c** Comparison of the bacterial physiological state after a 30-min and a 3-h exposure to 3-hydroxypropionaldehyde (5 g.L^{-1}), 1,3-propanediol (2.5 g.L^{-1}), and 3-hydroxypropionic acid (2.5 g.L^{-1}) at the free pH of the solution (i.e. pH 3) and at a fixed pH (i.e., pH 5) compared to cells suspended in distilled water (control)

distilled water), results revealed a major impact of 3-HPA on bacterial physiological state, particularly after 3 h of contact with cells, (Fig. 7c). The impact of 3-HP at free pH (i.e., pH 3) was lower than that of 3-HPA but already noticeable after 30 min of contact. It is worth to note that, when the pH of the 3-HP solution was fixed at 5, no alteration of the bacterial physiological state was detected (Fig. 7c), underlying the significant role played by the pH in 3-HP toxicity at the tested concentration.

Discussion

Our results show that *L. reuteri* strains vary in their ability to convert glycerol into 3-HP. To get a better understanding of the dynamics of glycerol bioconversion by *L. reuteri* and to compare the performance of the three strains, metabolite concentration and cell viability were evaluated over time during incubation of bacterial cells in glycerol solution. It appears that the three studied strains exhibited different behaviors in bottles in terms of glycerol consumption and 3-HP production: the ATCC 53608 strain was the most productive ($3.1 \text{ g.L}^{-1}/34.2 \text{ mM}$, Fig. 3), but its production yield was intermediate (0.27 mol/mol , Table 1) and its 3-HP/1,3-PDO ratio was the lowest (1.25 mol/mol). The DSM 20016 strain was less productive ($2.4 \text{ g.L}^{-1}/26.3 \text{ mM}$) and consumed very little glycerol (41 % of the initial quantity), but its production yield was the highest (0.33 mol/mol) and its ratio 3-HP on 1,3-PDO was significant (1.59 mol/mol). Lastly, the DSM 17938 strain displayed an intermediate behavior characterized by the lowest production yield (0.17 mol/mol) and a similar 3-HP/1,3-PDO ratio (1.65 mol/mol) and 3-HP production ($2.3 \text{ g.L}^{-1}/25.7 \text{ mM}$) to the one produced by DSM 20016 strain, but the highest glycerol consumption (76 % of the initial quantity).

NMR analyses helped in explaining the quite low molar balance obtained for each strain during glycerol bioconversion. Based on the NMR results, we suspected that one or several molecules were probably not detected by HPLC detectors used in our experimental conditions and could be one or several forms of the 3-HPA system (including 3-HPA hydrate or 3-HPA oligomers). For example, the DSM 17938 strain produced more 3-HPA than the two others (5.0 g.L^{-1} against 3.4 and 2.1 g.L^{-1} for the ATCC 53608 and DSM 20016 strains, respectively) and its molar balance was the worst (73 %). As the form of 3-HPA (monomer or dimer) is directly linked to its concentration [28, 39], we supposed that the dimeric fraction could not be detected by the RI or UV detectors that may explain the molar unbalance observed for this strain. Conversely, for the DSM 20016 strain, less 3-HPA was produced and probably less dimeric form of 3-HPA was present. The molar balance (88 %) was better because the major part of the 3-HPA was under monomeric form and therefore more correctly quantified by our HPLC method. The results reported by Dishisha et al. [15] support our hypothesis, as the molar balance calculated from their data was close to 100 %, with a very low amount of produced 3-HPA (less than 1.5 g.L^{-1}), due to their implemented fed-batch strategy. A better understanding of the 3-HPA system and particularly the setting of an analytical method allowing the detection and quantification of the different forms of this complex system would be necessary.

For all the three stains, the 3-HP production starting from glycerol was higher than the 1,3-PDO one, that was surprising compared to previous study reporting an equimolar ratio between these two products using *L. reuteri* DSM 20016 strain [15]. Given that the production of 1 mol of 3-HP generates also 1 mol of ATP (Fig. 1), this could be more advantageous for *L. reuteri* cells to produce 3-HP rather than 1,3-PDO, if NAD^+ can be provided by another way

than the synthesis of 1,3-PDO. As the production of 3-HP yields 1 mol of NADH, H⁺ per mole of product and the production of 1,3-PDO regenerates the NAD⁺ both from 3-HPA (Fig. 1), the ratio between 3-HP and 1,3-PDO is expected to be 1. The excess in 3-HP observed here could be the result of the activity of a NADH oxidase (EC number, 1.6.99.3) whose sequence has been detected in the genomes of the three *L. reuteri* strains (Online Resources 2, 3, and 4). This could explain the higher molar concentration of 3-HP than that of 1,3-PDO by oxidation of NADH, H⁺ into NAD⁺ in the presence of O₂. In scaling up the glycerol bioconversion with the DSM 17938 strain to a 5-L bioreactor, where the headspace was bigger (4.1 L vs. 60 mL in bottles), the 3-HP/1,3-PDO ratio increased to 2.53 mol/mol (vs. 1.65 mol/mol). This result would be consistent with the hypothesis of an active NADH oxidase. However, the bioconversion performances in bioreactor with a controlled pH were not better than in bottles. In bioreactor, the ratio 3-HPA/biomass was significantly higher than in bottles (1.05 and 0.64 g/g, respectively), which could explain the quick inhibition of the producing cells and the consequent low efficiency of the bioconversion.

The differences between strains in terms of glycerol metabolism and 3-HP production capabilities are partly interrelated to differences of toxicity observed on the producing strains. Concerning this inhibition, it is well known that 3-HPA is toxic for the producing cells when present at a certain threshold concentration (between 10 and 30 mM, [28, 40]) which is a limiting factor for high 3-HP production. In addition, and even if its deleterious effect has been very little studied, 3-HP is toxic as other organic acids, at least because of the decrease in pH induced by its production. As shown in our study, glycerol consumption, 3-HPA, 3-HP, and 1,3-PDO productions stopped after 1 to 1.5 h of incubation depending on the strain (Fig. 3), which can be related to the inhibition of bacterial cells due to 3-HPA and 3-HP accumulation. The observed loss in cultivability (more than 10 logs of CFU.mL⁻¹ for the three strains, Fig. 6) and in enzymatic activity (about 40 % after 3 h and 99 % after 24 h for the DSM 17938 strain used as an example, Fig. 7b) may be due to the oxidative stress caused by 3-HPA on bacterial cells and/or to the decrease in pH linked to 3-HP production. In fact, 3-HPA acts via interaction of its aldehyde group with thiol groups of cell components, particularly proteins and enzymes [31]. Vollenweider et al. [41] completed this hypothesis and proposed an antimicrobial mechanism for 3-HPA, whereby its activity leads to depletion of free SH groups in cell proteins causing an imbalance of the cellular redox status, ultimately resulting in cell death.

As other organic acids and particularly as its positional isomer the 2-HP (or lactic acid), the 3-HP is deleterious to cell survival and to its own production notably by causing a decrease in extracellular and intracellular pH affecting enzyme and cellular protein activity or because of the expense of energy required to export organic acids out of the cell, particularly at low extracellular pH [42]. Our results showed a significant deleterious effect on *L. reuteri* cultivability when the pH decreased below 4.7 (Fig. 6b), when close to the pK_a (i.e., 4.51). Flow cytometry analyses on the DSM 17938 strain corroborated this hypothesis, as the impact of 3-HP on cell physiological state was noticeable at pH 3 but not at pH 5 (Fig. 7c), confirming the importance of pH in 3-HP toxic effect. The ATP generation along the organic acid formation pathways, as for 3-HP production, from glycerol, by *L. reuteri* (Fig. 1), can also have a significant impact on product export and therefore on intracellular pH [42]. In addition to the pH-based inhibition linked to intra- and extracellular 3-HP, a specific interference of its anionic form with the cellular metabolism was reported by Warnecke et al. [43], who observed that the 3-HP toxicity in *E. coli* involved inhibition of the chorismate and threonine superpathways. A study on *K. pneumoniae* showed that when 3-HP was added to the culture medium, the rates of cell growth, glycerol consumption, and 3-HP production gradually decreased as the 3-HP

concentration increased between 120 and 790 mM (e.g., about four times less 3-HP production compared to culture performed without 3-HP) [17]. Moreover, the MIC for 3-HP has been estimated to 15 g.L^{-1} in the case of *E. coli* [33]. Nevertheless, the effects of acid stress on lactic acid bacteria physiology [44] and particularly the impact of 3-HP on *L. reuteri* are not known in details. Furthermore, this impact would certainly be visible at lower 3-HP concentrations in the case of glycerol bioconversion by *L. reuteri* due to the joined inhibitory impact of 3-HPA.

In order to explain the differences between the three *L. reuteri* strains in terms of glycerol bioconversion, data mining analyses were performed. As the genomes of the strains have been sequenced and annotated, it is therefore possible to compare the nucleotide and amino acid sequences of the two main enzymes involved in the glycerol bioconversion pathway (i.e., the glycerol dehydratase, GDH, and the propionaldehyde dehydrogenase, PduP). This analysis revealed that the nucleotide sequences of each enzyme are highly conserved among the three strains (between 92.4 and 100 % identity for these GDH and PduP nucleotide sequences). It was the same for the comparison of amino acid sequences of the GDH (99.6 % identity between the DSM 17938 and the ATCC 53608 strains and 97.6 % identity between the former and the DSM 20016 strain) and the PduP (100 % identity between the DSM 17938 and the ATCC 53608 strains and 97.2 % identity between the former and the DSM 20016 strain), which showed that the differences in bioconversion performances observed between the three strains might partially be explained by this assumption. Other hypotheses could be proposed, such as a difference in the expression of genes encoding for the enzyme promoters, for the vitamin B12 synthesis (starting from glutamate) into bacterial cell, or for the glycerol transport through the membrane. Morita et al. [27] identified the PduF protein as the glycerol carrier in *L. reuteri* DSM 20016 cells. However, no difference in the amino acid sequences of this carrier was observed between the three strains after the BLASTP performed in our study (data not shown). Moreover, the comparison of the protein sequences of both GDH and PduP enzymes, and especially their number of cysteins which could bind 3-HPA via its aldehyde group (i.e., 11 cysteins for the GDH and 6 for the PduP), did not allow explaining the observed differences between the studied strains. The differences in terms of resistance to product toxicity and ability to produce 3-HP could therefore be due to 3-HP and/or 3-HPA tolerance, NAD^+ regeneration capacity, ability to produce vitamin B12, or differences in enzyme expression.

Conclusion

With a productivity in non-optimal conditions around $2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ of 3-HP and $4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ of 3-HPA depending on the strain, this study confirmed the potential of *L. reuteri* for the biotechnological production of 3-HP using a two-step process involving biomass production followed by glycerol bioconversion into 3-HP. Surprisingly, the mass balance analyses evidenced a higher 3-HP molar production than the one of 1,3-PDO for the three studied strains (molar ratios 3-HP/1,3-PDO > 1). This fact was confirmed in bioreactor for the DSM 17938 strain. Moreover, this scaling up should be improved to understand the role played by environmental conditions (pH, aeration, redox status) on bioconversion performances. As the toxicity of the products is critical, several directions can be considered to solve this problem: (i) the understanding of the mechanisms underlying the inhibitory effects of 3-HP and 3-HPA on the producing bacteria, (ii) the use of an integrated process coupling bioconversion and in situ extraction of 3-HP to optimize the production performances, and (iii) the use of a fed-batch mode for glycerol supply to avoid 3-HPA accumulation.

Acknowledgments The authors thank Chandanie Hunter for correcting the English version of the manuscript.

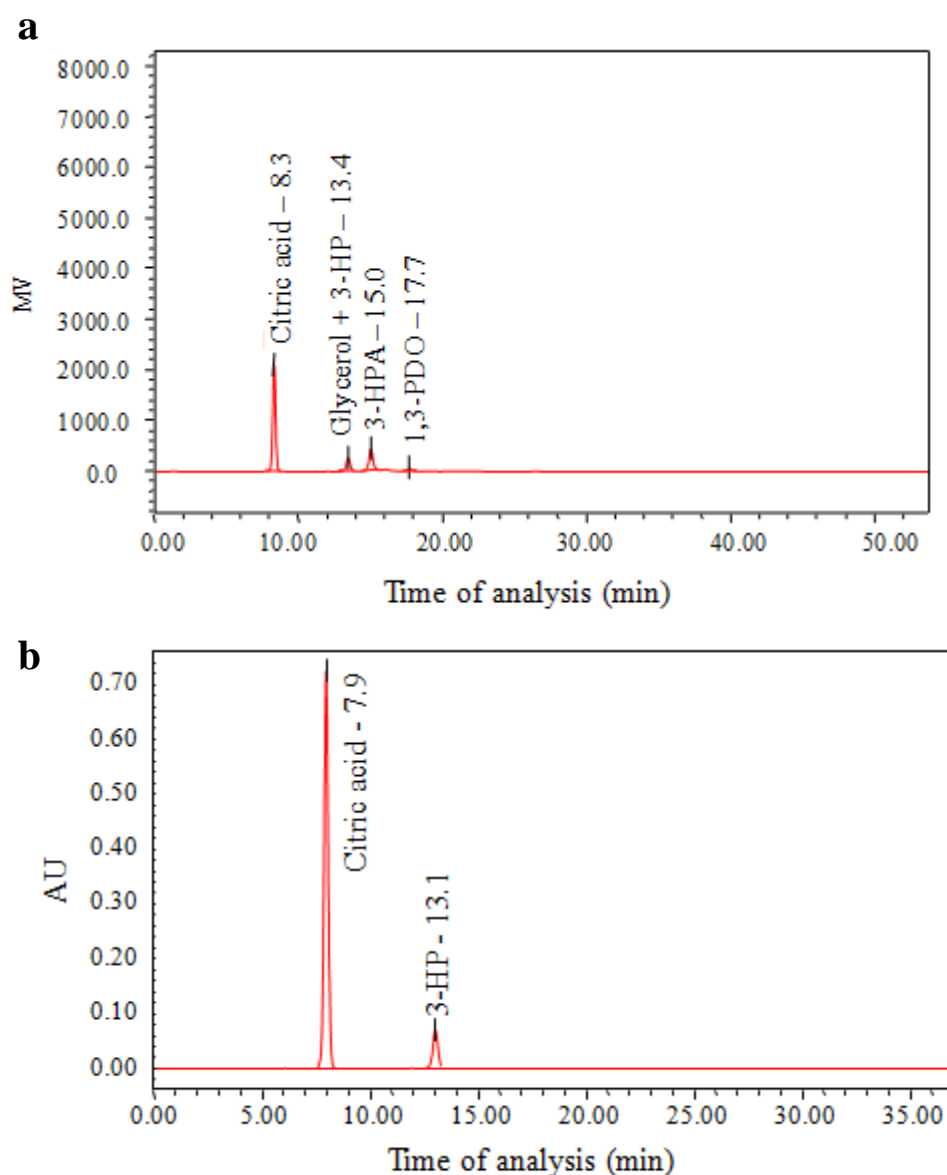
Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. da Silva, G. P., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.*, *27*, 30–39.
2. Pagliaro, M., Ciriminna, R., Kimura, H., Rossi, M., & Della Pina, C. (2009). Recent advances in the conversion of bioglycerol into value-added products. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, *111*, 788–799.
3. Bozell, J. J., & Petersen, G. R. (2010). Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green. Chem.*, *12*, 539–554.
4. Zhang, D., Hillmyer, M. A., & Tolman, W. B. (2004). A new synthetic route to poly[3-hydroxypropionic acid] (P[3-HP]): ring-opening polymerization of 3-HP macrocyclic esters. *Macromol.*, *37*, 8198–8200.
5. Andreeßen, B., Lange, A. B., Robenek, H., & Steinbüchel, A. (2010a). Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *76*, 622–626.
6. Andreeßen, B., & Steinbüchel, A. (2010b). Biosynthesis and biodegradation of 3-hydroxypropionate-containing polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.*, *76*, 4919–4925.
7. Heinrich, D., Andreeßen, B., Madkour, M. H., Al-Ghamd, M. A., Shabbaj, I. I., & Steinbüchel, A. (2013). From waste to plastic: synthesis of poly(3-hydroxypropionate). *Appl. Environ. Microbiol.*, *79*, 3582–3589.
8. Gokam, R.R., Selifonova, O.V., Jessen, H.J., Steven, J.G., Selmer, T., & Buckel, W. (2002). 3-hydroxypropionic acid and other organic compounds. Patent application no. PCT/US2002/42418 A2 (Cargill, Inc.).
9. Tsobanakis, P., Meng, X., & Abraham, T.W. (2009). Methods of manufacturing derivatives of beta-hydroxylic acids. Patent application no. PCT/US2009/0298144 A1 (Cargill, Inc.).
10. Lilga, M.A., White, J.F., Holladay, J.E., Zacher, A.H., Muzatko, D.S., & Orth, R.J. (2010). Method for conversion of β -hydroxy carbonyl compounds. Patent application no. PCT/US2007/687661 B2 (Battelle Memorial Institute).
11. Della Pina, C., Falletta, E., & Rossi, M. (2011). A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropionic acid. *Green. Chem.*, *13*, 1624–1632.
12. Arceo, E., Marsden, P., Bergman, R. G., & Ellman, J. A. (2009). An efficient didehydroxylation method for the biomass-derived polyols glycerol and erythritol. Mechanistic studies of a formic acid-mediated deoxygenation. *Chem. Commun.*, *23*, 3357–3359.
13. Luo, L. H., Seo, J. W., Baek, J. O., Oh, B. R., Heo, S., Hong, W. K., Kim, D. H., & Kim, C. H. (2011). Identification and characterization of the propanediol utilization protein PduP of *Lactobacillus reuteri* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *89*, 697–703.
14. Kumar, V., Ashok, S., & Park, S. (2013a). Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnol. Adv.*, *31*, 945–961.
15. Dishisha, T., Pereyra, L. P., Pyo, S. H., Britton, R. A., & Hatti-Kaul, R. H. (2014). Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microb. Cell Fact.*, *13*, 76–85.
16. Ashok, S., Raj, S. M., Rathnasingh, C., & Park, S. (2011). Development of recombinant *Klebsiella pneumoniae* Δ dhaT strain for the co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *90*, 1253–1265.
17. Kumar, V., Sankaranarayanan, M., Durgapal, M., Zhou, S., Ko, Y., Ashok, S., Sarkar, R., & Park, S. (2013b). Simultaneous production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol using resting cells of the lactate dehydrogenase-deficient recombinant *Klebsiella pneumoniae* overexpressing an aldehyde dehydrogenase. *Bioresour. Technol.*, *135*, 555–563.
18. Kwak, S., Park, Y. C., & Seo, J. H. (2013). Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant *Escherichia coli* expressing *Lactobacillus brevis* dhaB and dhaR gene clusters and *E. coli* K-12 aldH. *Bioresour. Technol.*, *135*, 432–439.
19. Kim, K., Kim, S. K., Park, Y. C., & Jin-Ho Seo, J. H. (2014). Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by modulation of glycerol metabolism in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.*, *156*, 170–175.
20. Jung, W. S., Kang, J. H., Chu, H. S., Choi, I. S., & Cho, K. M. (2014). Elevated production of 3-hydroxypropionic acid by metabolic engineering of the glycerol metabolism in *Escherichia coli*. *Metabol. Eng.*, *23*, 116–122.
21. Talarico, T. L., & Dobrogosz, W. J. (1990). Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Env. Microbiol.*, *56*, 1195–1197.

22. Sriramulu, D. D., Liang, M., Hernandez-Romero, D., Raux-Deery, E., Lunsdorf, H., Parsons, J. B., Warren, M. J., & Prentice, M. B. (2008). *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 produces cobalamin-dependent diol dehydratase in metabolosomes and metabolizes 1,2-propanediol by disproportionation. *J. Bacteriol.*, *190*, 4559–4567.
23. Sardari, R. R. R., Dishisha, T., Pyo, S. H., & Hatti-Kaul, R. (2013a). Improved production of 3-hydroxypropionaldehyde by complex formation with bisulfite during bio-transformation of glycerol. *Biotechnol. Bioeng.*, *110*, 1243–1248.
24. Sardari, R. R. R., Dishisha, T., Pyo, S. H., & Hatti-Kaul, R. (2013b). Biotransformation of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde: Improved production by in situ complexation with bisulfate in a fed-batch mode and separation on anion exchanger. *J. Biotechnol.*, *168*, 534–542.
25. Sabet-Azad, R., Linares-Pasten, J.A., Torkelson, L., Sardari, R.R.R., & Hatti-Kaul, R. (2013). Coenzyme A-acylating propionaldehyde dehydrogenase (PduP) from *Lactobacillus reuteri*: Kinetic characterization and molecular modeling. *Enzyme Microb. Technol.* *53*, 235–242.
26. Stevens, M. J. A., Vollenweider, S., Meile, L., & Lacroix, C. (2011). 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microb. Cell Fact.*, *10*, 61–69.
27. Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Itoh, K., O'Sullivan, D. J., McKay, L. L., Ohno, H., Kikuchi, J., Masaoka, T., & Hattori, M. (2008). Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res.*, *15*, 151–161.
28. Vollenweider, S., & Lacroix, C. (2004). 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *64*, 16–27.
29. Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., & Le Blay, G. (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol.*, *7*, 101–109.
30. Spinler, J. K., Taweechoitpat, M., Rognerud, C. L., Oub, C. N., Tumwasorn, S., & Versalovic, J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, *14*, 166–171.
31. Schaefer, L., Auchtung, T. A., Hermans, K. E., Whitehead, D., Borhan, B., & Britton, R. A. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiol.*, *156*, 1589–1599.
32. Sebastianes, F. L. S., Cabedo, N., El Aouad, N., Valente, A. M. M. P., Lacava, P. T., Azevedo, J. L., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Cortes, D. (2012). 3-Hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. *Curr. Microbiol.*, *65*, 622–632.
33. Wamecke, T. E., Lynch, M. D., Lipscomb, M. L., & Gill, R. T. (2012). Identification of a 21 amino acid peptide conferring 3-hydroxypropionic acid stress-tolerance to *Escherichia coli*. *Biotechnol. and Bioeng.*, *109*, 1347–1352.
34. Colin, T., Bories, A., & Moulin, G. (2000). Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *54*, 201–205.
35. Rosander, A., Connolly, E., & Roos, S. (2008). Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl. Environ. Microbiol.*, *74*, 6032–6040.
36. Corrieu, G., Spinnler, H.E., Jomier, Y., & Picque, D. (1988). Automated system to follow up and control the acidification activity of lactic acid starters. Patent application no. FR 2 629 612 (INRA).
37. Spinnler, H. E., & Corrieu, G. (1989). Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *J. Dairy Res.*, *56*, 755–764.
38. Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J. C., & Bouix, M. (2007). Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiol.*, *55*, 35–43.
39. Vollenweider, S., Grassi, G., König, I., & Puhán, Z. (2003). Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, *51*, 3287–3293.
40. Barbirato, F., Grivet, J. P., Soucaille, P., & Bories, A. (1996). 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, *62*, 1448–1451.
41. Vollenweider, S., Evers, S., Zurbruggen, K., & Lacroix, C. (2010). Unraveling the HPA system: an active antimicrobial agent against human pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, *58*, 10315–10322.
42. van Maris, A. J. A., Konings, W. N., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2004). Microbial export of lactic acid and 3-hydroxypropionic acid: implications for industrial fermentation processes. *Metab. Eng.*, *6*, 245–255.
43. Wamecke, T. E., Lynch, M. D., Karimpour-Fard, A., Lipscomb, M. L., Handke, P., Mills, P. T., Ramey, C. J., Hoang, T., & Gill, R. T. (2010). Rapid dissection of a complex phenotype through genomic scale mapping of fitness altering genes. *Metabol. Eng.*, *12*, 241–250.
44. van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *82*, 187–216.

Supplementary Material



Online Resource 1 a Chromatogram (detection by Refractive Index) of the bioconversion medium of the DSM 17938 strain. Retentions times in minutes (RT) are indicated for each peak. Citric acid (RT = 8.3 min) was used as internal standard. **b** Chromatogram (detection by UV detector at 210 nm) of the bioconversion medium of the DSM 17938 strain. Retentions times in minutes (RT) are indicated for each peak. Citric acid (RT = 7.9 min) was used as internal standard.

1 mkviivgcth agtitatqil qnhpetevti yerndnvsfl scgiavylsg dvgdppdamfy
61 sspeqlaamg atvhmqhntv didpkktvt vtdlvtgetk tdhydklvdt tgswpvipi
121 egvdgphvyl cknnyhakel fnvakdaqri vviggyigv elveytrqn kvdvtlidgsp
181 rmlhkyfdre ytdriqqefv dhgahafdq rvtgfenhkn gvtvktkgn yeadiailcv
241 gfrpntdllk gkvkmdnga iitneymqss dpdiyaagds tavhynptgk dayiplatna
301 irqgtivgt nlfngtmhdmg tqssglnly gttmvssgl lenakeagfd aaavtvedny
361 rpefmppttp vlmtlvwdkk trqilggqfm skhdvsqsan iislcidkht idylafvdm
421 lfqphfdrpf nyvnilgqaa vkkqaelek

Online Resource 2 Amino acid sequence of the NADH oxidase (EC number 1.6.99.3) coded by the gene NOX identified in the *L. reuteri* ATCC 55730 (mother strain of the DSM 17938 strain) genome.

NADH oxidase [*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608]

Sequence ID: [emb|CCC03797.1|](#) Length: 449 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 449 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
923 bits(2385)	0.0	Compositional matrix adjust.	442/449(98%)	447/449(99%)	0/449(0%)
Query 1	MKVIIIVGCTHAGTITATQILQNHPEVTEYERNDNVSFLSCGIAVYLSGDVGDPPDAMFY				60
Sbjct 1	MKVIIIVGCTHAGTITATQILQNHPEVTEYERNDNVSFLSCGIAVYLSGDVGDPPDAMFY				60
Query 61	SSPEQLAAMGATVHMQHNVTDIDPKTKVTVDLVTGETKTDHYDKLVDTTGSWPVIPPI				120
Sbjct 61	SSPEQLAAMGATVHMQHNVTDIDPKTKVTVDLVTGETKTDHYDKLVDTTGSWPVIPPI				120
Query 121	EGVDGPHVYLCKNYHAKELFNVAKDAQRIVVIGGGYIGVELVEAYTRQNIKVTLIDGSP				180
Sbjct 121	EGVDGPHVYLCKNYHAKELFNVAKDAQRIVVIGGGYIGVELVEAYTRQNIKVTLIDGSP				180
Query 181	RMLHKEYFDREYTERIQQEFVDHGAFAFDQRTVGFENHNGVTVKTDKGNYEADIAILCV				240
Sbjct 181	RMLHKEYFDREYTERIQQEFVDHGAFAFDQRTVGFENHNGVTVKTDKGNYEADIAILCV				240
Query 241	GFRPNTDLLKGVKLNHDNGAIITNEYMQSSDPDIYAAGDSTAVHYNPTGKDAYIPLATNA				300
Sbjct 241	GFRPNTDLLKGVKLNHDNGAIITNEYMQSSDPDIYAAGDSTAVHYNPTGKDAYIPLATNA				300
Query 301	IRQGTIVGTNLFNGTNRDMGTQSSSGLNLYGTTMVSSGLTLENAKEAGFDAAAVTVEDNY				360
Sbjct 301	IRQGTIVGTNLFNGTNRDMGTQSSSGLNLYGTTMVSSGLTLENAKEAGFDAAAVTVEDNY				360
Query 361	RPEFMPPTTPVLMTLVWDKKTRQILGGQFMSKHDVVSQSANIISLCIQDKHTIDYLAFLVDM				420
Sbjct 361	RPEFMPPTTPVLMTLVWDKKTRQILGGQFMSKHDVVSQSANIISLCIQDKHTIDYLAFLVDM				420
Query 421	LFQPHFDRPFNYVNILGQAAVKKQAELEK		449		
Sbjct 421	LFQPHFDRPFNYVNILGQAAVKKQAELEK		449		

Online Resource 3 Result of BLASTP between the NADH oxidases of the ATCC 55730 (mother strain of the DSM 17938 strain) and ATCC 53608 strains. These two peptides are highly similar (98 % of identities).

FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase [Lactobacillus reuteri DSM 20016]
 Sequence ID: [gb|ABQ82342.1](#) Length: 449 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 449 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
930 bits(2403)	0.0	Compositional matrix adjust.	446/449(99%)	448/449(99%)	0/449(0%)
Query 1		MKVIIIVGCTHAGTITATQILQNHPEVETIYERNDNVSFLSCGIAVYLSGDVGEINPDAMFY			60
Sbjct 1		MKVIIIVGCTHAGTITATQILQNHPEVETIYERNDNVSFLSCGIAVYLSGDVGEINPDAMFY			60
Query 61		SSPEQLAAMGATVHMQHNVTDIDPKTKTVTVTDLVTGETKTDHYDKLVDTTGSWPVIPP			120
Sbjct 61		SSPEQLAAMGATVHMQHNVTDIDPKTKTVTVTDLVTGETKTDHYDKLVDTTGSWPVIPP			120
Query 121		EGVDGPHVYLCKNYHHAKELFNVAKDAQRIVVIGGGYIGVELVEAYTRQNKDVTLLIDGSP			180
Sbjct 121		EGVDGPHVYLCKNYHHAKELFNVAKDAQRIVVIGGGYIGVELVEAYTRQNKDVTLLIDGSP			180
Query 181		RMLHKYFDREYTDRIQQEFVDHGAHFAFDQRVTGFENHKNNGVTVKTDKGNYEADIAILCV			240
Sbjct 181		RMLHKYFDREYTDRIQQEFVDHGAHFAFDQRVTGFENHKNNGVTVKTDKGNYEADIAILCV			240
Query 241		GFRPNTDLLKGGKVMHDNGAIIITNEYMQSSDPDIYAAGDSTAVHYNPTGKDAYIPLATNA			300
Sbjct 241		GFRPNTDLLKGGKVMHDNGAIIITNEYMQSSDPDIYAAGDSTAVHYNPTGKDAYIPLATNA			300
Query 301		IRQGTIVGTNLFGNTHIDMGTQSSSGLNLYGTTMVSSGLTLENAKEAGFDAAAVTVEDNY			360
Sbjct 301		IRQGTIVGTNLFGNTHIDMGTQSSSGLNLYGTTMVSSGLTLENAKEAGFDAAAVTVEDNY			360
Query 361		RPEFMPTTTPVLMTLVWDKKTRQILGGQFMSKHDVVSQSANIISLCIQDKHTIDYLAFVDM			420
Sbjct 361		RPEFMPTTTPVLMTLVWDKKTRQILGGQFMSKHDVVSQSANIISLCIQDKHTIDYLAFVDM			420
Query 421		LFQPHFDRPFNYVNIILGQAAVKKQAELEK	449		
Sbjct 421		LFQPHFDRPFNYVNIILGQAAVKKQAELEK	449		

Online Resource 4 Result of BLASTP between the NADH oxidase of the ATCC 55730 strain (mother strain of the DSM 17938 strain) and the DSM 20016 proteome. One peptide from the DSM 20016 strain, identified as a FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase is highly similar to the NADH oxidase of the ATCC 55730 strain (99 % of identities).

1.2.3 Optimisation de la bioconversion : mise en œuvre en bioréacteur et conduite en mode "fed-batch"

La mise en œuvre la bioconversion en réacteur et à pH régulé (pH = 6) n'a pas permis d'augmenter les performances de production du 3-HP (Burgé *et al.* 2015b). Cette étape nécessite donc d'être optimisée, par exemple en réalisant un apport contrôlé du substrat de bioconversion, afin d'éviter l'accumulation de 3-HPA. De plus, l'objectif final étant l'intégration de la bioconversion avec le procédé d'extraction liquide-liquide réactive, plus efficace lorsque le pH du milieu est acide (Kertes and King 1986, Tamada *et al.* 1990 a et c), une étude de l'impact du pH du milieu sur les performances de bioconversion s'avère nécessaire. En effet, si l'influence du pH sur la capacité à produire du 3-HPA a déjà été étudiée (Lüthi-Peng *et al.* 2002), confirmant ainsi un meilleur fonctionnement des enzymes de la voie métabolique à pH 6-7, son impact sur la production du 3-HP en mode « batch » et sur l'état physiologique des bactéries productrices n'a pas encore été testé. Les résultats de cette étude à pH régulé (entre 3 et 6) menée en bioréacteur sont présentés sur la Figure III.1.1.

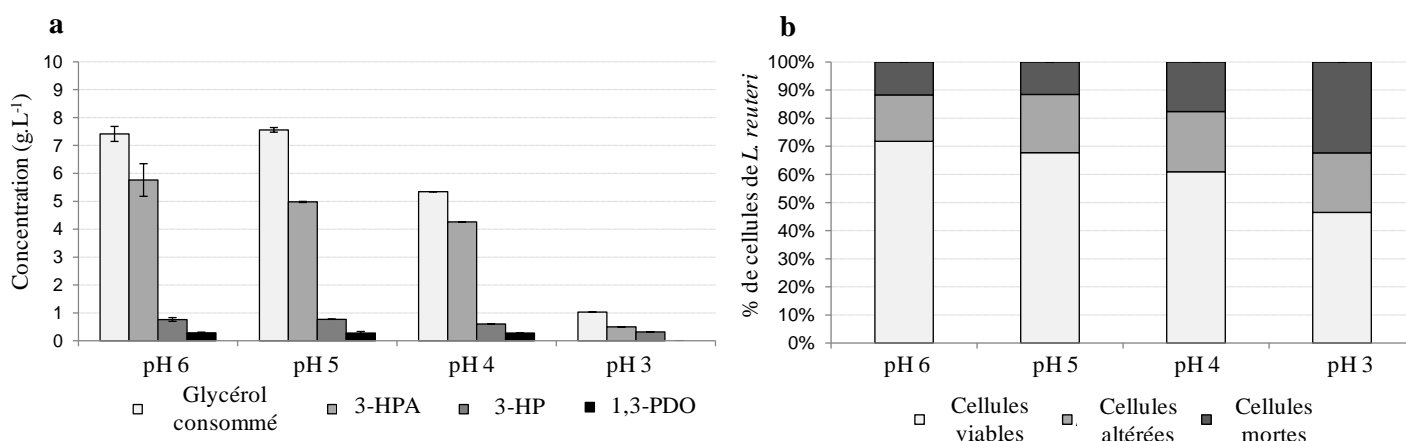


Figure III.1.1 : Impact du pH sur les performances de bioconversion du glycérol (200 mM soient 18,2 g.L⁻¹) par *L. reuteri* DSM 17938 (10¹⁰ UFC.mL⁻¹) en mode « batch » en bioréacteur (100 rpm, 37°C). **a :** Variation des concentrations de glycérol consommé et de métabolites produits en fonction du pH après 2 h de bioconversion. Seules les expériences à pH 5 et 6 ont été répétées. **b :** Evaluation de l'état physiologique de *L. reuteri* après 2 h de bioconversion à différents pH.

Plus le pH du milieu de bioconversion est régulé à une valeur faible, plus la consommation du glycérol (passage de 8,04 g.L⁻¹ à pH 6 à 1,28 g.L⁻¹ à pH 3, Fig. III.1.1a) et la production de 3-HPA (passage de 5,58 g.L⁻¹ à pH 6 à 0,64 g.L⁻¹ à pH 3, Fig. III.1.1a) diminuent. En revanche, l'impact sur la production de 1,3-PDO et 3-HP est minime (entre 0,7 and 0,9 g.L⁻¹ pour le 3-HP et entre 0,25 and 0,35 g.L⁻¹ pour le 1,3-PDO), sauf à pH 3,

condition pour laquelle seule une faible production de 3-HP est visible ($0,12 \text{ g.L}^{-1}$) et aucune production de 1,3-PDO n'est détectée. De plus, le ratio molaire 3-HP / 1,3-PDO est favorable, quelle que soit la valeur de régulation du pH.

On observe également une diminution du pourcentage de cellules viables lorsque la valeur de régulation du pH diminue, particulièrement à pH 3 (Fig. III.1.1 b). Étant donnée la baisse globale de la production des molécules potentiellement inhibitrices (3-HPA et 3-HP) avec celle du pH, l'inhibition observée peut être attribuée principalement à l'acidité du milieu, confirmant ainsi l'impact des faibles pH sur l'état physiologique de *L. reuteri* (Fig. 6 et 7 c, Burgé *et al.* 2015b), même si le 3-HPA produit dans ces conditions contribue également à l'impact néfaste sur les bactéries. L'étude menée récemment par Dishisha *et al.* (2014) confirme l'influence du pH du milieu de bioconversion sur les performances de production du 3-HP. Ainsi, le passage d'un pH régulé à 5 à un pH régulé à 7 conduit à une augmentation du rendement spécifique de production du 3-HP, ce qui est en accord avec la valeur des pH optimum rapportés pour les enzymes PduP (Sriramulu *et al.* 2008) et PduQ (6,2 ; Talarico *et al.* 1990). Cette étude souligne donc la nécessité de réguler le pH à une valeur proche du pH physiologique (entre 6 et 7, Kandler *et al.* 1980). Concernant l'intégration ultérieure au procédé de séparation, un compromis peut être trouvé en travaillant à pH 5, ce qui conduirait cependant à une diminution des performances de production.

L'étude de l'impact de chaque métabolite de la voie sur l'état physiologique de *L. reuteri* DSM 17938, dont les résultats sont présentés dans l'article ci-dessus, a mis en évidence des phénomènes d'inhibition causés par le 3-HPA et le 3-HP (dans une moindre mesure et à pH acide). Concernant le 3-HP, son extraction *in situ* devrait permettre de diminuer voire de supprimer l'inhibition induite, comme cela a déjà été montré pour d'autres acides organiques (acide propionique, Jin and Yang 1998 ; acide butyrique, Wu *et al.* 2003). Cette approche correspond à celle développée dans ce travail de thèse (cf. partie III.2). En plus de cette démarche d'ISPR, la réalisation de la bioconversion avec un apport contrôlé en glycérol, récemment décrite dans la littérature (Kumar *et al.* 2013a, Dishisha *et al.* 2014), constitue un mode de conduite approprié dans le cadre de la production de 3-HP par *L. reuteri*.

Ainsi, quelques essais en mode « fed-batch » ont été réalisés en bioréacteur. Pour cela, différents débits d'ajout du glycérol ont été testés. Suite à l'étude de l'impact du pH sur les performances de bioconversion, avec en vue le couplage ultérieur avec le procédé de

séparation, il a été choisi de réguler le pH à 5. Les résultats de la comparaison entre les modes « batch » et « fed-batch » sont présentés sur la Figure III.1.2.

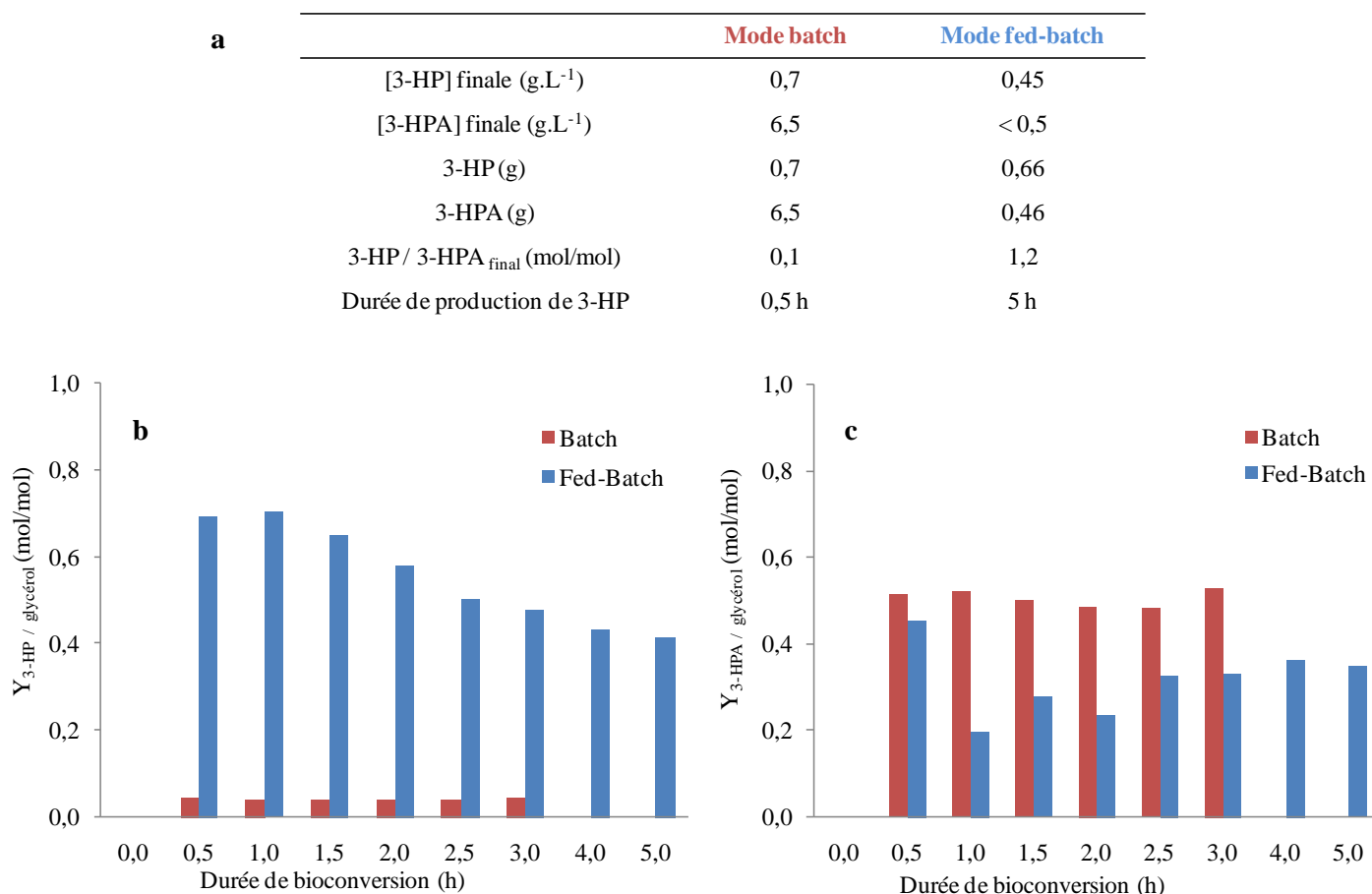


Figure III.1.2 : Comparaison des performances de bioconversion de *L. reuteri* DSM 17938 en modes « batch » (concentration initiale en glycérol égale à 22,8 g.L⁻¹) et « fed-batch » (apport de 0,5 g.h⁻¹ de glycérol) à une concentration cellulaire de 2.10^{10} UFC.mL⁻¹, pH 5, 37°C, 250 rpm. **a :** Synthèse des résultats de la comparaison. **b :** Évolution du rendement molaire 3-HP / glycérol au cours du temps. **c :** Évolution du ratio molaire 3-HPA / glycérol au cours du temps.

Si la production de 3-HP n'est pas améliorée (0,66 g ; Figure III.1.2a) en mode « fed-batch », le rendement de production par rapport au glycérol est multiplié par un facteur compris entre 4 et 7 (Figure III.1.2b) La diminution visible de ce rendement au cours du temps est probablement liée à l'inhibition provoquée par l'accumulation de 3-HPA et 3-HP. Concernant l'accumulation de 3-HPA, néfaste pour les bactéries, elle est minimisée (production inférieure à 0,5 g, diminution d'un facteur 13 par rapport au mode « batch ») du fait de l'apport contrôlé du substrat. La part de glycérol transformée en 3-HPA est donc inférieure en mode « fed-batch » par rapport au mode « batch » (Figure III.1.2c). La durée de la production de 3-HP est nettement augmentée, passant de 30 min à 5 h lorsque le glycérol

est apporté progressivement. Cette amélioration des performances de bioconversion est due, au moins en partie, à la diminution importante de l'accumulation de 3-HPA dans le milieu. La concentration en 3-HPA accumulé (6,2 mM, 0,46 g.L⁻¹) est cependant proche de la concentration inhibitrice de l'enzyme PduP (0,6 g.L⁻¹, Zeng *et al.* 2002), qui catalyse la transformation du 3-HPA en 3-HP-CoA, ce qui pourrait expliquer que la production de 3-HP n'est pas améliorée en mode « fed-batch ».

Après avoir montré les intérêts de l'apport du substrat en mode « fed-batch », différents débits d'alimentation en glycérol ont été testés (0,25, 0,5 et 0,7 g.h⁻¹) afin d'en évaluer l'impact sur les performances générales de bioconversion. Les résultats des suivis de l'accumulation du substrat dans le réacteur et de production des métabolites sont présentés sur la Figure III.1.3.

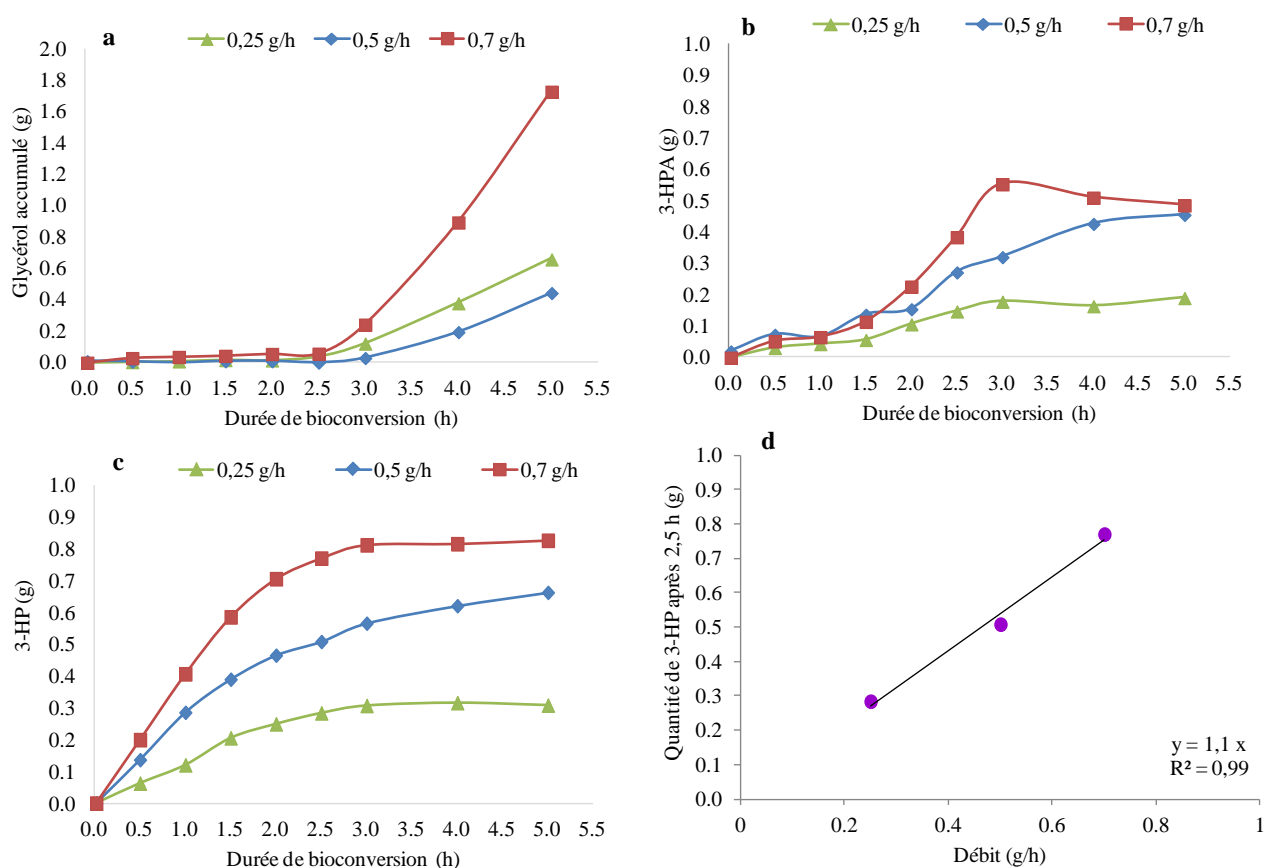


Figure III.1.3 : Influence du débit d'apport de glycérol lors d'une bioconversion en mode « fed-batch » par la souche DSM 17938 (2.10^{10} UFC.mL⁻¹, pH 5, 37°C, 250 rpm). Cinétiques d'accumulation : **a** : du glycérol (g), **b** : du 3-HPA produit (g) et **c** : du 3-HP produit (g). **d** : Évolution de la quantité de 3-HP produite après 2,5 h de bioconversion en fonction du débit d'apport du glycérol.

On constate tout d'abord que, quel que soit le débit en glycérol, la totalité du substrat apporté est consommée jusqu'à 2,5 h de bioconversion (Figure III.1.3 a). Ainsi, même le débit d'apport de 0,7 g_{glycérol}/h permet d'éviter l'accumulation du substrat au début de la bioconversion. A partir de 2,5 h, le glycérol commence à s'accumuler, de manière plus importante lorsque le débit d'apport augmente. Ceci indique que la transformation du glycérol par les bactéries cesse. En ce qui concerne les productions de 3-HP et de 3-HPA, on remarque que les quantités augmentent jusqu'à 3 h de bioconversion dans le cas des débits de 0,25 et 0,7 g_{glycérol}/h et jusqu'à 5 h pour le débit de 0,5 g_{glycérol}/h (Figures III.1.3 b et c). Ces premiers résultats doivent être confortés par la réalisation d'expériences supplémentaires dans les mêmes conditions opératoires. L'accumulation de 3-HPA demeure faible pour tous les débits testés (< 0,5 g pour 0,7 et 0,5 g_{glycérol}/h, et même < 0,2 g pour le débit de 0,25 g_{glycérol}/h ; Figure III.1.3 b) et inférieure à la production de 3-HP (0,87, 0,66 et 0,30 g, respectivement ; Figure III.1.3 c). Enfin, jusqu'à 3 h de bioconversion, les quantités de 3-HP atteintes sont proportionnelles au débit d'apport du glycérol (exemple après 2,5 h de bioconversion sur la Figure III.1.3 d).

La faible accumulation de 3-HPA (mais aussi de glycérol) dans le milieu et l'augmentation de la production de 3-HP soulignent une nouvelle fois l'intérêt de cette conduite en mode « fed-batch ». Les travaux menés par Dishiha *et al.* (2014) constituent l'une des rares études portant sur la production par voie biotechnologique du 3-HP par *L. reuteri*. Les performances de bioconversion obtenues en mode « fed-batch » sont meilleures (environ 10 g de 3-HP produit en 20 h à partir de 22 g de glycérol, pas d'accumulation de 3-HPA dans le milieu pendant 10 h). Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces différences de résultats. Tout d'abord, Dishiha *et al.* (2014) ont utilisé la souche DSM 20016, plus résistante au stress global généré pendant la bioconversion (Figure 6, Burgé *et al.* 2015b) et moins productrice en 3-HPA (Figure 3, Burgé *et al.* 2015b). De plus, lors de la phase de croissance bactérienne, le milieu utilisé par Dishiha et ses collaborateurs a été supplémenté en 1,2-PDO. Or cette molécule est connue (Toraya 2000, Yamanishi *et al.* 2012) pour son rôle dans l'activation de l'expression de gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme du glycérol et dans la synthèse de protéines structurales participant à la formation de micro-compartiments cellulaires, les métabolosomes, qui auraient un rôle protecteur vis-à-vis des métabolites inhibiteurs produits (Kerfeld *et al.* 2010).

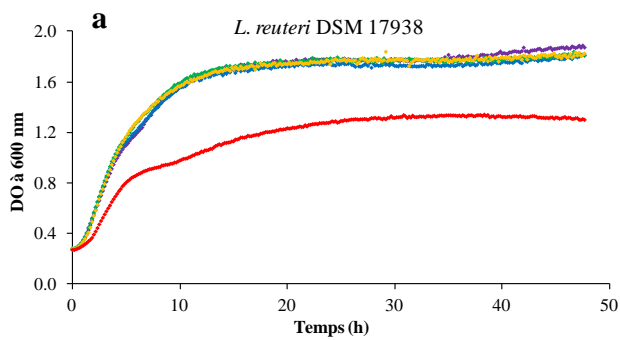
L'arrêt de la production (et donc de l'accumulation) de 3-HP et de 3-HPA entre 3 et 5 h après le début de la bioconversion peut être expliqué par plusieurs hypothèses. En effet, le 3-HPA provoque un dysfonctionnement des enzymes du métabolisme cellulaire (via des interactions avec les groupements thiols et amines des protéines, Schaefer *et al.* 2010), notamment celles de la voie de bioconversion du glycérol. D'autre part, cette molécule s'avère toxique pour les cellules et affecte leur survie (Cleusix *et al.* 2007). Cet arrêt brutal pourrait également être lié à un déficit de vitamine B12 (adénosyl-cobalamine), d'ions Mg^{2+} et d'ATP, l'ensemble étant nécessaire au fonctionnement des enzymes de réactivation permettant le maintien de l'activité de la glycérol/diol déshydratase (catalysant la déshydratation du glycérol en 3-HPA) (Toraya *et al.* 2000, Yamanishi *et al.* 2012).

La proportionnalité entre la quantité de 3-HP synthétisée et le débit de glycérol permet d'envisager une amélioration de la production de la molécule d'intérêt par l'augmentation du débit d'alimentation en substrat. Toutefois, il sera nécessaire de veiller à pallier la hausse concomitante de l'accumulation de 3-HPA.

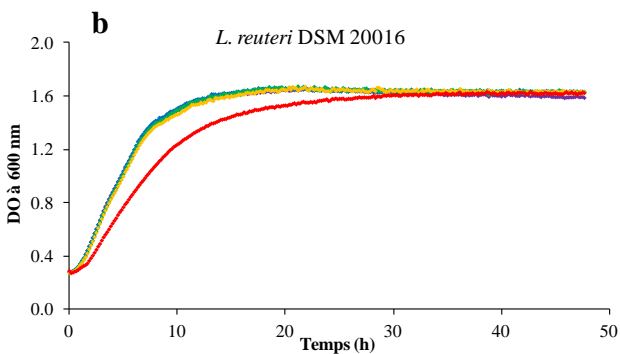
L'adoption d'un mode « fed-batch » pour l'apport du glycérol durant la bioconversion a donc permis de diminuer la quantité de 3-HPA excrétée dans le milieu, d'augmenter le rendement de conversion du glycérol en 3-HP et d'allonger la phase de production. Les travaux doivent cependant être répétés pour confirmer les observations et poursuivis pour améliorer les performances de production biotechnologique de la molécule d'intérêt par *L. reuteri*.

1.2.4 Etude de l'inhibition induite par le 3-HP sur *L. reuteri*

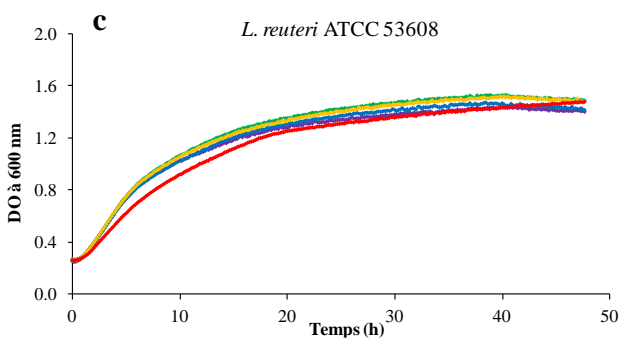
Afin d'approfondir la compréhension des mécanismes à l'origine de l'inhibition provoquée par le 3-HP sur les bactéries productrices, différents travaux ont été réalisés. Des tests de croissance de *L. reuteri* en milieu liquide en présence de 3-HP ont d'abord été effectués avec les trois souches étudiées. Différentes concentrations en 3-HP ont ainsi été testées, appartenant à la gamme de production attendue pour cette molécule. Les résultats sont présentés sur la Figure III.1.4.



	[3-HP] (g.L ⁻¹)				
	0	0.1	0.5	1	5
Taux de croissance max μ_{max} (h ⁻¹)	0.43	0.48	0.47	0.47	0.34
Début phase exponentielle (h)	0.83	0.83	0.83	1.00	1.67
Fin phase exponentielle (h)	2.33	2.33	2.50	2.67	3.17
Durée phase exponentielle (h)	1.50	1.50	1.67	1.67	1.50
DO max atteinte (UDO)	1.89	1.82	1.84	1.84	1.34



	[3-HP] (g.L ⁻¹)				
	0	0.1	0.5	1	5
Taux de croissance max μ_{max} (h ⁻¹)	0.38	0.37	0.36	0.36	0.30
Début phase exponentielle (h)	0.67	0.67	0.83	0.83	1.67
Fin phase exponentielle (h)	2.67	2.83	3.00	3.00	3.17
Durée phase exponentielle (h)	2.00	2.16	2.17	2.17	1.50
DO max atteinte (UDO)	1.65	1.66	1.67	1.67	1.63



	[3-HP] (g.L ⁻¹)				
	0	0.1	0.5	1	5
Taux de croissance max μ_{max} (h ⁻¹)	0.25	0.24	0.25	0.25	0.21
Début phase exponentielle (h)	0.50	0.50	0.67	0.50	1.33
Fin phase exponentielle (h)	4.00	4.17	3.83	4.00	3.83
Durée phase exponentielle (h)	3.50	3.67	3.16	3.50	2.50
DO max atteinte (UDO)	1.44	1.48	1.54	1.52	1.53

◆ 0 g.L⁻¹ ◆ 0,1 g.L⁻¹ ◆ 0,5 g.L⁻¹ ◆ 1 g.L⁻¹ ◆ 5 g.L⁻¹

Figure III.1.4 : Influence de l'ajout de 3-HP entre 0 et 5 g.L⁻¹ dans le milieu de culture MRS sur la cinétique de croissance bactérienne de trois souches de *L. reuteri* **a** : DSM 17938, **b** : DSM 20016, **c** : ATCC 53608. Ces résultats correspondent à une moyenne réalisée sur deux expérimentations indépendantes.

Pour les trois souches étudiées, un impact net sur la croissance est visible pour une concentration en 3-HP de 5 g.L⁻¹. En présence de 3-HP à 5 g.L⁻¹, les cinétiques de croissance sont affectées (Figure III.1.4), mais de manière différente pour chacune des souches. Cela permet de supposer que les niveaux de résistance au stress acide sont variables selon la souche testée. Ainsi, la croissance de la souche DSM 17938 est fortement impactée par la présence de 5 g.L⁻¹ de 3-HP (diminution d'environ 30 % de la DO finale et du taux maximal de croissance et phase exponentielle retardée par rapport au milieu sans 3-HP ; Figure III.1.4 a). L'impact est moindre sur les souches DSM 20016 et ATCC 53608 (même DO finale que celle du

témoin), bien que la cinétique de croissance soit affectée (taux maximal de croissance diminué de 20 % et phase exponentielle retardée et plus courte ; Figure III.1.4 b et c). Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans la Figure 6 c (Burgé *et al.* 2015b, impact de la bioconversion du glycérol en 3-HP sur la cultivabilité cellulaire, évalué par dénombrement sur boîtes de Pétri). L'ensemble de ces données montrent que le classement des souches en fonction de leur résistance potentielle au stress 3-HP est semblable en milieu liquide ou solide. Une étude récente (Kildegaard *et al.* 2014) souligne l'influence de l'ajout de 3-HP (entre 0 et 100 g.L⁻¹) dans le milieu de culture de *S. cerevisiae*. Le taux de croissance maximal diminue ainsi avec la concentration en 3-HP dans le milieu de culture. Si la croissance est affectée dès l'ajout de 3-HP dans le milieu, plus aucune croissance n'est visible à partir de 50 g.L⁻¹. Ces travaux ont également montré que, à concentration identique en 3-HP (25 et 50 g.L⁻¹), la croissance de *S. cerevisiae* était plus affectée lorsque le pH du milieu était diminué, ce qui permet de conclure à un effet de la molécule à forte concentration, indépendamment de l'acidité liée à sa présence. Cette différence d'impact en fonction de la forme de l'acide (dissociée ou non dissociée) est connue et bien documentée dans le cas de l'acide lactique. Par exemple, la croissance de *Lactobacillus helveticus* est inhibée pour des concentrations en acide lactique beaucoup plus faibles (10 g.L⁻¹ environ) en comparaison aux concentrations en lactate (60 g.L⁻¹ environ) (Schepers *et al.* 2002).

L'étude de l'impact de 2,5 g.L⁻¹ de 3-HP (à pH 3 et 5) sur l'état physiologique de *L. reuteri*, effectuée par cytométrie en flux, a montré que l'activité enzymatique générale des bactéries était affectée à pH 3 (pas d'impact significatif à pH 5 comparé au témoin sans 3-HP ; Figure 7c, Burgé *et al.* 2015b). Afin de mieux comprendre les effets du stress acide provoqué par le 3-HP sur *L. reuteri*, des mesures de pH intracellulaire (pHi) ont été réalisées par cytométrie en flux, avec pour objectif de vérifier la capacité des bactéries à réguler leur pHi en milieu acide. Pour cela, la souche DSM 17938 a été choisie comme modèle. Les résultats ne montrent cependant pas de baisse du pHi même lorsque le milieu extérieur est très acide (pH = 2,3, correspondant à l'ajout de 50 g.L⁻¹ de 3-HP). En effet, le pHi varie entre 6,5 et 7,5 quelle que soit la concentration en 3-HP testée (0 ; 2,5 ; 10 ; 50 g.L⁻¹, pour des variations de pH comprises entre 3,1 et 2,4). Des résultats similaires sont observés par mesure du pHi lors d'une production de 3-HP par bioconversion du glycérol (pH extracellulaire = 4,5 et pHi = 7,03). Ces résultats semblent indiquer que *L. reuteri* parvient à réguler son pHi et donc à éjecter les protons contre le gradient de pH (entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire), probablement par l'intermédiaire de pompes à protons ATP-dépendantes,

mécanisme déjà décrit dans les mécanismes généraux de résistance au stress acide chez les bactéries lactiques (van de Guchte *et al.* 2002, De Angelis and Gobbetti 2004). L'impact délétère du 3-HP, jusqu'à 50 g.L⁻¹, bien que lié au moins en partie à l'acidification du milieu extérieur, ne serait donc pas causé directement par un défaut de régulation du pH intracellulaire conduisant à une acidification du cytoplasme. Ces premiers résultats doivent cependant être répétés et éventuellement confirmés par d'autres méthodes, par exemple en RMN du proton *in vivo*.

Le stress acide, dû à la production de 3-HP durant la bioconversion, n'est cependant pas le seul à générer un effet inhibiteur sur les bactéries productrices. D'après la littérature, un stress oxydatif, principalement lié à la présence de 3-HPA (Schaefer *et al.* 2010, Vollenweider *et al.* 2010), est également suspecté d'impacter les bactéries pendant la bioconversion du glycérol. Ce stress oxydatif, se manifestant notamment par la production de ROS sous la forme d'H₂O₂, O₂⁻ ou OH[•], pourrait également être lié à l'activité de la NADH oxydase (NOX, van Niel *et al.* 2002) ce qui expliquerait, selon notre hypothèse, la production de 3-HP supérieure à celle du 1,3-PDO (ratio molaire 3-HP/1,3-PDO > 1). Si l'implication du 3-HPA dans la génération d'un stress oxydatif pour les bactéries (*E. coli* notamment) a déjà été démontrée (Vollenweider *et al.* 2010, Schaefer *et al.* 2010), la participation du 3-HP (via l'effet molécule ou pH) dans ce type de stress n'a été encore que peu étudiée en détails, et pas chez *L. reuteri*. Ainsi, une étude parue récemment (Kildegaard *et al.* 2014) met en évidence la capacité du 3-HP à provoquer un stress de type oxydatif chez *E. coli* et *S. cerevisiae*. En contact avec cette molécule (50 g.L⁻¹), une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*AHP1*, *YPR1*, *GLR1*, *GSH1*, *GRE3*) a été observée. La présence de protons intracellulaires, issus de la décomposition des acides organiques dans le cytoplasme, peut également provoquer la production de radicaux libres conduisant à un stress oxydatif important chez *S. cerevisiae* en conditions aérobies (Piper *et al.* 2001, Casal *et al.* 2008). Plus généralement, l'acidification du milieu qui résulte de la production d'un acide organique est responsable d'un stress acide qui entraîne une modification importante du métabolisme. Cette acidification exacerbe ainsi les effets du stress oxydatif, comme le suggère la surproduction de la SOD (super oxyde dismutase) chez *L. lactis* (Corrieu and Luquet 2008). Un lien entre stress acide et stress oxydatif a aussi été rapporté chez *S. aureus* (Clements *et al.* 1999).

Afin de vérifier la possible génération de ROS lors du contact du 3-HP avec *L. reuteri*, des expérimentations ont été réalisées sur la souche DSM 17938. Des suspensions cellulaires, récoltées en début de phase stationnaire de croissance, ont ainsi été mises en contact pendant 30 minutes avec des concentrations croissantes en 3-HP (de 0 à 50 g.L⁻¹, pour des variations de pH comprises entre 3,1 et 2,4). La génération de ROS a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant le marqueur dihydroéthidium (DHE), clivé en présence d'anions superoxydes O₂⁻. Les résultats sont présentés sur la Figure III.1.5.

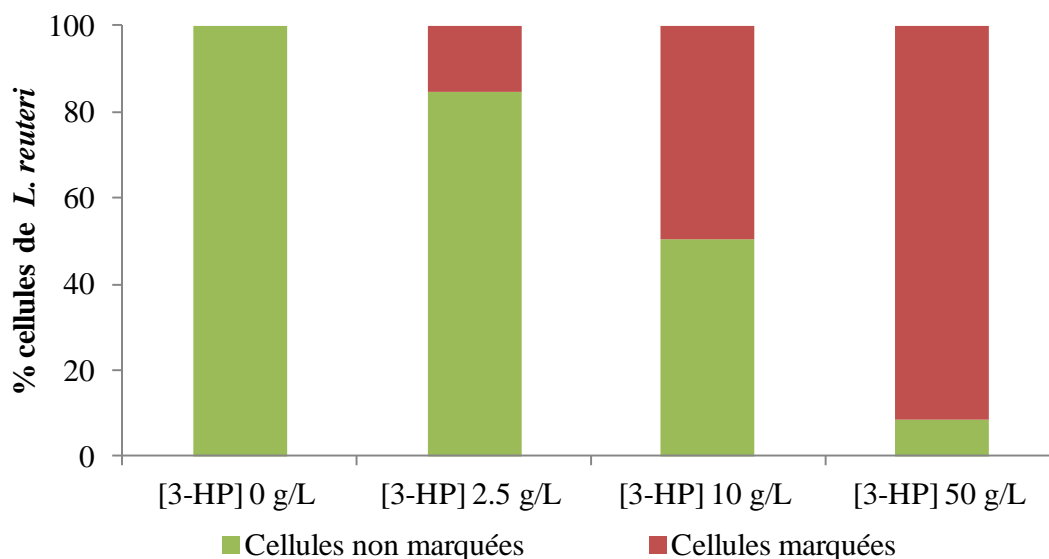


Figure III.1.5 : Evaluation de la production de ROS sous forme d'anion superoxyde (O₂⁻) par *L. reuteri* DSM 17938, après marquage au dihydroéthidium (DHE) et détection par cytométrie en flux, suite à la mise en contact des bactéries pendant 30 minutes avec différentes concentrations en 3-HP.

En absence de 3-HP, aucune cellule n'est marquée au DHE, et donc aucun ROS de type O₂⁻ n'est détecté dans le cytoplasme bactérien. En présence de 3-HP, le pourcentage de cellules marquées augmente avec la concentration en acide. A forte concentration (50 g.L⁻¹), la quasi-totalité (91,3 %) des bactéries a généré des ROS sous forme d'anions superoxydes, permettant de supposer l'implication du 3-HP dans le développement d'un stress de type oxydatif. La détection des ROS H₂O₂ et OH[•] par cytométrie en flux, en utilisant d'autres types de marqueurs adaptés à chacun d'eux, est envisagée afin de conforter cette hypothèse d'un lien entre stress acide et stress oxydatif. De même, afin de découpler les effets pH et molécule dans le cas du stress 3-HP, des répétitions de ces expériences à pH régulé seraient intéressantes. L'étude de la mise en place par *L. reuteri* des mécanismes de défense et de réponse à un stress 3-HP par des approches transcriptomiques, jamais réalisée à ce jour, est également envisagée pour compléter ce travail.

1.2.5 Conclusion et perspectives de l'étude

Cette partie du travail a d'abord permis d'avancer dans la compréhension de l'orientation du flux de carbone au sein de la voie métabolique de la bioconversion du glycérol en 3-HP. Les ratios molaires entre le 3-HP et le 1,3-PDO produits, indiquent systématiquement une production de 3-HP plus importante que celle du co-produit, et ce, quelles que soient les conditions (bouteille ou bioréacteur, mode « batch » ou « fed-batch »). Parmi les trois souches de *L. reuteri* évaluées, la souche DSM 17938 apparaît comme la plus intéressante pour la poursuite de l'étude et a donc été utilisée pour la mise en œuvre en bioréacteur. Néanmoins, les résultats obtenus en termes de concentration maximale en 3-HP et de rendement par rapport au glycérol sont moins élevés que ceux obtenus en bouteilles. L'apport du glycérol en mode « fed-batch » permet de minimiser l'accumulation de 3-HPA dans le milieu extracellulaire tout en augmentant de manière significative le rendement de production de 3-HP. Si des répétitions et des travaux complémentaires (augmentation du débit en glycérol notamment) sont nécessaires, ces premiers résultats montrent bien l'intérêt de cette approche dans le cas de la production biotechnologique du 3-HP. D'autre part, afin de diminuer la toxicité induite par le 3-HPA, il pourrait être envisagé de bloquer la fonction aldéhyde du 3-HPA excrété malgré tout en mode « fed-batch ». Cela peut être réalisé par complexation avec du bisulfite de sodium (Sardari *et al.* 2013, Stevens *et al.* 2013) ou ajout de sulfite d'hydrogène (Rütti *et al.* 2011), ainsi que par réaction avec des groupements carbohydrazides (Krauter *et al.* 2012) et semicarbazides (Vancauwenberge *et al.* 1990, Ulmer and Zeng 2007, Sardari *et al.* 2014). Comme évoqué précédemment, il sera également intéressant d'étudier l'impact des conditions de croissance des bactéries sur leurs performances ultérieures de bioconversion.

L'étude de l'impact de la bioconversion et des différents métabolites de la voie sur l'état physiologique des bactéries productrices a permis de confirmer l'effet inhibiteur induit par le 3-HPA et de mettre en évidence un phénomène d'inhibition dû au 3-HP et plus précisément à l'acidité causée par son excrétion dans le milieu. Ce stress acide pourrait être lié à l'induction d'un stress de type oxydatif, se traduisant par la génération de ROS, des espèces très réactives dérivées de l'oxygène, qui pourrait expliquer une partie des résultats observés. Des répétitions et études complémentaires par cytométrie en flux et analyse transcriptomique sont envisagées pour valider cette hypothèse et améliorer notre compréhension des mécanismes à la base des effets inhibiteurs observés dans le cas du 3-HP mais aussi du 3-HPA.

Si l'inhibition due au 3-HPA peut encore être réduite par l'optimisation de la conduite en mode « fed-batch » et par la maîtrise du procédé de production en réacteur, une stratégie consistant à extraire *in situ* le 3-HP du milieu de bioconversion permettrait de diminuer l'impact du stress acide généré et d'améliorer de ce fait les performances de bioconversion.

2 – Extraction liquide-liquide réactive du 3-HP

2.1 Impact de la composition de la phase organique sur l'extraction réactive du 3-HP

2.1.1 Contexte et objectifs de l'étude

Alors que l'essentiel des travaux s'intéressent à l'optimisation de la production du 3-HP par des approches de type ingénierie métabolique, une autre stratégie appelée ISPR ou bioconversion extractive consisterait à extraire de façon sélective le 3-HP de son milieu de façon à limiter sa toxicité et à récupérer la molécule d'intérêt tout en améliorant les performances de bioconversion. Pas encore mise au point dans le cas de la production du 3-HP par voie microbienne, cette approche s'est révélée efficace dans le cas d'autres acides organiques (acides lactique, propionique et butyrique notamment). Décrite dans quelques travaux de la littérature, notamment concernant son isomère de position le 2-HP (acide lactique ou 2-hydroxypropionique), l'extraction réactive liquide-liquide constitue une technique d'extraction d'intérêt. Basée sur la formation d'un complexe entre l'acide et une molécule extractante, elle permettrait de récupérer de façon sélective le 3-HP à partir du milieu de bioconversion.

L'étude de l'état de l'art a permis le choix d'une amine tertiaire (tri-*n*-octyl amine, TOA) et d'un ammonium quaternaire (Aliquat 336) comme molécules extractantes et du *n*-décanol comme diluant. L'extraction réactive du 3-HP a ensuite été étudiée pour la première fois et les résultats comparés à celle du 2-HP, étant donnée l'analogie structurale entre ces deux acides. L'influence de différents paramètres tels que la concentration en acide, la composition de la phase organique extractante et le pH a ainsi été étudiée et des tests sur milieu réel de bioconversion ont été réalisés afin d'évaluer l'impact de la composition de celui-ci sur les performances générales d'extraction.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication au *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (2015) et ont permis de déterminer une composition de la phase organique permettant une extraction réactive efficace et sélective de la molécule d'intérêt, y compris en milieu réel de bioconversion.

2.1.2 Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid

Publication parue au *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Moussa *et al.* 2015)

Résumé :

La bioconversion constitue une voie prometteuse pour la production de molécules plateformes et synthons biosourcés comme le 3-HP. L'extraction réactive peut notamment être utilisée pour séparer le 3-HP de son milieu de production et également être intégrée au procédé de bioconversion. Cependant, il n'y a à l'heure actuelle aucune étude publiée sur l'extraction réactive de cette molécule. Ce travail a donc pour but d'étudier l'extraction du 3-HP avec la tri-*n*-octylamine (TOA) et l'Aliquat 336 comme extractants solvatés dans du *n*-décanol. La comparaison est effectuée avec les nombreux travaux réalisés sur l'extraction réactive de son isomère de position le 2-HP (acide lactique). Enfin, l'extraction du 3-HP en milieux modèle et réel de bioconversion est étudiée.

L'utilisation combinée des deux molécules extractantes (TOA et Aliquat 336) a montré des performances intéressantes dans une large gamme de conditions expérimentales, soulignant l'existence d'un effet synergique entre ces deux molécules. Un des mécanismes d'extraction possibles considère ainsi la formation d'un complexe ternaire entre TOA, Aliquat 336 et l'acide carboxylique. Ce mécanisme est vraisemblablement le même dans le cas du 2-HP, dont l'extraction présente un comportement similaire mais qui varie en ordre de grandeur des performances. Quand le 3-HP est extrait à partir d'un milieu réel de bioconversion, certains composés d'origine cellulaire sont suspectés de s'adsorber à l'interface entre phases aqueuse et organique. Cet effet, ainsi que la compétition possible entre le 3-HP et d'autres composés pouvant réagir avec les extractants, conduisent à une limitation du rendement et de la sélectivité des extractions.

Les conditions expérimentales pour une extraction efficace du 3-HP sont ainsi étudiées et détaillées pour la première fois. Des travaux supplémentaires doivent être entrepris pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'extraction sur milieu réel, notamment au sein d'un système intégré de bioconversion extractive.

Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid

Marwen Moussa,^{a,b*} Grégoire Burgé,^{a,b,c} Florian Chemarin,^{a,b,c} Rana Bounader,^{a,b} Claire Saulou-Bérion,^{a,b} Florent Allais,^{a,b,c} Henry-Eric Spinnler^{a,b} and Violaine Athès^{a,b}

Abstract

BACKGROUND: Bioconversion is a promising route to produce bio-based building blocks such as 3-hydroxypropionic acid (3-HP). Reactive extraction can be used for 3-HP recovery, and ultimately integrated to the bioconversion process. To the best of our knowledge, there is no published experimental data about the reactive extraction of 3-HP. This work aimed to study the extraction of 3-HP using tri-*n*-octylamine and Aliquat 336 as extractants in *n*-decanol. Comparison was also made with its positional isomer, lactic acid. Finally, the extraction of 3-HP from model and real bioconversion broths was examined.

RESULTS: The use of mixed extractants showed high performances over a wide range of experimental conditions, highlighting a synergistic effect. A possible extraction mechanism considers the formation of a ternary complex between TOA, Aliquat 336 and the carboxylic acid. When 3-HP was extracted from a real bioconversion broth, some cell-originating compounds were suspected to adsorb to the aqueous–organic interface. This effect, added to the possible competition between 3-HP and compounds that can react with the extractants, led to limitations in the yield ($Y\%$) and selectivity (α_{3HP}) of the extraction. For example, $Y\%$ and α_{3HP} were respectively 89% and 35.9 for the model bioconversion broth and decreased to 62% and 15.7 for the real broth at $pH = 3.2$.

CONCLUSION: Effective experimental conditions for the reactive extraction of 3-HP were pointed out for the first time. Further work will be undertaken with a view to better elucidating the mechanisms involved in real conditions of an integrated extractive bioconversion system.

© 2015 Society of Chemical Industry

Keywords: 3-hydroxypropionic acid; reactive extraction; tri-*n*-octylamine; Aliquat 336; *n*-decanol; bioconversion

INTRODUCTION

The production of chemicals from renewable biomass resources is drawing increasing attention within the development of the bio-economy. In this respect, interest in the sustainable production at industrial scale of bio-based building blocks, such as the bifunctional carboxylic acid 3-hydroxypropionic acid (3-HP, CAS number 503-66-2), is growing.^{1,2} 3-HP has a promising potential as a platform molecule for (co)-polymerization and the production of commercially valuable chemicals such as acrylic acid, 1,3-propanediol, malonic acid and acrylamide.³ Recent forecasts suggested that the biobased polymer sector is set to grow by 29% up to 2017, with further strong growth beyond this.⁴ Although it is currently of limited usage as acrylate or polyester precursor owing to its exclusive synthesis via chemical pathways, its market is expected to grow significantly in the coming years;^{5,6} in fact, the global demand for acrylic acid which was about 5.5 million tons per year in 2013 is expected to reach 8 million tons per year in 2020.⁷ It is therefore reasonable to assume that market opportunities for new processes that will nurture the development of 3-HP production will arise.

Like for many organic acids, it is widely believed that white biotechnology will provide a more sustainable alternative to the chemical synthesis of 3-HP and the means to use renewable biomass-derived feedstock such as glycerol and glucose, instead of petrochemical feedstock.^{1,7,8} Some constraints need to be overcome for the development and implementation of robust

* Correspondence to: Marwen Moussa, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France. E-mail: marwen.moussa@grignon.inra.fr

a AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

b INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

c Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI) - AgroParisTech, 247 rue Paul Vaillant Couturier, F-51100 Reims, France

biotechnological processes at full industrial scale. Product and by-product inhibition of the microorganisms is encountered in the case of 3-HP bioproduction. Indeed, such undesirable effects lead to low productivity and dilute product streams,⁹ which, in turn, leads to energy and cost intensive downstream processes to separate and purify the manufactured product. A potential strategy to improve productivity is the implementation of 'in situ product removal/recovery' (ISPR), or extractive bioconversion, an integrated process by which the removal of inhibitory products is achieved through the coordination of upstream reaction and downstream technologies¹⁰. ISPR has been successfully applied for the production of some solvents, organic acids, aromas and fine chemicals.^{9,10}

Currently, there are no ISPR techniques developed in the literature for the extraction of 3-HP. However, it is thought that processes which proved to be effective for the extraction of short chains carboxylic acids^{11,12} may apply to 3-HP. Several techniques have been investigated for the recovery of 2-hydroxypropionic acid (2-HP), also known as lactic acid, a positional isomer of 3-HP, including solvent extraction, precipitation, electrodialysis, adsorption by ion exchange resins, aqueous two phase system, etc.^{13,14} Some of these techniques have proved to be effective under extractive fermentation conditions.^{15–17} A promising technique that drew a lot of attention is reactive extraction. This technique showed interesting performances over other methods available, especially in regards to its ability to remove acids from dilute solutions.¹⁸ It might similarly be viewed as an effective technique for the extraction of 3-HP. In this technique, an extractant species in an organic phase reacts with the targeted acid in the aqueous phase to form a complex that is soluble in the organic phase.^{19,20} The choice of reaction conditions and process design should be closely regarded to be effectively implemented in an ISPR setting: these should have no adverse effect on the microorganisms used for bioconversion, have minimum tendency to form emulsions, facilitate the regeneration of the solvents and extractants, etc.^{15–17}

Reactive extraction is a complex phenomenon that is influenced by various factors, such as the nature and concentration of both the acid and the extractant, the type of the diluent, the initial pH of the aqueous solution, etc. It has been largely investigated for the extraction of 2-HP. Several studies reported the use of tertiary amines with long aliphatic chains and anion-exchanging quaternary ammonium salts as extractants.^{20,21} Carbon-bonded and phosphorous-bonded oxygen donors are also used.^{17,20} These extractants, used either alone or mixed, were solvated in different diluents such as long chains alcohols and hydrocarbons.^{15–17,22–24} Some papers highlighted the effect of key process parameters such as stirring on the efficiency of reactive extraction in the case of lactic²⁵ and succinic acids.²⁶

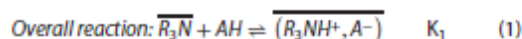
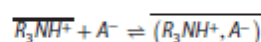
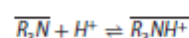
To the best of our knowledge, there is no published experimental data about the reactive extraction of 3-HP. In the present work, we report the reactive extraction of 3-HP using the tertiary amine tri-*n*-octylamine and the quaternary ammonium salt Aliquat 336 as extractants in *n*-decanol. Comparison is made with its positional isomer 2-HP that shares quite similar physicochemical properties. The roles of the following operating conditions on the extraction efficiency are also addressed: amines concentrations, pH and acid concentration in the aqueous phase, under static and dynamic (stirred) conditions in separatory funnels. Finally, the extraction of 3-HP from model and real bioconversion broths, obtained through a case study bioconversion of glycerol by *Lactobacillus reuteri* to 3-HP and 1,3-propanediol (1,3-PDO) via

the 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) metabolic intermediate, is examined.

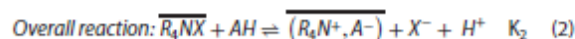
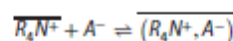
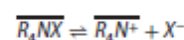
EXPERIMENTAL

Theory

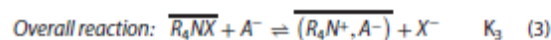
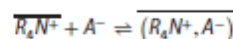
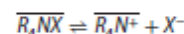
The most recurring reaction mechanism in the case of tertiary amines is referred to as a two-step mechanism.^{20,27} First, an acid-base reaction occurs between the acid and the amine; the amine uptakes the acid's proton to form its positively charged ammonium form. The ammonium then forms an ion pair with the negatively charged conjugate base of the acid. The reactions can be represented as follows, with species standing in the organic phase denoted by an overbar:



Quaternary amines react with the dissociated form of the acid through anion exchange depending on the pH range:
pH < pKa



pH > pKa



For Equations (1), (2) and (3), K_1 , K_2 and K_3 are defined as the thermodynamic equilibrium constants referring to the ratio between the activities of products and reactants of each reaction at equilibrium.

Aqueous phases

Acidic aqueous solutions were prepared from commercial solutions of L-(+)-Lactic acid (Sigma-Aldrich, 30% solution in water) or 3-hydroxypropionic acid (TCl-Europe, 30% solution in water). The concentration levels used in the present work were between 0.5 and 5 g L⁻¹. When required, the natural pH of the aqueous solutions were adjusted with 12N HCl or 1N NaOH solutions. The pH values were measured using a Jenco vision 6071 pH meter.

For some experiments, the binary aqueous solution was replaced by a bioconversion medium obtained by centrifugation of 250 mL of *L. reuteri* DSM 17938 cell suspension initially fed with 200 mmol L⁻¹ of glycerol and incubated for 3 h at 37°C.²⁸ A model bioconversion medium was also used. It was prepared based on the mean composition of the real bioconversion medium which was made of 3-HP (1 g L⁻¹), glycerol (5 g L⁻¹), 1,3-PDO (1 g L⁻¹) and 3-HPA (9 g L⁻¹).

Organic phases

Tertiary amine tri-*n*-octylamine (TOA, Sigma-Aldrich) and/or quaternary ammonium salt tri(C₈C₁₀)-methylammonium chloride (Aliquat 336, Sigma-Aldrich) were used as extractants, in *n*-decanol (Sigma-Aldrich) as diluent. Extractant concentrations varied between 0% (pure *n*-decanol) and 60% vol/vol. Ratios of mixed extractants (TOA/Aliquat 336) were also prepared as follows, respectively: 18/2, 15/5, 10/10 % vol/vol in *n*-decanol.

Equilibrium experiments in separatory funnels

The experiments were carried out using 60 mL separatory funnels with equal volumes of aqueous and organic phase (25 mL). For dynamic mode (stirred conditions), the aqueous and organic phases were mixed by vigorously shaking the separatory funnels for 3 min, which preliminary tests demonstrated to be a sufficient time. The mixture was placed in a laboratory oven at 25°C for 7 days to reach equilibrium and separate properly the two phases. Some experiments were conducted in static mode, by gently pouring the organic phase on top of the aqueous phase and leaving them to separate at 25°C.

For each experiment, 2 to 7 separate trials were carried out for each set of operating conditions. The standard deviations were then calculated. The statistical significance of differences between data was assessed using Student's *t* test.

Analytical methods

Acids, glycerol, 3-HPA and 1,3-PDO concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with an autosampler (Waters 717 plus), a pump (Waters, 600 controller) and an H⁺ exchange column Aminex HPX-87H (300×7.8 mm, Biorad, USA) with an H⁺ Micro-Guard column (30 mm×4.6 mm; Biorad). Each sample was filtered through a 0.22 μm pore-size filter before injection. 20 μL of each sample were then injected in the column thermostated at 50°C. The eluent was a 0.01N H₂SO₄ solution, run at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹. Citric acid (10 gL⁻¹ in deionized water) was used as an internal standard (50% vol/vol). Quantification was performed by an ultra-violet detector set at 210 nm for the acids and a refractive index detector put in series for glycerol, 3-HPA and 1,3-PDO. Results were recorded and treated with the Millennium software (Waters Associates, France).

The acid concentration in the organic phase at equilibrium $[AH, A^-]_{eq}$ was obtained using mass balance by subtracting the total analytical concentration of the aqueous solution at equilibrium $[AH, A^-]_{eq}$ from the total analytical concentration of the initial aqueous solution $[AH, A^-]_{ini}$.

The separation performances were evaluated in terms of:

- the apparent distribution coefficient (K_D):

$$K_D = \frac{[AH]_{eq} + [A^-]_{eq}}{[AH]_{ini} + [A^-]_{ini}} \quad (4)$$

- the yield of extraction (Y%):

$$Y\% = 100 \times \frac{([AH]_{ini} + [A^-]_{ini}) - ([AH]_{eq} + [A^-]_{eq})}{[AH]_{ini} + [A^-]_{ini}} \quad (5)$$

- the separation factor for 3-HP over a compound *i* ($\beta_{3HP/i}$):

$$\beta_{3HP/i} = \frac{K_D^{3HP}}{K_D^i} \quad (6)$$

where K_D^{3HP} and K_D^i are the distribution coefficients for 3-HP and the compound *i*, respectively,

- the selectivity factor for 3-HP (α_{3HP}):

$$\alpha_{3HP} = 100 \times \frac{n_{extracted}^{3HP}}{n_{extracted}^{3HP} + n_{extracted}^{3HPA} + n_{extracted}^{glycerol} + n_{extracted}^{1,3PDO}} \quad (7)$$

where the number of moles of each extracted compound is $n_{extracted}^i = n_{ini}^i - n_{eq}^i$, with n_{ini}^i and n_{eq}^i the number of moles of *i* in the aqueous solution, respectively before extraction and at equilibrium.

Viscosity measurements

The viscosity of organic phases at 25°C was measured using a rotational viscometer (Contraves-Rhéomat 115). Complete rheograms were drawn and a Newtonian behavior was observed for all liquids studied.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of TOA and Aliquat 336 concentration under dynamic and static extraction modes

Reactive extraction of 3-HP and 2-HP from aqueous solutions without pH adjustment (pH = 3.2 and 2.9, respectively) were performed using various proportions of TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol in the dynamic mode. Results are reported in Fig. 1. As can be seen in this figure, physical extraction by *n*-decanol alone (0% extractant) shows distribution coefficient (K_D) close to zero (~0.1) for both 2-HP and 3-HP. Therefore, these molecules have low affinity for the solvent, which is in accordance with the hydrophilic character of 2-HP and 3-HP regarding their log K_{OW} (Table 1). When extractants are used, extraction efficiency is improved. A notable feature is that 2-HP was better extracted than 3-HP for all TOA concentrations used. Tamada and King²⁹ reported a close relationship between the aqueous phase *pKa* of several acids and their K_D when extracted with the tertiary amine Aliquat 336. Accordingly, the higher K_D of 2-HP can be related to its stronger acidity in comparison with 3-HP (Table 1). The acid hydrophobicity is another property that can be examined. Indeed, 3-HP (log K_{OW} = -0.89) has a relatively lower affinity with the organic phase than 2-HP (log K_{OW} = -0.65). In their study on the reactive extraction of 12 organic acids including 2-HP, Matsumoto *et al.*^{30,31} reported a possible correlation of the extraction equilibrium constants with the hydrophobicity of the acids. In our study, in spite of the slight difference in terms of hydrophobicity between 3-HP and 2-HP, their physical extraction remained the same (~0.1). This result indicates that the hydrophobicity did not impact differently the extraction of the two acids.

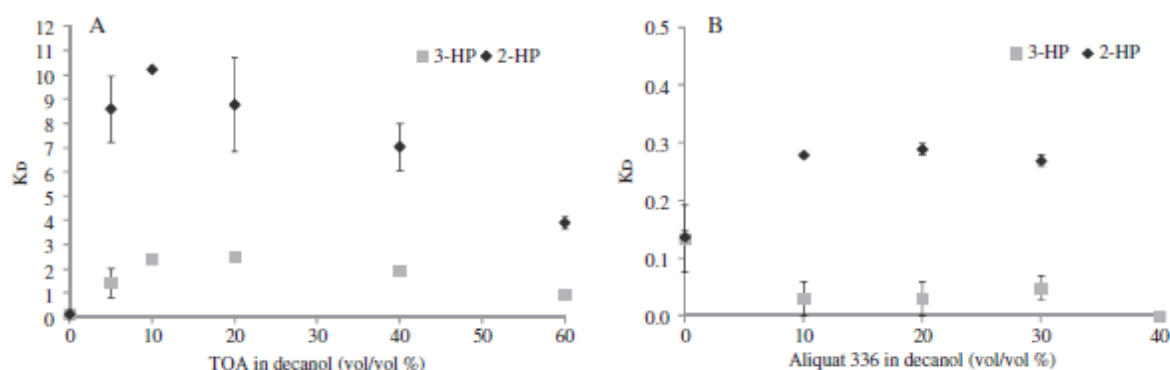


Figure 1. Effect of TOA (A) and Aliquat 336 (B) concentration on distribution coefficient in dynamic mode extraction of 3-HP (1 g L^{-1} , initial pH = 3.2) and 2-HP (1 g L^{-1} , initial pH = 2.9) at 25°C .

Table 1. Properties at 25°C of 3-hydroxypropionic acid and lactic acid (2-hydroxypropionic acid): Henry constant (absolute volatility at infinite dilution in water) – hydrophobicity constant ($\log K_{OW} = \log$ of the octanol/water partition coefficient)		
	3-hydroxypropionic acid (3-HP)	2-hydroxypropionic acid (2-HP)
	<chem>OC(CC(=O)O)O</chem>	<chem>OC(C(=O)O)O</chem>
CAS number	503-66-2	50-21-5
MW (g/mol)	90.08	90.08
pK ^a	4.51*	3.86**
Henry constant*** (atm m ³ /mol)	2.66×10^{-11}	1.13×10^{-7}
$\log K_{OW}$ ***	-0.89	-0.65

*Weast RC and Selby SM, *Handbook of Chemistry and Physics*. The Chemical Rubber Company, Ohio (1967).
 **Kertes AS and King CJ, *Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. Biotechnology and Bioengineering* 28: 269–282 (1986)
 ***Estimated values using the EPI Suite™ estimation program developed by the Syracuse Research corporation (SRC) and the U.S. Environmental Protection Agency (copyright 2000).

Table 2. Dynamic viscosity (mPa s) of pure <i>n</i> -decanol, TOA, Aliquat 336 and various volume mixtures of them	
Organic phase sample	Viscosity (mPa s)
<i>n</i> -decanol	11.6 ± 0.1
TOA	7.9 ± 0.1
Aliquat 336	1176.5 ± 3.1
TOA 10% + <i>n</i> -decanol 90%	11.9 ± 0.2
TOA 20% + <i>n</i> -decanol 80%	11.9 ± 0.1
TOA 30% + <i>n</i> -decanol 70%	11.0 ± 0.1
TOA 40% + <i>n</i> -decanol 60%	11.4 ± 0.1
Aliquat 336 10% + <i>n</i> -decanol 90%	14.6 ± 0.1
Aliquat 336 20% + <i>n</i> -decanol 80%	23.2 ± 0.2
Aliquat 336 30% + <i>n</i> -decanol 70%	40.2 ± 0.1
Aliquat 336 40% + <i>n</i> -decanol 60%	72.2 ± 0.2
TOA 10% + Aliquat 336 10% + <i>n</i> -decanol 80%	15.0 ± 0.1
TOA 15% + Aliquat 336 5% + <i>n</i> -decanol 80%	12.1 ± 0.1
TOA 18% + Aliquat 336 2% + <i>n</i> -decanol 80%	11.5 ± 0.1

A maximum value of K_D was reached at about 10–20% of TOA (Fig. 1(A)). Interestingly, at higher concentrations of TOA, the K_D values decreased for both 3-HP and 2-HP acids, giving a bell shaped profile. A similar pattern was reported in other studies where bell shaped curves passing through a maximum have been observed for the K_D of acids using tertiary amines as a function of amine concentration.^{22,32,33} In their study, Kyuchoukov and Yankov³³ have shown that the extraction of 2-HP was maximal at 25% vol/vol TOA in dodecane (20%) and oleyl alcohol (55%), and at 30% TOA in oleyl alcohol. From the curves they obtained for TOA and other long chain tertiary aliphatic amines, it can be seen that the highest values of K_D were obtained for amine concentrations between 25 and 40%.

The extraction efficiency with Aliquat 336 was by far lower than TOA, with a 2-HP extraction better than 3-HP. There are no clear bell-shaped curves of K_D for both acids as a function of the quaternary amine concentration (Fig. 1(B)).

With the increase of amine concentration in the range 0–10%, an increasing amount of acid molecules are bounded with amine, which causes the improvement of K_D . The amine-acid complexes are solvated by *n*-decanol, a phenomenon that is favored by the specific action of this diluent. Marinova *et al.*³⁴ reported that the increase in *n*-decanol concentration used as a modifier (active diluent) in *n*-dodecane, favors the extraction with TOA at low pH values of the aqueous phase but does not affect the extraction with Aliquat 336. Figure 1 shows that while increasing the concentration of amine, the concentration of *n*-decanol decreased which may lead to a limiting factor of amount of active diluent required to stabilize the TOA–acid complex. Accordingly, the maximum value of K_D corresponds to equilibrium between amine and active diluent concentrations favoring both the complex formation and its solvation.

Most often, amines are more viscous than the diluents. Thus, one could reasonably expect that the increase of amine concentration may induce mass transfer limitations that hinder the extraction mechanism and delay reaching the thermodynamic equilibrium. Such a phenomenon was reported for succinic acid extracted with TOA from viscous aqueous solutions.²⁶ In the present paper, viscosity measurements were performed for various mixtures of amines and *n*-decanol (Table 2). Results show a huge increase of viscosity for Aliquat 336 contents between 10 and 40%. For TOA,

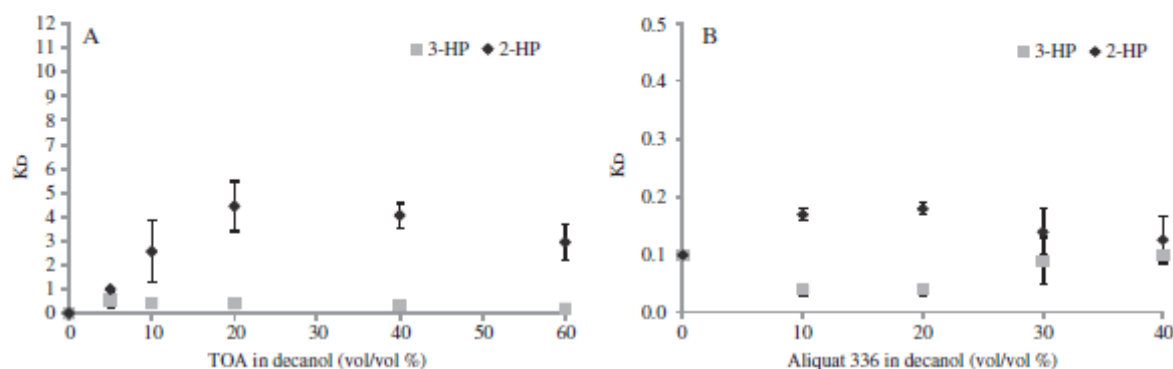


Figure 2. Effect of TOA (A) and Aliquat 336 (B) concentration on distribution coefficient in static mode extraction of 3-HP (1 g L^{-1} , initial pH = 3.2) and 2-HP (1 g L^{-1} , initial pH = 2.9) at 25°C .

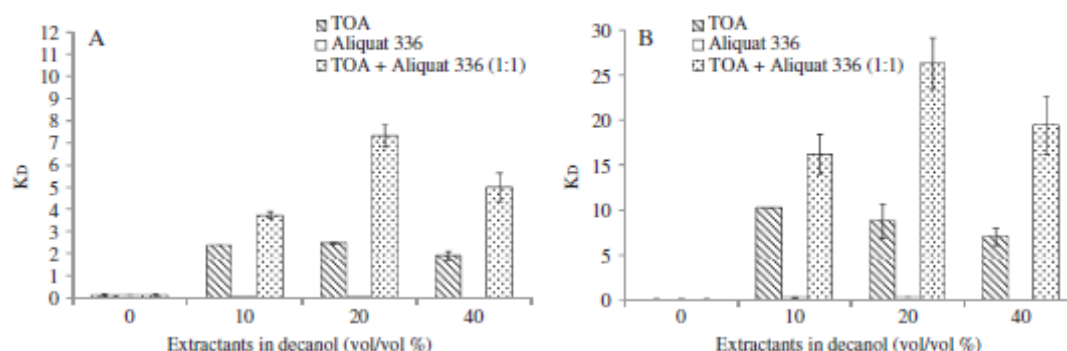


Figure 3. Distribution coefficient in dynamic mode extraction of 3-HP (A) (1 g L^{-1} , initial pH = 3.2) and 2-HP (B) (1 g L^{-1} , initial pH = 2.9) at 25°C as a function of extraction phase composition when TOA and Aliquat 336 are used alone or mixed together (equal vol/vol %) in *n*-decanol.

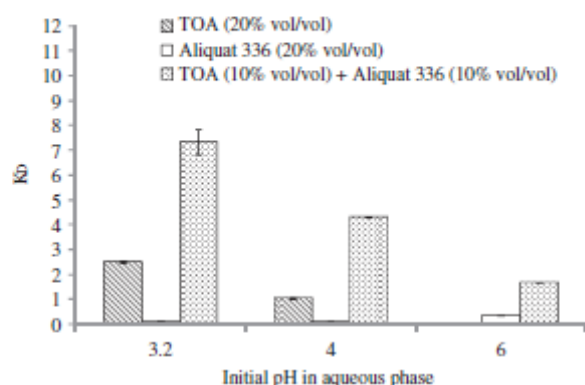


Figure 4. Effect of initial pH of the aqueous phase on 3-HP (1 g L^{-1}) distribution coefficient. Extraction was performed at 25°C in dynamic mode with TOA and Aliquat 336 used alone or mixed together in *n*-decanol.

the viscosity did not vary significantly and remained comparable with the viscosity of pure *n*-decanol. However, it should be mentioned that the measurements were done on bulk samples. Interfacial transfer phenomena between organic and aqueous phases would be more affected by the viscosity change at the interface. This can be better illustrated by determining the distribution coefficient under static extraction conditions, in a way that maintains a 'mechanically undisturbed' interface between the two

phases (Fig. 2). Results show a significant decrease of K_D for both acids and both extractants. For all concentrations of TOA used, 2-HP remained better extracted than 3-HP. Extraction of 2-HP with Aliquat 336 remained significantly higher than 3-HP ($P \leq 0.08$) for 10 and 20% amine concentrations. This decrease of K_D can be linked to the formation of a third phase of acid-amine complex at the interface that might limit the transfer of the acid to the bulk of the extraction phase and therefore negatively affect the distribution of acid. Unlike classical static liquid-liquid extraction where the interfacial area is renewed by mere diffusion, it seems that complex formation in reactive extraction of carboxylic acids by amines stabilizes the interface and limits its renewal. The state achieved is therefore a pseudo-equilibrium. The interface must be disturbed mechanically to force the transfer of the acid-amine complexes from the interface into the bulk of the extraction phase since acid molecules have a higher affinity towards water than the organic diluent. Stirring also increases the interfacial surface area and favors the extractant's accessibility to the interface.^{25,26}

Improvement of extraction by means of mixed TOA and Aliquat 336

In the following experiments, leads for the optimization of 3-HP extraction have been investigated through the combination of the effects of both tertiary and quaternary amines. Reactive extraction of 3-HP and 2-HP from aqueous solutions without pH adjustment was first performed with various proportions of TOA, Aliquat 336, or a mixture of TOA and Aliquat 336. Results are displayed

on Fig. 3. For both acids, and at all amines concentrations, the distribution coefficient obtained in the case of mixed extractants ($K_{D, (TOA+Aliquat336)}$) was higher than the sum of the coefficients of individual extractants ($K_{D, (TOA)} + K_{D, (Aliquat336)}$). The highest extraction was observed for 20% mixed extractants and decreased with the increase of amines fraction. This synergism can be expressed quantitatively as suggested by Ramakrishna and Pati²⁵ according to the following coefficient:

$$\text{Synergism Coefficient } S.C = \frac{K_{D, (TOA+Aliquat336)}}{K_{D, (TOA)} + K_{D, (Aliquat336)}} \quad (8)$$

For 3-HP, the S.C value is the highest at 20% mixed extractants (10 % TOA + 10% Aliquat 336): S.C = 2.9 vs. 1.6 and 2.6, respectively, for 10% and 40% mixed amines. Similar behavior is displayed for 2-HP and S.C values are approximately the same as for 3-HP. Data for mixed amines TOA + Aliquat 336 in Fig. 3 depict a bell shaped profile similar to that mentioned for TOA (Fig. 1). Regarding the TOA concentration effect, it is noticeable that the maximum of K_D value for mixed amines (Fig. 3) is obtained at a TOA fraction of 10% which is the same when TOA is used alone in *n*-decanol (Fig. 1). This may indicate that the extraction mechanism of 3-HP and 2-HP, at initial pH levels of 3.2 and 2.9, respectively, involves mainly the TOA which activity is favored by Aliquat 336. Once again, as stressed for TOA, the decrease of K_D value at 40% mixed amines (Fig. 3) can be linked to the decrease of *n*-decanol concentration in the organic phase. In fact, reactive extraction involves both chemical interactions between the acid and the extractants and between the acid–amine complex and the diluents.²¹ Most particularly, when active diluents with functional groups such as *n*-decanol are used, the extraction phase is capable of uptaking acid in excess of which is necessary for the stoichiometric neutralization of the amine.²⁰ Although the exact mechanism involved is not known, some data suggest that specific hydrogen bonding between the proton of the diluent and the acid–amine complex explains the high solvation power of these diluents,^{24,29} a property that is involved in the synergism observed between TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol. Synergistic effects between mixed extractants have been reported for the reactive extraction of 2-HP using tertiary/quaternary alkylamines,^{24,36} tri-*n*-butylphosphate/alkylamines,³¹ di-2-ethylhexylphosphoric acid.³⁰ Possible mechanisms for this synergism can be linked to the enhancement of hydrophobic character of the extracted complexes.³⁷ Indeed, Aliquat 336 would act through the displacement of water molecules from the hydration shell of the acid–TOA complex, rendering it less hydrophilic and thus more stable in *n*-decanol. In addition, Aliquat 336 may facilitate the transfer of the acid towards the organic phase thanks to its amphiphilic character as a surface active solvent. This behavior can be illustrated based on the higher water solubility of Aliquat 336 in comparison with TOA and its molecular structure owing to its ionic head and apolar tails. Kyuchoukov *et al.*³⁶ explained the synergy between mixed TOA and Aliquat 336 in terms of complementary extraction mechanisms according to the equilibrium pH of the aqueous phase: first, the acid is extracted by TOA in the low pH range, which induces a pH increase that is favorable for the extraction of the dissociated form of the acid by Aliquat 336.

The synergistic effect of mixed extractants has been shown to depend on various parameters such as the initial pH of the aqueous solution, the acid concentration and the TOA:Aliquat 336 ratio.^{34,38–40} These parameters were further tested on 3-HP reactive extraction. First, reactive extraction of 3-HP from aqueous

solutions with initial pH levels of 3.2, 4 and 6 by TOA, Aliquat 336, or a mixture of them was performed. Results are displayed on Fig. 4. At all pH levels, the approach of mixing extractants improved the extraction performance in comparison with TOA and Aliquat 336 when used alone. Similar behavior was reported for the extraction of 2-HP using the same extractants at initial pH levels of 4, 5 and 6.²⁴ The synergistic effect was observed at pH levels lower than the *pKa* of the 3-HP acid (extraction driven mainly by TOA) as well as at pH = 6 which is higher than the *pKa* (extraction driven mainly by Aliquat 336). Indeed, the extraction by Aliquat 336 was detected only at pH = 6 ($K_D = 0.35$). At initial pH = 3.2, the K_D for TOA was about 2.5 then decreased significantly at pH = 4 before falling dramatically at pH = 6. The K_D for mixed extractants at that pH level was about 1.7. Accordingly, it seems that the extraction mechanism in the presence of mixed extractants at pH = 6 involves both TOA and Aliquat 336 where this latter is the active extractant. Conversely, at pH levels lower than the *pKa* of the acid, TOA is the active extractant. It is possible that TOA and Aliquat 336 form a ternary complex with the acid and, for a given pH level, only one of the two extractants is the active species which activity is favored by the other species.

In order to investigate whether synergism is linked to the ratio between mixed extractants, we determined the K_D of 3-HP for various amounts of Aliquat 336 mixed with TOA at a total content of 20% in *n*-decanol. Similar experiments were conducted for 2-HP for the sake of comparison between the two acids. Results are shown in Fig. 5. The better performance of the mixed extractant is once again clearly seen in comparison with separate extractants (20% TOA or Aliquat 336). Even with 2% Aliquat 336 and 18% TOA, the K_D of mixed extractants exceeds that with TOA alone. The K_D of both acids increases passing through a maximum at a ratio of 1:1 vol/vol between the two extractants, after which it decreases. This volume ratio corresponds approximately to a molar stoichiometry of 1:1 between the two extractants (4.9% mol/mol and 4.31% mol/mol for TOA and Aliquat 336, respectively). Regarding the extraction mechanism, the 1:1 molar stoichiometry would be the most favorable to form the ternary complex between the acid and the two extractants, where TOA is the active species at the pH region of Fig. 5. This mechanism would be the same for both 3-HP and 2-HP. Indeed, if the ratio $\frac{K_D^{2-HP}}{K_D^{3-HP}}$ is calculated using the K_D data for TOA used alone as extractant or using the K_D data for synergistic mixture of TOA and Aliquat 336, the values obtained appear to be close to each other: 3.82 ± 0.45 vs 3.76 ± 0.51 , respectively. As discussed above for Fig. 1, the difference in the order of magnitude of K_D between the two acids in the case of mixed extractants (Fig. 5) can be mainly related to the stronger acidity of 2-HP in comparison with 3-HP (Table 1).

With regard to other studies on the reactive extraction of 2-HP by means of mixed TOA and Aliquat 336, Kyuchoukov *et al.*³⁶ and Monwar Hossain and Maisuria²⁴ reported higher K_D at 1:1 vol/vol ratio between extractants than at other ratios. Matsumoto *et al.*³⁰ reported synergistic extraction of organic acids, including 2-HP, using TOA and di-2-ethylhexylphosphoric acid (D2EHPA). In their study, the K_D was the highest at 1:1 molar stoichiometry between extractants. Using FTIR analysis of the organic phase, these authors suggested that TOA and D2EHPA interacted together to form TOA-D2EHPA as the active species and TOA-D2EHPA-AH as the extracted species.³⁰

In order to investigate whether the extraction performance is affected by acid concentration, we studied the extraction of 3-HP and 2-HP at different initial concentration levels using separate

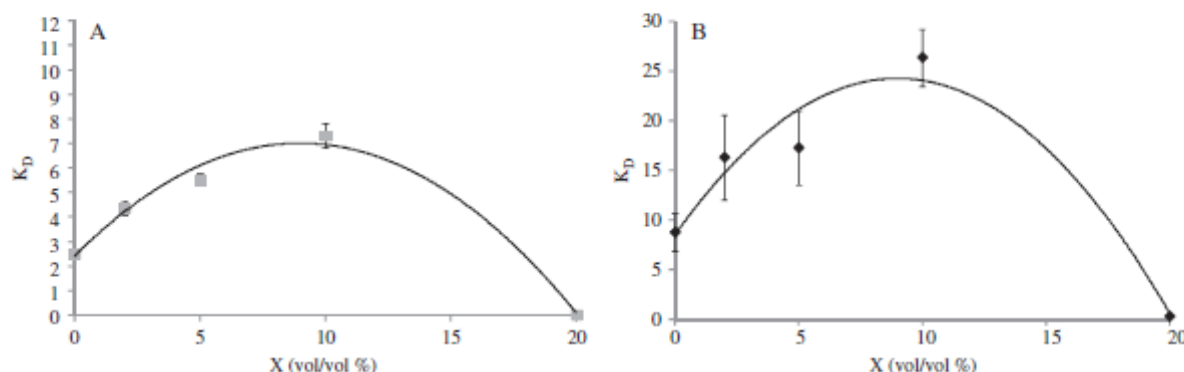


Figure 5. Distribution coefficient in dynamic mode extraction of 3-HP (A) (1 g L^{-1} , initial pH = 3.2) and 2-HP (B) (1 g L^{-1} , initial pH = 2.9) at 25°C as a function of the composition of the mixed extractant (20% vol/vol TOA and Aliquat 336 in *n*-decane). X: concentration of Aliquat 336; 20 - X: concentration of TOA.

and mixed extractants. Results are shown on Fig. 6. First, regarding the range of 3-HP concentration explored in the present work, it should be mentioned that, so far, the highest published levels of production from glycerol are limited to a few grams per liter.^{2,8,41} As a result, the concentration levels used here were between 0.5 and 5 g L^{-1} , which fall into the range of concentration that is expected for an integrated process of microbial production and extraction of 3-HP. Moreover, the process should be efficient at low acid concentration because toxicity is observed even at low levels of 3-HP.

It appears from Fig. 6 that the synergistic mixture of TOA and Aliquat 336 shows the best extraction performance, expressed as extraction yield (Y%), whatever the acid concentration level. The extraction performance with Aliquat 336 remains the lowest. For both 3-HP and 2-HP acids, Y% varied only slightly as a function of the acid concentration. This behavior compares well with that reported for lactic acid⁴² and propionic acid¹⁸ at concentration levels equivalent to Fig. 6 and using TOA as extractant. It should be mentioned that the equilibrium pH of the initial 3-HP aqueous phase varied between 3.25 and 2.49 for 0.5 g L^{-1} and 5 g L^{-1} , respectively. For 2-HP, pH varied between 2.98 and 2.15 for 0.5 g L^{-1} and 5 g L^{-1} , respectively. At this pH range, given the pK_a of both acids, the extraction mechanism involves mainly TOA which extracts the undissociated form of these acids. A comparison between molar fractions gives a large excess of extractants (4.9% mol/mol for TOA and 4.31% mol/mol for Aliquat 336) with regard to the acid which ranged from 0.01% mol/mol at 0.5 g L^{-1} up to 0.1% mol/mol at 5 g L^{-1} . Accordingly, it seems that the increase of acid concentration up to 5 g L^{-1} did not lead to a detectable limiting factor in terms of amount of extractant as observed by Waghmare *et al.*⁴³ for tri-*n*-butyl phosphate used to extract nicotinic acid at concentration levels of 0.1 – 30 g L^{-1} .

Selective extraction of 3-hydroxypropionic acid from model and real bioconversion media

So far, reactive extraction of 3-HP acid from binary aqueous solutions has been undertaken and the effects of different operating conditions have been investigated. However, regarding the ultimate target to develop an integrated extractive–bioconversion process, it is necessary to consider the co-existence of the acid with other molecules and compounds of the bioconversion broth. When produced from glycerol by lactic acid bacteria, 3-HP is obtained through the enzymatic oxidation of an intermediate metabolite, 3-HPA, that is in parallel partially reduced to obtain

1,3-PDO. Besides, cells and/or cell-originating fractions can be present in the aqueous phase. In order to investigate whether the reactive extraction performances are affected by this complex composition of the bioconversion broth, we studied the extraction of 3-HP from model and real bioconversion media (Table 3). This attractive approach has not been undertaken before in the case of 3-HP. For other acids, mainly 2-HP, a few studies have dealt with this topic.^{15,17,24,39} To the best of our knowledge, most of these studies aimed to demonstrate the feasibility of reactive extraction from bioconversion media,^{24,39} with a main focus on the toxicity of extraction reagents towards microorganisms and its countermeasures.^{15,17}

Table 3 gathers data for the yield of extraction as a function of the aqueous phase composition. Comparison between the binary medium and the model bioconversion broth shows that there is no effect of the added compounds (3-HPA, glycerol and 1,3-PDO) on the extraction yield of 3-HP. For both conditions, the best performing organic phase remains the mixed extractants. For the real bioconversion broth at initial pH = 3.2, the 3-HP extraction with TOA alone and TOA + Aliquat 336 was lower than the binary and the model solutions. For these extractants, a further decrease of Y% is observed for the real bioconversion broth at pH = 5. Regarding glycerol, 3-HPA and 1,3-PDO, Y% was quite low whatever the composition of organic phase since their extraction is only physical and did not involve the reactivity of extractants as is the case for 3-HP. Moreover, extraction of these solutes remained unchanged whatever the medium, from model to real bioconversion broths.

Along with the decrease of 3-HP extraction yield, its selectivity (α_{3HP}) and separation factor ($\beta_{3HP/II}$) decreased as the composition of the aqueous phase became more and more complex. Indeed, for the model bioconversion broth, the extracted 3-HP represented about 36% of the total extracted species ($\alpha_{3HP} = 35.9\%$). This percentage decreased for the real bioconversion broth: 15.7% and 13.5% at pH = 3.2 and pH = 5, respectively. The reactive extraction remained selective for 3-HP over the other compounds ($\beta_{3HP/II} > 1$).

For the real bioconversion broth used in the present study, *L. reuteri* cells were removed by centrifugation from the aqueous phase. The cell-free supernatant obtained contained 3-HP, 3-HPA, glycerol and 1,3-PDO at concentration levels close to the model broth as well as, probably, some soluble cell-originating compounds such as proteins, amino acids, lipids, fatty acids, nucleic acids and peptidoglycan. The presence of these compounds seemingly modifies the extraction of 3-HP. In their study

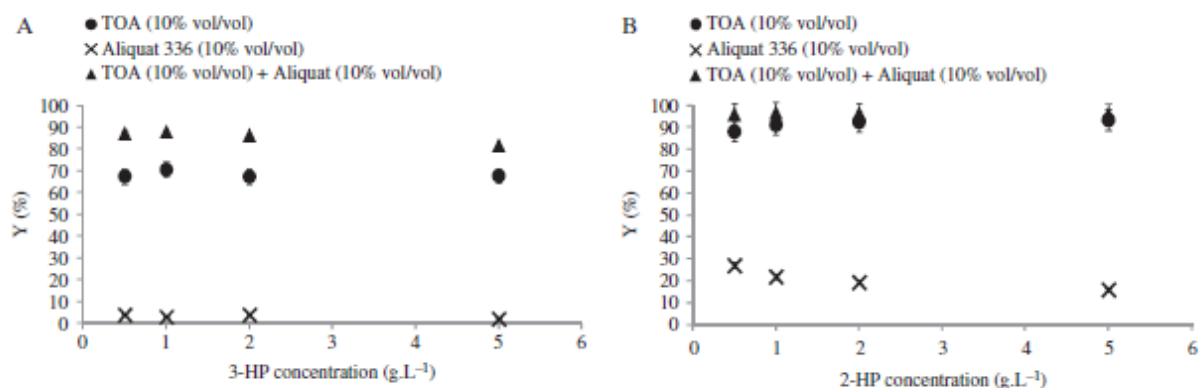


Figure 6. Effect of the initial acid concentration on the extraction yield of 3-HP (A) and 2-HP (B). Extraction was performed at 25°C in dynamic mode with TOA and Aliquat 336 used alone or mixed together in *n*-decanol.

Table 3. Effect of the aqueous phase composition on reactive extraction of 3-HP. Extraction was performed at 25°C in dynamic mode with *n*-decanol, TOA and Aliquat 336 used alone or mixed together in *n*-decanol

<i>i</i>	Yield of extraction (Y% ± standard deviation)				α_{3HP}^*	β_{3HPH}^*
	Decanol	TOA (20% vol/vol)	Aliquat 336 (20% vol/vol)	TOA (10% vol/vol) + Aliquat 336 (10% vol/vol)		
Binary medium (3-HP in water; initial pH = 3.2)						
3-HP	12 ± 6	71 ± 4	3 ± 3	88 ± 2	100	1
Model bioreconversion broth (initial pH = 3.2)						
3-HP	5 ± 1	75 ± 1	10 ± 1	89 ± 1	35.9 ± 0.4	1
3-HPA	19 ± 1	21 ± 1	19 ± 1	22 ± 1	—	30.1 ± 2.3
Glycerol	2 ± 1	11 ± 1	3 ± 1	13 ± 1	—	53.3 ± 2.4
1,3-PDO	10 ± 1	4 ± 3	13 ± 1	10 ± 1	—	74.8 ± 0.2
Real bioreconversion broth (initial pH = 3.2)						
3-HP	4 ± 1	34 ± 1	9 ± 8	62 ± 2	15.7 ± 0.5	1
3-HPA	19 ± 1	20 ± 1	18 ± 1	20 ± 1	—	6.5 ± 0.8
Glycerol	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	4 ± 1	—	37.0 ± 2.2
1,3-PDO	5 ± 2	7 ± 2	6 ± 3	9 ± 3	—	18.4 ± 5.1
Real bioreconversion broth (initial pH = 5)						
3-HP	1 ± 1	20 ± 1	10 ± 2	47 ± 1	13.5 ± 0.2	1
3-HPA	17 ± 1	19 ± 1	17 ± 1	18 ± 1	—	3.8 ± 0.1
Glycerol	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	3 ± 1	—	25.5 ± 3.9
1,3-PDO	2 ± 1	2 ± 2	2 ± 2	1 ± 1	—	44.0 ± 2.1

* α_{3HP} and β_{3HPH} were calculated for the organic phase containing mixed extractants: TOA (10% vol/vol) + Aliquat 336 (10% vol/vol).

on the liquid–liquid extraction of a nonpolar solute using octanol, Pursell *et al.*⁴⁴ reported a significant effect of soluble proteins and phospholipids produced during fermentation on the extraction performance. These authors suspected the adsorption of these compounds to the interface between the aqueous and the organic phases and a possible physical blockage of that interface in the presence of fermentation biomass. Similarly, Galaction *et al.*⁴⁵ observed a negative influence of cell adsorption to the interface on the reactive extraction of propionic acid. In our study, it would be possible that solutes and cell-originating compounds adsorb to the organic–aqueous interface leading to mass transfer limitations. In that case, not only the transfer of 3-HP would be limited but also the transfer of the other compounds. From Table 3, it appears that Y% remained quite constant in the case of 3-HPA, regardless of the complexity of the aqueous medium. Hence, it can be assumed that the adsorption phenomena at the organic–aqueous interface might specifically hinder the

extraction of 3-HP, for example by decreasing the accessibility of the extractants to the acid, without affecting the extraction of the other compounds. Besides, competition between 3-HP and some cell-originating compounds that can be extracted by TOA and/or Aliquat 336, such as amino acids, fatty acids, nucleic acids and salts, may lead to the decrease in 3-HP extraction performance from the bioreconversion broth. Some preliminary tests using Bradford titration and capillary electrophoresis revealed the presence of proteins and phosphates that can interfere with the extraction of 3-HP given its relatively low concentration in the bioreconversion broth. Ongoing experiments will help to clarify these interplays.

CONCLUSIONS

The experimental study of reactive extraction using tri-*n*-octylamine and Aliquat 336 in *n*-decanol pointed out effective conditions for the recovery of 3-HP. Interestingly, the use of

mixed extractants showed high distribution coefficients over a wide range of experimental conditions: different compositions of the organic phase, pH levels and acid concentrations in the aqueous phase. A noticeable fact for this synergism is its remarkably positive performance at low pH conditions. However, its implementation in an integrated extractive process should ultimately be regarded according to the optimum pH level for 3-HP bioconversion.

A possible extraction mechanism in the presence of mixed extractants considers the formation of a ternary complex between TOA, Aliquat 336 and the carboxylic acid. Depending on the pH level, only one extractant would be the active species (TOA at low pH and Aliquat 336 at high pH), whereas the other species favors the action of the active one. A 1:1 molar stoichiometry of the mixed extractants would be the most favorable to form this ternary complex. Moreover, chemical interactions between the acid-amines complex and *n*-decanol, a so-called active diluent that favors the complex solvation, are involved. This mechanism would be the same in the case of 2-HP which showed a similar behavior over the studied experimental conditions, except the order of magnitude of extraction performances. Indeed, 2-HP was better extracted thanks to its stronger acidity and less pronounced hydrophilic character in comparison with 3-HP. For both acids, the extraction efficiency was shown to be predominantly controlled by interfacial chemical reactions with possible extractants accessibility limitations. When 3-HP was extracted from a real bioconversion broth, similar limitations were observed owing to the presence of some cell-originating compounds that may adsorb to the interface between the aqueous and the organic phases. Additional limitations may come from the competition between 3-HP and these compounds regarding the reactive extraction. Further work should be undertaken with a view to better quantifying these phenomena and elucidating the exact mechanisms involved. This approach will be of valuable interest towards the ultimate objective to develop an extractive-bioconversion process of biobased 3-HP. For this purpose, the liquid-liquid reactive extraction can be implemented using a membrane contactor coupled to a bioreactor.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Region Champagne-Ardenne, the Conseil Général de la Marne and Reims Métropole for their financial support.

REFERENCES

- van Maris AJA, Konings WN, van Dijken JP and Pronk JT, Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes. *Metabol Eng* **6**:245–255 (2004).
- Straathof AJJ, Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. *Chem Rev* **114**:1871–1908 (2014).
- Smithers-Rapra, *Ten-Year Forecast of Disruptive Technologies in Industrial Biotechnology to 2021*. (2011).
- Smithers-Rapra, *The Future of Bioplastics: Market Forecasts to 2017* (2012).
- DOE USA, Biorefinery, bio-based chemicals - value added products from biorefineries. *International Energy Agency* (2012).
- Werpy T and Petersen G, Top value added chemicals from biomass. Volume I – Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. USA DOE 76 (2004).
- Choi S, Song CW, Shin JH and Lee SY, Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metabol Eng* **28**:223–239 (2015).
- Kumar V, Ashok S and Park S, Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnol Adv* **31**:945–961 (2013).
- Stark D and Von Stockar U, *In situ* product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years, in *Process Integration in Biochemical Engineering*, ed by von Stockar U and Wielen vdL. Springer-Verlag, Berlin, 149–175 (2003).
- Van Hecke W, Kaur G and De Wever H, Advances in *in situ* product recovery (ISPR) in whole cell biotechnology during the last decade. *Biotechnol Adv* **32**:1245–1255 (2014).
- Marx A, Wendisch VF, Rittmann D and Buchholz S, Microbiological production of 3-hydroxypropionic acid. US 2009/0325248 A1 (2009).
- Meng X, Tsobanakis P, Malsam J and Abraham TW, Process for Preparing Carboxylic Acids and Derivatives Thereof. US 7186856 B2 (2007).
- Joglekar HG, Rahman I, Babu S, Kulkarni BD and Joshi A, Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. *Sep Purif Technol* **52**:1–17 (2006).
- Lopez Garzon CS and Straathof AJJ, Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnol Adv* **32**:873–904 (2014).
- Tik N, Bayraktar E and Mehmetoglu U, *In situ* reactive extraction of lactic acid from fermentation media. *J Chem Technol Biotechnol* **76**:764–768 (2001).
- Wasewar KL, Yawalkar AA, Mouljin JA and Pangarkar VG, Fermentation of glucose to lactic acid coupled with reactive extraction: a review. *Ind Eng Chem Res* **43**:5969–5982 (2004).
- Tong YP, Hirata M, Takanashi H, Hano T, Matsumoto M and Miura S, Solvent screening for production of lactic acid by extractive fermentation. *Sep Sci Technol* **33**:1439–1453 (1998).
- Keshav A, Wasewar KL and Chand S, Extraction of propionic acid using different extractants (tri-*n*-butylphosphate, tri-*n*-octylamine, and Aliquat 336). *Ind Eng Chem Res* **47**:6192–6196 (2008).
- Cascaval D, Kloetzer L, Galaction AI, Vlysidis A and Webb C, Fractionation of carboxylic acids mixture obtained by succinic fermentation using reactive extraction. *Sep Sci Technol* **48**:634–643 (2013).
- Kertes AS and King CJ, Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. *Biotechnol Bioeng* **28**:269–282 (1986).
- Tamada JA, Kertes AS and King CJ, Extraction of carboxylic-acids with amine extractants. 1. Equilibria and law of mass-action modeling. *Ind Eng Chem Res* **29**:1319–1326 (1990).
- Marinova M, Kyuchoukov G, Albet J, Molinier J and Malmay G, Separation of tartaric and lactic acids by means of solvent extraction. *Sep Purif Technol* **37**:199–207 (2004).
- Matsumoto M, Takahashi T and Fukushima K, Synergistic extraction of lactic acid with alkylamine and tri-*n*-butylphosphate: effects of amines, diluents and temperature. *Sep Purif Technol* **33**:89–93 (2003).
- Monwar Hossain M and Maisuria JL, Effects of organic phase, fermentation media, and operating conditions on lactic acid extraction. *Biotechnol Prog* **24**:757–765 (2008).
- Kahya E, Bayraktar E and Mehmetoglu U, Optimization of process parameters for reactive lactic acid extraction. *Turkish J Chem* **25**:223–230 (2001).
- Carlescu A, Blaga AC, Galaction AI, Tumea M and Cascaval D, Interfacial mass transfer in the reactive extraction process of succinic acid from viscous aqueous solutions. *Sep Sci Technol* **49**:974–980 (2014).
- Hong YK, Hong WH and Han DH, Application of reactive extraction to recovery of carboxylic acids. *Biotechnol Bioproc Eng* **6**:386–394 (2001).
- Sardari RR, Dishisha T, Pyo SH and Hatti-Kaul R, Improved production of 3-hydroxypropionaldehyde by complex formation with bisulfite during biotransformation of glycerol. *Biotechnol Bioeng* **110**:1243–1248 (2013).
- Tamada JA and King CJ, Extraction of carboxylic-acids with amine extractants. 2. Chemical interactions and interpretation of data. *Ind Eng Chem Res* **29**:1327–1333 (1990).
- Matsumoto M, Kawamura Y and Kondo K, Synergistic extraction of organic acids with Tri-*n*-octylamine and Di2-ethylhexylphosphoric acid. *J Chem Eng Japan* **37**:1150–1154 (2004).
- Matsumoto M, Otono T and Kondo K, Synergistic extraction of organic acids with tri-*n*-octylamine and tri-*n*-butylphosphate. *Sep Purif Technol* **24**:337–342 (2001).
- Choudhury B, Basha A and Swaminathan T, Study of lactic acid extraction with higher molecular weight aliphatic amines. *J Chem Technol Biotechnol* **72**:111–116 (1998).
- Kyuchoukov G and Yankov D, Lactic acid extraction by means of long chain tertiary amines: a comparative theoretical and experimental study. *Ind Eng Chem Res* **51**:9117–9122 (2012).
- Marinova M, Albet JL, Molinier J and Kyuchoukov G, Specific influence of the modifier (1-decanol) on the extraction of tartaric

- acid by different extractants. *Ind Eng Chem Res* **44**:6534–6538 (2005).
- 35 Ramakrishna WV and Patil SK, Synergistic extraction of actinides, in *Structure and Bonding new Developments*. Springer-Verlag: Heidelberg, Berlin (1984).
- 36 Kyuchoukov G, Marinova M, Molinier J, Albet J and Malmay G, Extraction of lactic acid by means of a mixed extractant. *Ind Eng Chem Res* **40**:5623–5639 (2001).
- 37 Sarkar R, Ray S and Basu S, Synergism in solvent extraction and solvent extraction kinetics. *J Chem Biol Phys Sci* **4**:3156–3181 (2014).
- 38 Hossain MM and Maisuria JL, Effects of organic phase, fermentation media, and operating conditions on lactic acid extraction. *Biotechnol Prog* **24**:757–765 (2008).
- 39 Yankov D, Molinier J, Kyuchoukov G, Albet J and Malmay G, Improvement of the lactic acid extraction. Extraction from aqueous solutions and simulated fermentation broth by means of mixed extractant and TOA, partially loaded with HCl. *Chem Biochem Eng Quarterly* **19**:17–24 (2005).
- 40 Harington T and Hossain MM, Extraction of lactic acid into sunflower oil and its recovery into an aqueous solution. *Desalination* **218**:287–296 (2008).
- 41 Burgé G, Saulou-Bérion C, Moussa M, Pollet B, Flourat A, Allais F et al., Diversity of *Lactobacillus reuteri* strains in converting glycerol into 3-hydroxypropionic acid. *Appl Biochem Biotechnol* DOI **10.1007/s12010-015-1787-8** (2015).
- 42 Wasewar KL, Heesink ABM, Versteeg GF and Pangarkar VG, Equilibria and kinetics for reactive extraction of lactic acid using Alamine 336 in decanol. *J Chem Technol Biotechnol* **77**:1068–1075 (2002).
- 43 Waghmare MD, Wasewar KL, Sonawane SS and Shende DZ, Reactive extraction of picolinic and nicotinic acid by natural non-toxic solvent. *Sep Purif Technol* **120**:296–303 (2013).
- 44 Pursell MR, Mendes-Tassis MA and Stuckey DC, Effect of fermentation broth and biosurfactants on mass transfer during liquid–liquid extraction. *Biotechnol Bioeng* **85**:155–165 (2004).
- 45 Galaction AI, Carlescu A, Turmea M and Caşcaval D, Direct extraction of propionic acid from *Propionibacterium acidipropionici* broths with Tri-n-octylamine. *Chem Eng Technol* **35**:1657–1663 (2012).

2.1.3 Conclusion et perspectives de l'étude

Cette étude a d'abord permis de montrer que l'extraction réactive liquide-liquide du 3-HP en phase aqueuse était possible et favorable, dans de nombreuses conditions de pH, pour différentes concentrations en acide et diverses compositions de la phase organique extractante. La comparaison réalisée avec le 2-HP a cependant mis en évidence des performances moindres par rapport à cet isomère de position, qui s'explique au moins en partie par les différences en acidité et en hydrophobicité entre ces deux molécules.

L'utilisation combinée d'amine tertiaire (TOA) et d'ammonium quaternaire (Aliquat 336) solvatés dans du *n*-décanol a montré une synergie dans l'extraction du 3-HP. Cette extraction est favorisée à pH acide, ce qui semble indiquer que l'amine tertiaire, de par son mécanisme d'action, serait principalement impliquée dans la formation du complexe avec l'acide. L'Aliquat 336, en formant un complexe ternaire avec la TOA et le 3-HP permettrait alors la stabilisation de celui-ci, lui assurant notamment une meilleure solubilité en phase organique.

Des essais réalisés sur milieu modèle et réel de bioconversion montrent que, si la composition du milieu contenant les diverses molécules de la voie de biosynthèse du 3-HP (glycérol, 3-HPA et 1,3-PDO) n'a que peu d'effet sur les performances d'extraction (coefficient de distribution et pourcentage d'extraction en phase organique), la présence de composants d'origine cellulaire comme des phospholipides ou des protéines impacte grandement la capacité à extraire. Cependant, le calcul de la sélectivité confirme que le 3-HP est majoritairement extrait du milieu de bioconversion, les autres molécules n'étant que peu ou pas retrouvées en phase organique. Ce travail confirme donc bien l'intérêt de l'approche par extraction réactive liquide-liquide envisagée pour la récupération *in situ* du 3-HP produit à faible titre en milieu aqueux complexe.

Pour limiter le contact direct entre les bactéries présentes dans le milieu de bioconversion et la phase organique extractante, ainsi que pour augmenter la surface d'échange disponible, une extraction liquide-liquide réactive assistée par contacteur à membrane a été envisagée. Cette technique, déjà décrite dans la littérature dans le cas du 2-HP permettrait d'envisager l'intégration des procédés de bioconversion et d'extraction réactive du 3-HP.

2.2 Optimisation de l'ERCM du 3-HP sur milieu modèle et réel de bioconversion

2.2.1 Contexte et objectifs de l'étude

L'extraction réactive liquide-liquide d'acides organiques par des amines a été largement étudiée et décrite dans le cas de la séparation de l'acide lactique mais aussi, plus récemment, du 3-HP (Moussa *et al.* 2015). Cette réaction nécessite la mise en contact dispersif de la phase aqueuse contenant l'acide avec une phase organique extractante. En plus des problématiques de toxicité éventuelle pour la cellule, cette méthode dispersive peut conduire à la formation d'émulsions stables non désirées. Une solution permet de pallier ces problèmes, tout en augmentant la surface spécifique d'échange : l'utilisation de contacteurs à membrane, méthode déjà décrite pour l'extraction réactive du 2-HP et d'autres acides organiques mais pas encore dans le cas du 3-HP.

A la suite de l'étude visant à déterminer la composition d'une phase extractante adaptée à l'extraction réactive du 3-HP en milieu aqueux, la mise en œuvre de cette extraction en contacteur membranaire a été réalisée. L'influence de différents paramètres expérimentaux a été étudiée : pH, concentration en 3-HP, complexité de la phase aqueuse (milieu modèle vs milieu réel de bioconversion), composition de la phase extractante en mélange ayant montré une synergie TOA+Aliquat 336 ou bien avec de la TOA seule.

Ces travaux, ayant pour but d'optimiser les performances de l'extraction réactive du 3-HP, mais aussi de mieux comprendre et contrôler les mécanismes limitant le transfert du 3-HP au sein du procédé de séparation, ont fait l'objet d'une publication au *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.

2.2.2 Optimization of biobased 3-hydroxypropionic acid reactive extraction assisted by hollow-fiber membrane contactor using tri-n-octyl-amine and Aliquat 336 in *n*-decanol

Publication parue au *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Burgé *et al.* 2016)

Résumé :

L'extraction réactive liquide-liquide constitue une technique prometteuse pour la récupération ciblée d'acides carboxyliques depuis un milieu de bioconversion. Ce travail est centré sur l'optimisation de l'extraction réactive du 3-HP assistée par contacteur membranaire (ERCM), en utilisant la tri-octyl amine (TOA) et l'ammonium quaternaire Aliquat 336 comme molécules extractantes solvatées dans du *n*-décaneol, et focalisé sur ses applications pratiques pour récupérer sélectivement le 3-HP obtenu par bioconversion du glycérol chez *L. reuteri*.

Les résultats soulignent d'abord l'influence du pH initial et de la concentration en acide de la phase aqueuse ainsi que l'impact de la composition de la phase organique extractante sur les performances de l'extraction. Le coefficient de distribution le plus important obtenu pour le 3-HP ($K_D = 13$) a été observé à pH 3 avec phase organique composée de 10 % v/v de TOA + 10 % v/v d'Aliquat 336 + 80 % v/v de *n*-décaneol. Cette étude montre également que si la concentration en acide et le ratio entre les extractants n'a que peu d'influence sur le K_D , ces deux paramètres ont un impact sur la cinétique d'extraction. De plus, la faisabilité de l'ERCM du 3-HP à partir d'un milieu réel de bioconversion avec le glycérol comme substrat de départ est démontrée, avec une cinétique d'extraction du même ordre de grandeur mais avec un coefficient de distribution plus faible par rapport aux expérimentations effectuées sur milieu modèle.

En comparaison aux autres molécules de la voie de biosynthèse du 3-HP (glycérol, 3-HPA, 1,3-PDO), le 3-HP est préférentiellement extrait du milieu de bioconversion, confirmant ainsi la forte sélectivité du procédé d'extraction étudié et son potentiel pour l'extraction *in situ* intégrée à la production biotechnologique du 3-HP.

Reactive extraction of bio-based 3-hydroxypropionic acid assisted by hollow-fiber membrane contactor using TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol

Grégoire Burgé,^{a,b,c} Florian Chemarin,^{a,b,c} Marwen Moussa,^{b,c} Claire Saulou-Bérion,^{b,c} Florent Allais,^{a,b,c} Henry-Éric Spinnler^{b,c} and Violaine Athès^{b,c*}

Abstract

BACKGROUND: Reactive liquid–liquid extraction is a promising technique for the direct recovery of carboxylic acids from bioconversion media. This work focused on the optimization of 3-hydroxypropionic acid (3-HP) reactive extraction assisted by hollow-fiber membrane contactor (HFMC), using tri-*n*-octylamine (TOA) and Aliquat 336 as extractants in *n*-decanol, and on its practical application for the recovery of 3-HP obtained from glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*.

RESULTS: The results underlined the influence of the initial pH and 3-HP concentration of the aqueous medium and the impact of extractant phase composition on the extraction performances. The highest distribution coefficient of 3-HP ($K_D = 13.0$) was observed at pH = 3 with 10% v/v TOA mixed with 10% v/v Aliquat 336 in *n*-decanol. This study showed that the acid concentration and the ratio of amines used between TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol did not have a great impact on the K_D during 3-HP reactive extraction, whereas it had an influence on the extraction kinetics. Moreover, 3-HP reactive extraction assisted by HFMC from real bioconversion broth with glycerol as the substrate was shown to be feasible, with the same order of magnitude of extraction kinetics but with a lower K_D compared with reactive extraction using model broth.

CONCLUSIONS: 3-HP was predominantly extracted from the bioconversion broth, confirming the high selectivity of the extraction process studied and the high potential of this approach applied to the biotechnological production of 3-HP.

© 2016 Society of Chemical Industry

Keywords: 3-hydroxypropionic acid; reactive extraction; hollow-fiber membrane contactor; trioctylamine; Aliquat 336; *n*-decanol; glycerol bioconversion broth

NOTATION

t	time (s)
K_D	distribution coefficient
$Y\%$	extraction yield (%)
τ	time to reach 63% of the equilibrium extraction yield (min)

INTRODUCTION

The carboxylic acid 3-hydroxypropionic acid (3-HP, CAS number 503-66-2) has enormous potential as a platform molecule for the (co)-polymerization and production of commercially-valuable chemicals such as propiolactone, acrylic acid, malonic acid and acrylamide.¹ Although its use is currently limited due to its exclusive synthesis via chemical pathways,² its market is growing.³ Because of the decreasing availability and the rising costs of petroleum as well as rising concerns about the global environment,⁴ bioconversion using microorganisms is seen as a choice alternative to the chemical synthesis of 3-HP because

of its prohibitive cost, low production volume and process complexity⁵ and, ultimately, to the production of 'bio-based' polymers produced from renewable raw materials. Scientific studies have demonstrated that a few microorganisms, including the Gram-positive probiotic *Lactobacillus reuteri*, are able to produce 3-HP by bioconversion of glycerol.^{6–9} The metabolic pathway of 3-HP biosynthesis from glycerol by *L. reuteri* comprises two

* Correspondence to: V Athès, INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France. Email: vathes@grignon.inra.fr

a Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI) - AgroParisTech, 247 rue Paul Vaillant Couturier, F-51100 Reims, France

b AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

c INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

steps. In a first enzymatic reaction, glycerol is converted into 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA). 3-HPA is subsequently oxidized into 3-HP through a three-step reaction and can also be reduced to 1,3-propanediol (1,3-PDO),⁸ where the ratio between 3-HP and 1,3-PDO depends at least in part on the redox conditions. Among the products of the glycerol bioconversion pathway, 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA, also known as reuterin) is considered the most toxic for the producing strains,^{10–12} even if 3-HP is also toxic, at least in part, due to the acidification of the medium,¹³ leading to low productivity and a dilute product stream. This, in turn, entails energy and cost-intensive downstream processes. A potential strategy to reduce the inhibitory stress associated with these molecules, increase the performance of the microbial cells and recover the molecule of interest is to implement an 'in situ product recovery' (ISPR), by which upstream bioconversion is combined with downstream extraction and 3-HP recovery.

Although no current ISPR techniques for the extraction of 3-HP can be found in the literature at this time, some patents suggest that processes that have proved to be effective for the extraction of its positional isomer lactic acid, or 2-hydroxypropionic acid (2-HP), could also be applied to 3-HP recovery since they exhibit similar physicochemical properties.^{14,15} A promising technique is liquid–liquid reactive extraction in an organic phase containing an extractant,^{16–20} potentially coupled with the use of a hollow-fiber membrane contactor (HFMC).^{21,22} Similarly, it could be an effective technique for the extraction of 3-HP as mentioned by some patents.^{14,15} In this technique, an extractant dissolved in an organic phase is placed in contact with the organic acid dissolved in the aqueous phase through the pores of a membrane with a stabilized interface between the aqueous and the organic phases. Moreover, reactive extraction is an emerging separation technique for the recovery of acids from dilute streams with an acid content of less than 10%,²³ as has often been described in the literature.^{7–9} The use of a hollow fiber membrane contactor makes it possible to avoid dispersion of the organic phase into the aqueous phase and, as a result, direct contact with microorganisms and a subsequent phase separation step. Moreover, HFMC displays high compactness and large exchange area due to hollow fiber configuration.^{24,25} The extractant then reacts with the organic acid to form a complex that is soluble in the organic phase. Several studies have reported the use of tertiary amines with long aliphatic chains and anion-exchanging quaternary ammonium salts as extractants in long-chain alcohols as diluents.

It has been reported that tri-*n*-octylamine (TOA) and tri-*n*-octylmethylammonium chloride (Aliquat 336) exhibit good extraction performances in the case of short carboxylic acids such as 2-HP.^{26,27} Moreover, the use of these extractants in mixture revealed a synergistic effect for the reactive extraction of 2-HP.^{22,28} Several studies reported that tertiary amines only extracted the undissociated form of the acid.^{29–31} However, the difference in position of the hydroxyl group between 2-HP and 3-HP may lead to extraction yield differences between the two isomers. Indeed, this position sets the strength of the acid as a function of the inductive effect on the O–H bond of the carboxyl group and decreases with distance. In a recent study, we showed that 2-HP was better extracted thanks to its stronger acidity in comparison with 3-HP. Nevertheless, the concomitant use of a tertiary amine and a quaternary ammonium salt in *n*-decanol, widely described as being an active diluent that favors solvation of the amine-acid complexes,²⁹ resulted in a favorable 3-HP extraction.³² Moreover, aiming at performing an extractive bioconversion, the use of

n-decanol is a good compromise given its low water solubility compared with other active diluents.

This work therefore aimed at studying the reactive extraction performances of 3-HP using a hollow fiber membrane contactor. The effect of various operating parameters on the distribution coefficient (K_D), the yield of extraction ($Y\%$), and the time to reach 63% of the equilibrium extraction yield (τ) was assessed in order to optimize the process: the initial pH of the aqueous phase, the 3-HP concentration in the aqueous phase and the ratio between extractants (TOA and Aliquat 336) in *n*-decanol. The use of a real bioconversion broth allowed insights into the mechanisms of reactive extraction and mass transfer in the integrated extractive bioconversion process.

EXPERIMENTAL

Aqueous phases

3-HP aqueous solutions between 0.5 and 2 g L⁻¹ were prepared from commercial solutions (TCI-Europe, 29.1% w/w solution in water). The initial pH of the aqueous phase was adjusted between 3 and 7 with 12 N HCl or 10 N KOH solutions when required. The pH values were measured using a Jenco vision 6071 pH meter.

For some experiments, a real bioconversion broth was used for reactive extraction. This medium was obtained using *L. reuteri* strain DSM 17938, as described previously.⁹ After a growth step on glucose in batch mode at 37 °C in MRS medium, cells were harvested at the early stationary phase by centrifugation (5000 g for 10 min at 4 °C), washed twice with 0.1 mol L⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 6.5) and re-suspended in 200 mmol L⁻¹ glycerol solution (18 g L⁻¹ in sterile distilled water; initial pH = 6.5) to obtain an OD_{600 nm} of 20 (corresponding to 10 × 10¹⁰ CFU mL⁻¹). Bioconversion was conducted in an Erlenmeyer flask in batch mode without pH regulation. After 3 h, when the bioconversion was achieved (no more glycerol consumed or metabolite produced), the broth containing residual glycerol and the produced metabolites (3-HP, 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) and 1,3-propanediol (1,3-PDO)) was recovered, centrifuged, analyzed and subsequently used for reactive extraction experiments.

Organic phases

Tertiary amine tri-*n*-octylamine (TOA, Sigma-Aldrich) and quaternary ammonium salt tri(C₈H₁₇)₃-methylammonium chloride (Aliquat 336, Sigma-Aldrich) in *n*-decanol as the diluent (Sigma-Aldrich) were used. Four different ratios of mixed extractants (TOA/Aliquat 336) were prepared: 20/0, 18/2, 15/5, 10/10 v/v in *n*-decanol (80% v/v).

The viscosity of the organic phases at 25 °C was measured using a rotational viscometer (Contraves-Rhéomat 115). Complete rheograms were drawn and a Newtonian behavior was observed for all liquids studied. The viscosity measurements of each organic phase used are summarized in Table 1. Measurements were also made on TOA, decanol and Aliquat 336 alone.

There was no major difference between the use of only TOA in *n*-decanol and the use of 18% TOA and 2% Aliquat 336 (Table 1). On the contrary, the use of 15% TOA and 5% Aliquat 336 or 10% TOA and 10% Aliquat 336 provoked a significant increase in the organic phase viscosity. Concerning the viscosity of extractants alone, TOA displayed a lower viscosity than *n*-decanol (7.94 mPa s compared with 11.63 mPa s), whereas Aliquat 336 displayed the highest (1176.5 mPa s), explaining the observed increase of viscosity of mixed extractants in *n*-decanol when increasing the use of Aliquat 336 (Table 1).

Table 1. Dynamic viscosity at 25 °C of the organic phases used

Organic phase	Viscosity (mPa s)
<i>n</i> -decanol	11.63 ± 0.03
TOA 20% v/v + Aliquat 336 0% v/v + <i>n</i> -decanol 80% v/v	11.54 ± 0.08
TOA 18% v/v + Aliquat 336 2% v/v + <i>n</i> -decanol 80% v/v	11.90 ± 0.14
TOA 15% v/v + Aliquat 336 5% v/v + <i>n</i> -decanol 80% v/v	12.07 ± 0.04
TOA 10% v/v + Aliquat 336 10% v/v + <i>n</i> -decanol 80% v/v	15.03 ± 0.08
TOA	7.94 ± 0.01
Aliquat 336	1176.50 ± 3.12

Table 2. Characteristics of the 2.5 × 8 Liqui-Cel[®] hollow-fiber module and X50 membrane fibers

Module		X50 fibers	
Material	Polypropylene	Material	Polypropylene
Internal diameter	58.4 mm	Internal diameter	220 μm
Internal length	203 mm	External diameter	300 μm
Number of fibers	approx. 9800	Effective length	146 mm
		Wall thickness	40 μm
		Porosity	40%
		Average pore size	0.03 μm

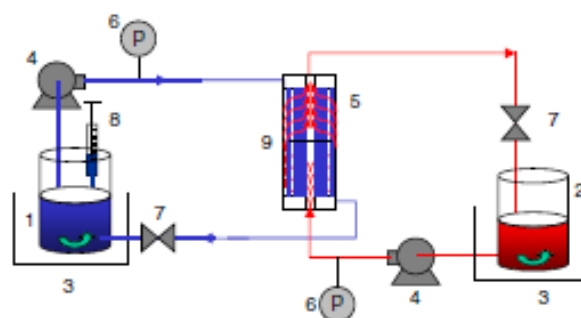
After 3-HP reactive extraction, measurements of viscosity showed a slight increase in the organic phase viscosity (between 7 and 12%, depending on the conditions), probably due to the formation of an acid–amine complex in this phase.

Reactive extraction using a hollow-fiber membrane contactor

The hollow-fiber module used as a membrane contactor for the extraction was the Liqui-Cel[®] 2.5 × 8 X50 containing hydrophobic polypropylene fibers (Membrana, USA). The characteristics of the module and fibers are described in Table 2.

3-HP was first extracted from an aqueous feed phase at 0.5, 1 or 2 g L⁻¹, and the initial pH was set between 3 and 7 to an organic phase composed of 20% v/v extractants (TOA and/or Aliquat 336) and 80% *n*-decanol (v/v). The experimental setup is depicted in Fig. 1.

The aqueous and organic phases were placed in separate reservoirs and their temperature was maintained at 25 °C. Magnetic stirrers ensured homogeneous phases in both reservoirs. Both fluids were pumped by volumetric pumps. The aqueous phases circulated in and out of their reservoirs through the fiber lumens, and the organic phases circulated crossed counter-currently through the shell side of the vertical module with a baffle that ensured optimized hydrodynamic conditions. This configuration was chosen based on the high organic phase viscosity. Manometers were placed at both entries of the module to monitor the pressure difference across the membrane. Since the hydrophobic membrane is preferentially wetted by the organic phase, a slight overpressure must be exerted at the aqueous side in order to prevent the organic phase from flowing across the membrane and the phases

**Figure 1.** Experimental setup for the reactive extraction of 3-HP using a HFMC. 1. Aqueous phase reservoir; 2. Organic phase reservoir; 3. Heated baths; 4. Volumetric pumps; 5. Hollow-fiber membrane contactor; 6. Manometers; 7. Pressure regulating valves; 8. Sampling device; 9. Baffle.

from mixing (ΔP between 0.25 and 0.4 bar, depending on the experimental conditions). Valves were placed at the aqueous and organic outlets of the contactor to achieve the trans-membrane pressure required to stabilize the interface. The aqueous and organic phases were run at flow rates of 9.67 mL s⁻¹ and 12.72 mL s⁻¹, respectively. These levels were chosen in the range encountered in the literature.^{22,33} Working volumes of 500 mL for each phase were used. The 3-HP concentration was measured as a function of time by collecting samples from the aqueous phase. Sampling changed the volume by less than 5%, and this slight volume change over time was not taken into account. Reported data correspond to the mean values of measurements from two independent experiments. The standard deviations were not plotted on the extraction kinetics graphs for the sake of legibility.

HPLC analysis

Glycerol, 3-HP, 3-HPA and 1,3-PDO concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (Buchs, Switzerland). 3-HP was purchased from TCI-Europe (Zwyndrecht, Belgium). 3-HPA was chemically synthesized in our laboratory. Citric acid (10 g L⁻¹ in deionized water), used as the internal standard, was added at 50% (v/v) to each sample just before analysis. Separation was performed on a Biorad Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm; Biorad, Richmond, VA, USA) equipped with a cation H+ Micro-Guard column (30 mm × 4.6 mm; Biorad) at a H₂SO₄ (0.005 mol L⁻¹) flow rate of 0.6 mL min⁻¹ (600 pump; Waters Associates, Millipore, Molsheim, France) and a temperature of 50 °C. Because of the coelution of glycerol and 3-HP between 13 and 14 min, two different detectors were used: quantification was performed by a Waters ultra-violet (UV) detector set at 210 nm for 3-HP (retention time = 13.2 min) and a Waters 2414 refractive index (RI) detector put in series for glycerol, 3-HPA and 1,3-PDO (retention time = 13.8, 15.6 and 18.2 min, respectively). 3-HP concentration was estimated through the UV detector. The RI area corresponding to this 3-HP concentration was then calculated thanks to the corresponding RI calibration curve. The quantification of the glycerol was determined by the difference between the total area of the RI peak and the calculated contribution of 3-HP to this peak surface. Injection of external standards of known amounts of fresh pure substances in filtered and deionized water made it possible to establish calibration curves. Results were analyzed using Empower software (Waters Associates).

Characterization of extraction performances

Two parameters widely used in the literature to quantify the extent of extraction are the distribution coefficient (K_D) and the extraction yield (Y%). The first one is used to mimic the partition coefficient found in non reactive liquid–liquid extraction even if it is not relevant to describe reactive extractions. More adapted parameters found in the literature are the equilibrium constants of the extraction reactions, involving both the extractant and the acid.³⁴ However, as the exact mechanism of action of the synergistic TOA–Aliquat 336 system is still unclear, it is difficult to link this extraction with specific reactions, contrary to the cases of single extractants like TOA.³⁰ To compare our results with those in the literature, we chose to keep the K_D as a reference value, which has the same meaning as the extraction yield.

The acid concentration in the organic phase at equilibrium was obtained through the mass balance by subtracting the concentration of the aqueous solution at equilibrium from the concentration of the initial aqueous solution. The apparent distribution coefficient is defined by the following equation:

$$K_D = \frac{[3\text{-HP}]_{\text{org}}^{\text{eq}}}{[3\text{-HP}]_{\text{aq}}^{\text{eq}}} \quad (1)$$

3-HP concentration at equilibrium in the aqueous phase ($[3\text{-HP}]_{\text{aq}}^{\text{eq}}$) and in the organic phase ($[3\text{-HP}]_{\text{org}}^{\text{eq}}$) take all possible forms of the acid in solutions into account. Extraction performances are also characterized by the yield of extraction (Y%), calculated as follows:

$$Y\% = 100 \times \frac{[3\text{-HP}]_{\text{org}}^{\text{eq}} - [3\text{-HP}]_{\text{aq}}^{\text{eq}}}{[3\text{-HP}]_{\text{aq}}^{\text{ini}}} \quad (2)$$

where $[3\text{-HP}]_{\text{aq}}^{\text{ini}}$ is the initial 3-HP concentration in the aqueous phase.

To characterize the extraction kinetics, the time τ needed to reach 63% of the equilibrium extraction yield was chosen. This time corresponds to a time constant in the case of a first-order system with an exponential variation. Our experimental results showed a similar exponential trend in the decrease of 3-HP concentration, which made us think of the relevance of such a kinetics parameter τ .

RESULTS AND DISCUSSION

This work focused on study of the impact of three parameters on HFMC-assisted 3-HP reactive extraction: first, the influence of the extraction phase composition; then, the influence of the initial pH of the aqueous phase (between 3 and 7); and, finally, the influence of 3-HP concentration (between 0.5 and 2 g L⁻¹). Moreover, 3-HP reactive extraction on a real bioconversion broth was tested.

Influence of the TOA/Aliquat 336 ratio on 3-HP reactive extraction

Reactive extraction of 3-HP in a HFMC was performed using different ratios for the mixture of TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol. Results are reported in Fig. 2 and in Table 3 for numerical values of extraction yields (in %), K_D and τ (in min).

Figure 2 shows slight differences between the extraction kinetics at the tested ratio when TOA and Aliquat 336 were used together in *n*-decanol. Conversely, without Aliquat 336 (ratio of 20/0; Fig. 2), the kinetics of extraction was affected. Yields were quite close for

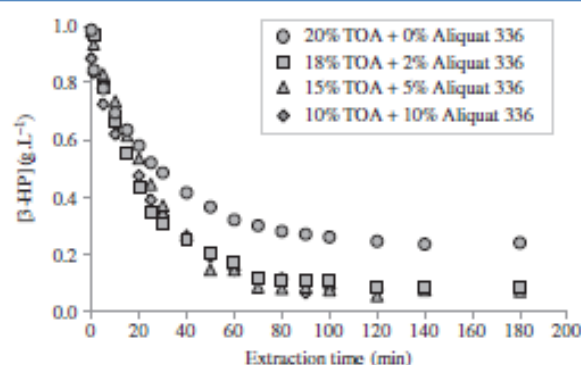


Figure 2. Influence of the extraction phase composition on the 3-HP (1 g L⁻¹, Initial pH of the aqueous phase = 3.2) reactive extraction kinetics in HFMC by TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol (80% v/v) at 25 °C.

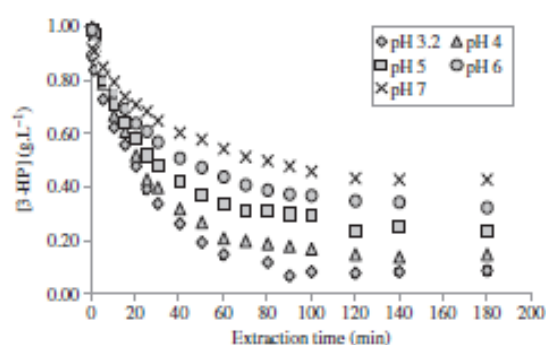
every condition using Aliquat 336 and TOA together (K_D between 10.2 and 13.0 and Y% between 91 and 93%, depending on the conditions; Table 3). On the contrary, when only TOA was used, only 75% of 3-HP was extracted ($K_D = 3.0$) in the organic phase (Fig. 2). This sheds light on the phenomenon of synergy that occurs with the two extractants used together, a phenomenon already reported in the literature for lactic acid.^{28,35} At this pH (3.2), given the pKa of 3-HP (4.51), the extraction mechanism involves mainly TOA which extracts the undissociated form of the acid. Therefore, TOA would play a leading role compared with Aliquat 336. τ decreased when increasing the use of Aliquat 336 (between 27.3 min and 18.6 min, for ratios of 20/0 and 10/10, respectively; Table 3). As a standard, 3-HP extraction was also performed using only *n*-decanol as the extractant phase. The results obtained (Table 3) showed a minor 3-HP extraction in the organic phase (11.65%), which corresponds to a very low distribution coefficient ($K_D = 0.13$). This physical extraction corresponds to the part of 3-HP extraction due only to its solubility in *n*-decanol. When the use of Aliquat 336 was increased, viscosity increased (11.54 mPa s with a 20/0 ratio to 15.03 mPa s with a 10/10 ratio; Table 1), which would normally increase the local mass transfer resistances. However, the opposite trend is observed (Fig. 2), underlining that a higher extraction yield could induce an increase of the kinetics in our system, as shown by D'Elia et al.³⁶ for a non reactive system. The use of a 10/10 TOA/Aliquat 336 ratio seemed to be preferable for the driven process (higher K_D and lower τ), but given the toxicity of Aliquat 336,³⁷ a ratio of 18/2 could be more interesting in terms of biocompatibility as opposed to ratios of 15/5 and 10/10. Thus, the use of corrosive and expensive Aliquat 336 should be reduced, a strategy that induces only a slight decrease in mass transfer performances. Given the importance of pH on the action mechanisms of each extractant, the influence of the initial pH of the medium was studied in order to better understand the observed synergy.

Influence of initial aqueous phase pH on 3-HP reactive extraction

HFMC-assisted reactive extraction of 3-HP at five different pH levels (3.2, 4, 5, 6 and 7) was performed using 10% TOA (v/v) and 10% Aliquat 336 (v/v) in *n*-decanol. Since the mechanisms of the actions of the two extractants used are quite different regarding the pH,²⁶ initial pH was tested over a large acidic range in order to study the extraction efficiency of the TOA/Aliquat 336 mixture ratio. Results are shown in Fig. 3 and in Table 3.

Table 3. Results of 3-HP reactive extraction assisted by hollow-fiber membrane contactor for the experimental conditions tested (n.d. = non determined)

	[3-HP] (g L ⁻¹)	Initial pH	TOA/Allquat 336 ratio (v/v)	Y%	K _D	τ (min)
Influence of TOA/Allquat 336 ratio	1.0	3.2	0/0	11.65	0.13	n.d.
	1.0	3.2	20/0	75.3 ± 0.4	3.04 ± 0.06	27.3 ± 0.4
	1.0	3.2	18/2	91.0 ± 0.1	10.16 ± 0.08	22.5 ± 0.5
	1.0	3.2	15/5	91.8 ± 0.1	11.25 ± 0.12	20.2 ± 0.4
	1.0	3.2	10/10	92.9 ± 0.1	13.00 ± 0.24	19.2 ± 0.4
Influence of Initial pH	1.0	3.2	10/10	92.9 ± 0.1	13.00 ± 0.24	19.2 ± 0.4
	1.0	4	10/10	85.0 ± 1.0	5.67 ± 0.68	24.4 ± 0.3
	1.0	5	10/10	75.8 ± 1.0	3.13 ± 0.24	27.6 ± 3.5
	1.0	6	10/10	67.2 ± 0.7	2.05 ± 0.06	32.6 ± 3.7
	1.0	7	10/10	53.3 ± 0.6	1.14 ± 0.08	47.7 ± 0.3
Influence of [3-HP]	0.5	3.4	10/10	94.7 ± 0.1	22.25 ± 0.35	17.2 ± 1.9
	1.0	3.2	10/10	92.9 ± 0.1	13.00 ± 0.24	19.2 ± 0.4
	2.0	3.1	10/10	89.9 ± 0.4	8.94 ± 0.37	28.8 ± 2.5
Bioconversion broth	1.5	4.5	18/2	62.5 ± 0.6	1.67 ± 0.08	30.0 ± 2.0


Figure 3. Influence of initial pH of the aqueous feed on the 3-HP (1 g L⁻¹) reactive extraction kinetics in HFMC by a mixture of TOA (10% v/v) and Aliquat 336 (10% v/v) in *n*-decanol (80% v/v) at 25 °C.

Concerning extraction kinetics, a ranking based on the initial pH of the aqueous phase was possible since it was better at low pH and decreased with increase of initial pH (Fig. 3). τ therefore increased with pH of the aqueous phase. For example, τ more than doubled between pH 3 and pH 7 (19.2 min for pH 3 and 47.7 min for pH 7; Table 3). Results also show a significant effect of the aqueous phase pH on the 3-HP reactive extraction yield since it was best at pH 3.2 (93% of 3-HP extracted in the organic phase; $K_D = 13.0$; Table 3) and lowest at pH 7 (only 53% of 3-HP extracted; $K_D = 1.14$; Table 3). Therefore, in order to maximize extraction performance, the use of low pH was better, with an extraction yield of 93% at pH 3.

In the range of pH tested, 3-HP reactive extraction was possible and favorable (distribution coefficient > 1). This is therefore very promising for carrying out *in situ* extraction from a bioconversion broth because it is necessary to maintain a constant pH value for an optimized glycerol bioconversion. The synergy between tertiary and quaternary amines for reactive extraction of organic acids has been studied^{22,23,28,36,38,39} and several hypotheses have been proposed for its action. The TOA action mechanism is based on an acid-base type reaction with the 3-HP, and extraction is therefore optimally effective at acidic pH levels of the targeted carboxylic acid. Conversely, Aliquat 336, which acts according to

an anion exchange mechanism, was found to be effective for the extraction of both the undissociated and dissociated forms, but preferentially the conjugate.^{26,37} The K_D obtained with Aliquat 336 alone was close to 0 throughout the range of pH tested (data not shown). Given that the K_D obtained in the case of mixed extractants was higher than the sum of the coefficients of individual extractants, and that mixed extractants give higher K_D at lower pH values, it can be assumed that the complex was principally formed between TOA and 3-HP and that the presence of Aliquat 336 favored 3-HP reactive extraction by TOA.²⁶ In this case, Aliquat 336 could therefore play the role of yield enhancer, for example, by promoting the binding between 3-HP and TOA and/or by stabilizing the complex formed.

Because of its toxicity¹³ and given the reported low levels of production starting from glycerol,^{7–9} a low 3-HP concentration is expected in the bioreactor. As a result, the influence of low acid concentrations on 3-HP reactive extraction was studied.

Influence of the initial aqueous phase concentration on 3-HP reactive extraction

HFMC-assisted reactive extraction of 3-HP at three different concentrations (0.5, 1 and 2 g L⁻¹, with initial pH levels of 3.4, 3.2 and 3.1, respectively; not adjusted) was performed using a mixture of 10% TOA (v/v) and 10% Aliquat 336 (v/v) in *n*-decanol. The three different initial 3-HP concentrations were chosen in the expected concentration range of bio-based 3-HP production. Results are reported in Fig. 4 and Table 3 for extraction yields, K_D , and τ values.

Figure 4 shows slight differences between the extraction kinetics at the tested 3-HP concentration. It appears from Table 3 that there was no significant difference between 0.5 and 1 g L⁻¹ of 3-HP initial concentration in terms of τ . τ was highest for 2 g L⁻¹ of 3-HP. Y% slightly decreased depending on the initial 3-HP concentration: 95%, 93% and 90% for 0.5, 1 and 2 g L⁻¹, respectively. K_D varied according to the same tendency (22.3, 13.0 and 8.93 for 0.5, 1 and 2 g L⁻¹, respectively). In this concentration range and given the equilibrium pH of the aqueous phase (between 3.1 and 3.4), 3-HP concentration has little effect on the recovery capacity of the organic phase tested and on the extraction kinetics. Even if most studies focused on higher acid concentration ranges, similar results were reported for lactic acid¹⁷ and propionic

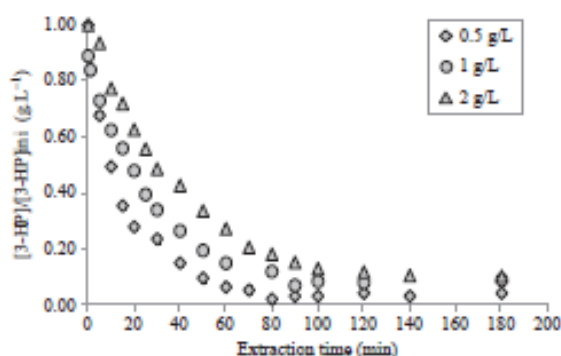


Figure 4. Influence of 3-HP concentration on its reactive extraction kinetics in HFMC by a mixture of TOA (10% v/v) and Aliquat 336 (10% v/v) in *n*-decanol (80% v/v) at 25 °C without pH adjustment.

acid²³ extraction using TOA as extractant at concentration levels equivalent to Fig. 4.

The observed differences in terms of K_D as a function of 3-HP concentration may be linked to a reduced excess of amines compared with 3-HP, even if they are in large excess in the medium. The molar stoichiometry shows a large excess of extractants (4.9% mol mol⁻¹ for TOA and 4.31% mol mol⁻¹ for Aliquat 336) with regard to the acid (0.01% mol mol⁻¹ at 0.5 g L⁻¹ up to 0.04% mol mol⁻¹ at 2 g L⁻¹). Moreover, the theoretical pH changes due to acid removal cannot explain such a trend. The pH increase between initial and equilibrium states was higher for the weakest acid concentrations, indicating that the theoretical equilibrium pH corresponding to the total acid concentration is higher for 0.5 g L⁻¹ (4.0) than for 1 (3.8) and 2 g L⁻¹ (3.6), which is contrary to the observed decrease of extraction yield with the initial 3-HP concentration.

3-HP reactive extraction on a real bioconversion broth

Reactive extraction of bio-based 3-HP from a 3-h bioconversion broth without initial pH adjustment (pH = 4.5) was performed inside a HFMC using a mixture of 18% TOA (v/v) and 2% Aliquat 336 (v/v) in *n*-decanol. This TOA/Aliquat 336 ratio was chosen in order to limit the use of quaternary amines in the extraction process because of its high viscosity, corrosiveness and toxicity. At the end of glycerol bioconversion, the medium contained residual glycerol at 1.32 g L⁻¹, the produced 3-HP at 1.51 g L⁻¹, the 3-HPA at 12.29 g L⁻¹ and the co-produced 1,3-PDO at 1.58 g L⁻¹. The bioconversion medium therefore displayed high buffering capacity since its pH is higher with 1.5 g L⁻¹ of 3-HP (pH = 4.5) than with only 1 g L⁻¹ of pure 3-HP in water (pH = 3.2). The results are illustrated in Fig. 5 and Table 3 for numerical values.

These results showed lower extraction on a real bioconversion broth than on model medium containing only 3-HP in water. Only 63.2% ($K_D = 1.67$) of 3-HP was extracted in the organic phase, compared with 85.0% ($K_D = 5.67$) for 1 g L⁻¹ at pH 4 and 75.8% ($K_D = 3.13$) at pH 5. Similar trends for the discrepancy between real and model solutions have been reported by Moussa et al.³² for 3-HP reactive extraction at equilibrium in separatory funnels. This experiment also highlighted the selectivity of the reactive extraction for 3-HP over the remaining molecules, as illustrated by the distribution coefficients obtained: 1.67, 0.04, 0.00 and 0.13 for 3-HP, glycerol, 1,3-PDO and 3-HPA, respectively; Fig. 5(b)), even if a little 3-HPA was also extracted in the organic phase (11.5%). The observed decrease in the extraction yield for the real bioconversion broth could not be explained by competition

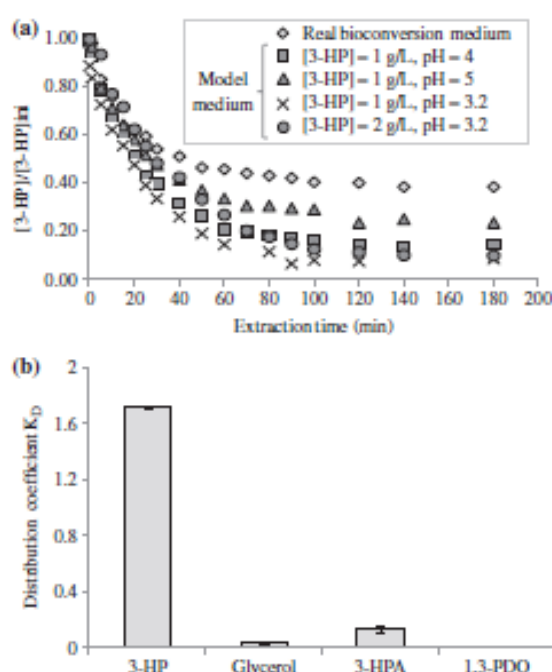


Figure 5. 3-HP reactive extraction from a 3-h bioconversion experiment using 18% w/v TOA and 2% w/v Aliquat 336 in 80% v/v *n*-decanol at 25 °C. Initial pH of the aqueous medium was 4.5 (at the end of bioconversion). (a) Relative [3-HP] evolution (ln g L⁻¹) in a bioconversion broth during the reactive extraction in a HFMC. Extraction kinetics on model solutions of 3-HP in water at pH 4 and 5 and at two different initial concentrations were used for comparison. (b) Distribution coefficient K_D of each molecule of the bioconversion broth.

for binding tertiary and quaternary amines in the organic phase. Indeed, it has been shown that the addition of glycerol, 3-HPA, 1,3-PDO in a model 3-HP solution did not decrease the extraction yield.³² However, a possible limitation of accessibility to amines due to biomolecule adsorption on the interface or intermolecular interactions may be considered. Pursell et al.⁴⁰ studied the effect of fermentation broth and biosurfactants on mass transfer during liquid-liquid extraction. They showed that only very low concentrations of proteins or phospholipid compounds in the broth were required to cause mass transfer reduction. These compounds were found to adsorb to the interface and to therefore reduce the overall mass transfer coefficient. Given that during glycerol bioconversion, *L. reuteri* cells are stressed and their physiological state is impacted,^{9,41} proteins and phospholipids were probably excreted in the broth, affecting 3-HP reactive extraction, even if cells had been previously eliminated by centrifugation. In addition, competition between 3-HP and some compounds that can be extracted by TOA and/or Aliquat 336 such as residual salts from cell washing by potassium phosphate buffer may lead to the decrease in 3-HP extraction performance from bioconversion broth. Some preliminary tests using Bradford titration and capillary electrophoresis revealed the presence of proteins and phosphates that can interfere with 3-HP reactive extraction in the bioconversion broth.

CONCLUSIONS

The membrane assisted reactive extraction of 3-HP from model solutions and a real bioconversion broth was examined using a

mixed extractant composed of Aliquat 336 and TOA in *n*-decanol. This work underlined the strong impact of the pH of the aqueous phase on the process efficiency. Contrary to the initial pH of the aqueous phase, the acid concentration (at a pH of around 3) and the ratio of amines used had less influence on 3-HP reactive extraction yields. The best extraction performances were obtained with a mixture of 10% Aliquat 336 and 10% TOA in 80% *n*-decanol, at the lowest pH of the aqueous phase and low 3-HP concentration levels. The presence of compounds of the bioconversion broth such as proteins or lipids affected the kinetics of 3-HP extraction in the organic phase through higher values of the τ . A lower extraction rate was also observed (only 63% in the real bioconversion broth compared with around 80% in a model medium for the same conditions; Fig. 5 and Table 3), probably due to residual salts in competition with 3-HP to be extracted by TOA and Aliquat 336. However, 3-HP was predominantly extracted from the bioconversion broth, confirming the high selectivity of the extraction process studied and the high potential of this ISPR approach for the biotechnological production of 3-HP. A major advantage of reactive extraction in favor of its implementation in an ISPR plant is the opportunity it offers to back-extract and recover the acid in an aqueous phase and to regenerate and recycle the extractant to the extraction unit for further extraction in a relatively easy manner.⁴ The most general approach for regeneration is known as the swing process in which certain factors such as temperature, diluent composition or pH are altered so as to promote the back-extraction of a carboxylic acid from the organic phase into an aqueous phase.^{4,26,42} A screening of various inorganic and organic compounds for back-extraction such as hydroxide and carbonate salts or trimethylamine, for example, would also have to be carried out in order to evaluate their stripping power towards 3-HP. In addition, the impact of the organic phase on the bacterial physiological state has to be studied before integrating a biotechnological 3-HP production step and *in situ* product recovery by reactive extraction using HFMC, since TOA and Aliquat 336 have been described as potentially toxic for several microorganisms.^{16,37}

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ana-Karen Sánchez Castañeda for technical assistance, Gail Wagman for proofreading and correcting the English version of the manuscript and they are grateful to the Region Champagne-Ardenne, the Conseil Général de la Marne and Reims Métropole for their financial support.

REFERENCES

- 1 Smithers-Rapra. 2011. *Ten-Year Forecast of Disruptive Technologies in Industrial Biotechnology to 2021*.
- 2 van Maris AJA, Konings WN, van Dijken JP and Pronk JT. Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: Implications for industrial fermentation processes. *Metabol Eng* **6**:245–255 (2004).
- 3 Straathof AJJ. Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. *Chem Rev* **114**:1871–1908 (2014).
- 4 Hong YK, Hong WH and Han DH. Application of reactive extraction to recovery of carboxylic acids. *Biotechnol Bioproc Eng* **6**:386–394 (2001).
- 5 Della Pina C, Falletta E and Rossi M. A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid. *Green Chem* **13**:1624–1632 (2011).
- 6 Luo LH, Seo JW, Baek JO, Oh BR, Heo S, Hong WK *et al*. Identification and characterization of the propanediol utilization protein PduP of *Lactobacillus reuteri* for 3-hydroxypropanoic acid production from glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**:697–703 (2011).
- 7 Kumar V, Ashok S and Park S. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropanoic acid. *Biotechnol Adv* **31**:945–961 (2013).

- 8 Dishisha T, Pereyra LP, Pyo SH, Britton RA and Hatti-Kaul RH. Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropanaldehyde, 3-hydroxypropanoic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microbiol Cell Factory* **13**:76–85 (2014).
- 9 Burgé G, Saulou-Bérion C, Moussa M, Pollet B, Flourat A, Allais F *et al*. Diversity of *Lactobacillus reuteri* strains in converting glycerol into 3-hydroxypropanoic acid. *Appl Biochem Biotechnol* **177**:923–939 (2015).
- 10 Cleusis V, Lacroix C, Vollenwelder S and Le Blay G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol* **7**:101–109 (2007).
- 11 Spinler, JK, Taweechoitpatr M, Rognerud CL, Oub CN, Tumwasom S and Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* **14**:166–171 (2008).
- 12 Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B and Britton RA. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropanaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology* **156**:1589–1599 (2010).
- 13 Sebastianes FLS, Cabedo N, El Aouad N, Valente AMMP, Lacava PT, Azevedo JL *et al*. 3-Hydroxypropanoic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. *Curr Microbiol* **65**:622–632 (2012).
- 14 Meng X, Tsobanakis P, Malsam J and Abraham TW. Process for preparing carboxylic acids and derivatives thereof. I. Cargill. United States. US patent 7,186,856 B2 (2007).
- 15 Marx A, Wendisch VF and Rittmann D. Microbiological production of 3-hydroxypropanoic acid. United States. US patent 2009/0325248 A1 (2009).
- 16 Choudhury B, Basha A and Swaminathan T. Study of lactic acid extraction with higher molecular weight aliphatic amines. *J Chem Technol Biotechnol* **72**:111–116 (1998).
- 17 Wasewar KL, Heesink ABM, Versteeg GF and Pangarkar VG. Equilibria and kinetics for reactive extraction of lactic acid using Alamine 336 in decanol. *J Chem Technol Biotechnol* **77**:1068–1075 (2002).
- 18 Matsumoto M, Takahashi T and Fukushima K. Synergistic extraction of lactic acid with alkylamine and tri-*n*-butylphosphate: effects of amines, diluents and temperature. *Sep Purif Technol* **33**:89–93 (2003).
- 19 Kyuchoukov G and Yankov D. Lactic acid extraction by means of long chain tertiary amines: a comparative theoretical and experimental study. *Ind Eng Chem Res* **51**:9117–9122 (2012).
- 20 Krzyzanlak A, Leeman M, Vossebeeld F, Visser TJ, Schuur B and de Haan AB. Novel extractants for the recovery of fermentation derived lactic acid. *Sep Purif Technol* **111**:82–89 (2013).
- 21 Coelho IM, Silvestre P, Viegas RMC, Crespo J and Carrondo MJT. Membrane-based solvent extraction and stripping of lactate in hollow-fiber contactors. *J Membr Sci* **134**:19–32 (1997).
- 22 Harrington T and Hossain MM. Extraction of lactic acid into sunflower oil and its recovery into an aqueous solution. *Desalination* **218**:287–296 (2008).
- 23 Keshav A, Wasewar KL and Chand S. Extraction of propanoic acid using different extractants (tri-*n*-butylphosphate, tri-*n*-octylamine, and Aliquat 336). *Ind Eng Chem Res* **47**:6192–6196 (2008).
- 24 Drioli E, Criscuolo A and Curcio E. *Membrane Contactors: Fundamentals, Applications and Potentialities*. Elsevier, Amsterdam (2006).
- 25 Gabelman A and Hwang ST. Hollow fiber membrane contactors. *J Membr Sci* **159**:61–106 (1999).
- 26 Wasewar KL, Yawaikar AA, Moullin JA and Pangarkar VG. Fermentation of glucose to lactic acid coupled with reactive extraction: a review. *Ind Eng Chem Res* **43**:5969–5982 (2004).
- 27 Yankov D, Mollner J, Albet J, Malmay G and Kyuchoukov G. Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri-*n*-octylamine dissolved in decanol and dodecane. *Biochem Eng J* **21**:63–71 (2004).
- 28 Yankov D, Mollner J, Kyuchoukov G, Albet J and Malmay G. Improvement of the lactic acid extraction. Extraction from aqueous solutions and simulated fermentation broth by means of mixed extractant and TOA, partially loaded with HCl. *Chem Biochem Eng Quart* **19**:17–24 (2005).
- 29 Kertes AS and King CJ. Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. *Biotechnol Bioeng* **28**:269–282 (1986).
- 30 Tamada JA, Kertes AS and King CJ. Extraction of carboxylic acids with amine extractants. 1. Equilibria and law of mass-action modelling. *Ind Eng Chem Res* **29**:1319–1326 (1990a).

- 31 Tamada JA and King CJ, Extraction of carboxylic acids with amine extractants. 2. Chemical Interactions and Interpretation of data. *Ind Eng Chem Res* **29**:327–1333 (1990b).
- 32 Moussa M, Burgé G, Chemarin F, Bounader R, Saulou-Bérion C, Allais F et al, Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid. *J Chem Technol Biotechnol* DOI: 10.1002/jctb.4813 (2015).
- 33 Tong YP, Hirata M, Takanashi H, Hano T, Kubota F, Goto M et al, Extraction of lactic acid from fermented broth with microporous hollow fiber membranes. *J Membr Sci* **143**:81–91 (1998).
- 34 Galaction AI, Kloetzer L and Cascaval D, Influence of solvent polarity on the mechanism and efficiency of formic acid reactive extraction with tri-n-octylamine from aqueous solutions. *Chem Eng Technol* **34**:1341–1346 (2011).
- 35 Kyuchoukov G, Marinova M, Mollnler J, Albet J and Malmay G, Extraction of lactic acid by means of a mixed extractant. *Ind Eng Chem Res* **40**:5635–5639 (2001).
- 36 D'Elia NA, Dahuron L and Cussler EL, Liquid–liquid extractions with microporous hollow fibers. *J Membr Sci* **29**:309–319 (1986).
- 37 Seevaratnam SJ, Holst O, Hjörlieffsdóttir S and Mattiasson B, Extractive bioconversion for lactic acid production using solid sorbent and organic solvent. *Bioprocess Eng* **6**:35–41 (1991).
- 38 Hossain MM and Malsuria JL, Effects of organic phase, fermentation media, and operating conditions on lactic acid extraction. *Biotechnol Prog* **24**:757–765 (2008).
- 39 Marinova M, Albet JL, Mollnler J and Kyuchoukov G, Specific influence of the modifier (1-decanol) on the extraction of tartaric acid by different extractants. *Ind Eng Chem Res* **44**:6534–6538 (2005).
- 40 Pursell MR, Mendes-Tatals MA and Stuckey DC, Effect of fermentation broth and biosurfactants on mass transfer during liquid–liquid extraction. *Biotechnol Bioeng* **85**:156–165 (2004).
- 41 Doleyres Y, Beck P, Vollenwelder S and Lacroix C, Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**:467–474 (2005).
- 42 Tong YP, Hirata M, Takanashi H and Hano T, Back extraction of lactic acid with microporous hollow fiber membrane. *J Membr Sci* **157**:189–198 (1999).

2.2.3 Conclusion et perspectives de l'étude

La mise en œuvre de l'extraction réactive liquide-liquide du 3-HP en contacteur membranaire a été réalisée en milieu modèle et réel de bioconversion et l'influence de différents paramètres tels que le pH du milieu, la concentration en acide et la composition de la phase organique extractante a été étudiée. Concernant le pH, même si les résultats obtenus montrent un coefficient de transfert et un coefficient de distribution plus élevés, ainsi qu'une constante de temps plus faible à pH acide, l'extraction du 3-HP est tout de même possible sur une large gamme de pH, ce qui la rend compatible avec des conditions de bioconversion (pH 5-6). La récupération de la molécule d'intérêt est également favorable sur la gamme de concentration testée (entre 0,5 et 2g.L⁻¹) et attendue lors de la bioconversion du glycérol en 3-HP.

Ce travail a également permis de souligner le potentiel de l'ERCM comme procédé de séparation performant pour l'extraction sélective *in situ* de l'acide 3-HP, même si son extraction en milieu réel de bioconversion a montré des performances plus faibles qu'en milieu modèle. La présence de composés cellulaires pourrait expliquer en partie cette diminution des performances. Ainsi, la baisse du coefficient de transfert de matière pourrait s'expliquer par la présence éventuelle de protéines excrétées par les bactéries dans le milieu aqueux, et qui s'adsorbent au niveau de la membrane du contacteur en raison de leur caractère tensioactif. De même, la baisse du rendement d'extraction serait liée à la présence dans le milieu de sels, issus du lavage au moment de la récolte des cellules après la phase de croissance et qui pourraient être extraits aux dépens du 3-HP (compétition moléculaire). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses et augmenter les performances d'extraction en milieu réel de bioconversion. Un changement du protocole de lavage, qui utilise du tampon PPB générateur de sels, est ainsi envisagé, de même que la mise en place d'une étape de filtration du milieu de bioconversion pour éliminer les macromolécules.

Suite à la mise au point du procédé d'extraction du 3-HP en milieux modèles et réels de bioconversion, cette étape va être couplée à la production du 3-HP par *L. reuteri* en bioréacteur pour parvenir à un procédé intégré. Cette phase du travail permettra ainsi d'étudier les interrelations entre la bioconversion et la séparation. Néanmoins, la biocompatibilité de la phase organique extractante vis-à-vis des bactéries productrices doit être évaluée avant les premiers tests d'intégration des deux procédés.

3 – Intégration de la production par voie microbienne et de l'extraction réactive *in situ* du 3-HP

3.1 Contexte et objectifs de l'étude

Les études précédemment réalisées sur la production de 3-HP par voie microbienne à partir de glycérol ont confirmé l'intérêt de *L. reuteri* en tant que micro-organisme producteur. Malgré une mise en œuvre en bioréacteur et un apport contrôlé du substrat, les performances de production demeurent insuffisantes pour envisager un changement d'échelle. En effet, la forte inhibition générée par le 3-HPA et, dans une moindre mesure, le 3-HP, conduisent à des productivité, rendement et titre encore trop faibles (Burgé *et al.* 2015b). L'intégration des étapes de bioconversion et d'extraction constitue une stratégie innovante pour lever les inhibitions dues au 3-HP et optimiser les performances de production. Cette approche intégrée a fait ses preuves dans le cas de l'extraction d'autres acides organiques d'intérêt (acide lactique, Xavier *et al.* 1995 ; acide propionique, Jin and Yang 1998 ; acide butyrique, Wu and Yang 2003), diminuant la toxicité pour les bactéries productrices et augmentant les performances globales du procédé.

Parmi les différentes techniques de séparation compatibles avec l'ISPR, ainsi qu'avec la production microbienne d'un acide organique soluble, hydrophile et non volatil, l'extraction liquide-liquide réactive assistée par contacteur à membrane semble prometteuse (Coelhos *et al.* 1997, Choudhury *et al.* 1998, Harington and Hossain 2008, Kyuchoukov and Yankov 2012). Récemment (Moussa *et al.* 2015, Burgé *et al.* 2016), il a été montré que l'extraction réactive du 3-HP en contacteur à membrane était possible et favorable sur une large gamme de pH et de concentrations en acide. Une phase organique composée de TOA et d'Aliquat 336 dans du *n*-décaneol conduisait ainsi aux meilleures performances (rendement d'extraction et coefficient global de transfert de matière). Néanmoins, la biocompatibilité de cette phase organique extractante, et notamment l'impact de la fraction soluble de celle-ci, doit être évaluée avant les premiers tests d'intégration des deux procédés.

Ces travaux concernent la mise en place la bioconversion extractive du 3-HP, l'évaluation des performances générales de celle-ci et l'étude de l'impact de ce procédé intégré sur l'état physiologique de *L. reuteri*. Ils sont présentés sous la forme d'un projet de publication, en cours de rédaction, qui sera complété puis soumis ultérieurement.

3.2 3-hydroxypropionic acid extractive bioconversion: study of inhibition phenomena during glycerol bioconversion, membrane assisted reactive extraction and their integrated process

Projet de publication en cours de rédaction

Résumé :

Les performances de production d'acide 3-hydroxypropionique (3-HP) par *Lactobacillus reuteri* à partir du glycérol sont limitées (faibles productivité, rendement et concentration finale). Cela est dû, au moins en partie, à l'inhibition des bactéries productrices par le 3-HP et son intermédiaire métabolique, le 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA). Afin d'optimiser cette production, l'extraction réactive assistée par contacteur membranaire du 3-HP, *in situ*, depuis le milieu de bioconversion, a été mise en œuvre et l'impact de cette bioconversion extractive sur les performances générales du procédé (concentration finale en 3-HP et rendements de production, cinétique et rendement d'extraction) et sur l'état physiologique des bactéries a été étudié. A des fins de comparaison avec le procédé intégré, différentes conditions opératoires ont également été testées pour l'étape de bioconversion d'une part et pour le procédé d'extraction d'autre part.

Les résultats ne montrent pas d'amélioration de la quantité de 3-HP produit en comparaison à la bioconversion réalisée sans extraction *in situ*, en raison d'une forte altération de l'état physiologique (activité enzymatique, intégrité membranaire) des bactéries productrices. Un aspect cumulatif des différents stress rencontrés au sein du procédé intégré (impact du 3-HP et du 3-HPA produits, impact de la fraction soluble de la phase organique, impact de la circulation des cellules dans le module) a ainsi pu être mis en évidence. La forte toxicité observée est cependant principalement liée à la phase extractante utilisée (tri-octylamine diluée dans du *n*-décanol) et à son contact direct avec les bactéries, malgré l'utilisation d'un contacteur à membrane. L'existence de pores de grande taille, supérieure à celle indiquée par le fournisseur, est notamment suspectée.

3-hydroxypropionic acid extractive bioconversion: study of inhibition phenomena during glycerol bioconversion, membrane assisted reactive extraction and their integrated process

G. Burgé^{1,2}, M. Moussa², C. Saulou-Bérion², F. Chemarin^{1,2}, M. Kniest², F. Allais^{1,2}, V. Athès², H.E. Spinnler^{2*}

¹ Chaire Agro-Biotechnologies Industrielles (ABI) - AgroParisTech, 247 rue Paul Vaillant Couturier, F-51100 Reims, France

² UMR GMPA AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, bâtiment CBAI, 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

* **Corresponding author: H.E. Spinnler**, Tel: +33 1 30 81 53 87. Fax: +33 1 30 81 55 97.

E-mail address: eric.spinnler@agroparistech.fr

Abstract

3-hydroxypropionic acid (3-HP) microbial production by *Lactobacillus reuteri* through glycerol bioconversion is limited because of low productivity, low product yield and low product concentration. This can be, at least in part, attributed to the microbial inhibition by 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) and 3-HP. In order to optimize its production, 3-HP *in situ* reactive extraction from bioconversion broth was investigated using hollow fiber membrane contactor (HFMC) and the so-called integrated system was compared with the conventional bioconversion system. Various operating conditions of bioconversion and reactive extraction were tested separately to assess their performances. The impact of the extractive bioconversion on the overall performance and on bacteria physiological state was studied. Results did not provide high 3-HP production relative to bioconversion without extraction, but underlined a drastic inhibition of producing bacteria. The origin of this toxicity was studied and discussed. The extractant phase (TOA in *n*-decanol) was found to be toxic to free cells in suspension, mainly because of an important phase level toxicity despite the use of a HFMC to avoid direct contact between organic phase and bacteria.

Keywords

3-hydroxypropionic acid (3-HP), *Lactobacillus reuteri*, *In Situ* Product Recovery (ISPR), Hollow Fiber Membrane Contactor (HFMC), biocompatibility

Introduction

3-hydroxypropionic acid (3-HP) is a promising building block molecule with many applications mainly in chemical industry, for example for (co)-polymerization and production of commercially valuable chemicals such as acrylic acid, 1,3-propanediol (1,3-PDO), malonic acid and acrylamide (Smithers-Rapra, 2011). 3-HP can also be used as a crosslinking agent for polymer coatings, metal lubricants, and antistatic agents for textiles (Gokarn *et al.* 2002). Currently, 3-HP is exclusively synthesized via chemical pathways. Despite its promising and diverse applications, the production of 3-HP remains currently of limited usage due to the low yield and high production cost (Della Pina *et al.* 2011). Some studies have demonstrated that a few microorganisms, including the Gram-positive probiotic *Lactobacillus reuteri*, are able to produce 3-HP by glycerol bioconversion (Luo *et al.* 2011, Dishisha *et al.* 2014). Currently, there is an increasing interest in the biotechnological production of this acid from biomass, principally starting from glycerol and using recombinant strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (Jiang *et al.* 2009, Kumar *et al.* 2013, Valdehuesa *et al.* 2013). Nevertheless, this production is limited by low productivity, low product yield and final concentration. These limitations can be at least in part attributed to the fact that bacteria are strongly inhibited by the metabolic intermediate 3-hydroxypropionaldehyde, 3-HPA, (Cleusix *et al.* 2007, Schaefer *et al.* 2010, Burgé *et al.* 2015a), and the 3-HP, especially when the pH is below the pKa of the acid (Burgé *et al.* 2015a).

Even though there have been many attempts to increase 3-HP yield and production rate through the development of engineered bacterial strains, only few studies focused on the set up of new processes. The implementation of an “*in situ* product recovery” (ISPR), by which upstream bioconversion is combined with downstream extraction and 3-HP recovery, is a potential strategy i) to reduce the inhibitory stress associated with 3-HPA and 3-HP accumulation, ii) to increase the performance of the microbial cells and iii) to recover the molecule of interest. This strategy, also called extractive bioconversion, has been shown to be advantageous for organic acid production such as lactic acid (2-hydroxypropionic acid, positional isomer of 3-HP; Ataei and Vasheghani-Farahani, 2008, Boontawan *et al.* 2011, Xu and Xu, 2014), propionic acid (Jin and Yang, 1998), butyric acid (Wu and Yang, 2003, Peterson and Daugulis, 2014) and succinic acid (Meynial-Salles *et al.* 2008, Li *et al.* 2011) leading to significantly improve productivity, product yield and concentration. Several techniques have been described for the *in situ* extraction of carboxylic acids. Among these techniques, the reactive liquid-liquid reactive extraction of lactic acid potentially coupled with

the use of membrane contactors have been studied (Coelhoso *et al.* 1997, Huang *et al.* 2004, Harington and Hossain, 2008). In previous works, we demonstrated the feasibility of the reactive extraction of 3-HP from real bioconversion media (Moussa *et al.* 2015; Burgé *et al.* 2016).

In reactive extraction, the aqueous phase containing the acid is brought into contact with an organic phase containing a selective amine as extractant. The direct and dispersive contact between the two phases can be avoided by using a membrane contactor (Fernandes *et al.* 2003, Sirkar 2008, Bringas *et al.* 2013). Nevertheless, the use of solvents can give rise to a series of physical, microbial, and biochemical effects on the cellular activity (Yabannavar and Wang, 1991). Toxicity of organic solvents and even extractants constitutes a critical problem in extractive bioconversion. The toxicity level depends on the combination of microbe and extractant mixture used (Matsumoto *et al.* 2004). Two distinct kinds of toxicity linked to the use of organic solvents have been described: the toxicity due to dissolved organic molecules (molecular toxicity) and that due to the presence of a separate organic phase (phase toxicity) (Bar and Gainer 1987, Bar 1988, Choudhury *et al.* 1998). To reduce the solvent toxicity and particularly the phase level toxicity, the use of nanoporous membranes has been provided to prevent direct contact of the extractant phase with the cells inside broth (Ye *et al.* 1996, Fernandes *et al.* 2003), while allowing liquid-liquid contact. Other strategies have been developed to avoid solvent toxicity, such as the use of immobilized cells (Trauth *et al.* 2001, Tik *et al.* 2001) or biocompatible solvents (oleyl alcohol, Marinova and Yankov, 2009; soybean oil, Yabannavar and Wang, 1991; paraffin oil, Seevaratnam *et al.* 1991).

The objective of this work was to study an extractive bioconversion process for 3-HP production from glycerol by *L. reuteri* based on reactive liquid-liquid extraction assisted by a hollow fiber membrane contactor (HFMC) and to study the impact of the so-called integrated process on the physiological state of the producing bacteria. The process performance, in terms of productivity, production yield and final product concentration was studied and compared to the conventional bioconversion process without extraction. Molecular level and phase level toxicity of the extractant phase used were also studied and discussed.

Materials and methods

Microorganisms and culture conditions

L. reuteri DSM 17938 was obtained from BioGaia AB (Stockholm, Sweden). All solutions and media in contact with *L. reuteri* were autoclaved at 110 °C for 20 min. Inoculum was performed anaerobically in batch mode at 37 °C in MRS medium (Biokar diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 20 g.L⁻¹ of glucose (initial pH = 6.2) and inoculated at an initial cell concentration of around 10⁹ CFU.mL⁻¹ with a first preculture performed in MRS for 16 h. The resulting culture was used to inoculate the bioreactor.

Production of the whole-cell biocatalyst for biotransformation of glycerol

L. reuteri cells were grown in a 5-L bioreactor (Setric Génie Industriel, Toulouse, France) containing MRS medium supplemented with 20 g.L⁻¹ of glucose and inoculated at a cell concentration of around 10⁵ CFU.mL⁻¹. Monitoring and control of the operating parameters were done through a control unit. Stirring speed was maintained at 100 rpm, temperature at 37 °C and pH at 6 by addition of 10N KOH. The cellular growth was conducted for 16 h until the beginning of the stationary phase after which the broth was collected and centrifuged at 5000 x g and 4 °C for 10 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was washed twice with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) to ensure no carry-over of metabolites, re-suspended in 500 mL of distilled water and used subsequently for the glycerol bioconversion step.

Batch production of 3-HP from glycerol using L. reuteri

A 3-L Biostat®-A bioreactor (Sartorius France, Dourdan, France) with a 2.5-L working volume was used. First, the 500 mL of *L. reuteri* cell suspension obtained as described above was suspended in 2.0 L of glycerol solution (final glycerol concentration of 18.2 g.L⁻¹ in sterilized water) to a final OD_{600 nm} of 12 (around 10¹⁰ CFU.mL⁻¹). Glycerol bioconversion was performed at 37 °C, 100 rpm and different pH levels (unregulated, 3, 4, 5 and 6) by addition of 10N KOH and 5N HCl. Samples were harvested each 30 min and immediately treated for the analyses described below. The experiment was stopped after 3 h.

HFMC assisted reactive extraction of 3-HP

A polypropylene hollow fiber membrane contactor was used (X50 Liqui-Cel® 2.5×8, Membrana, USA). The aqueous and organic phases were placed in separate reservoirs and their temperature was maintained at 25 °C using a water bath. The aqueous phase was fed

through the fiber lumens with a flow rate of $10 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$, and the organic phase crossed counter-currently through the shell side of the vertical module with a flow rate of $13 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$. The pressure difference across the membrane was adjusted by two valves at the outlets of each phase, with the lumen side pressure being higher than that of the shell side to prevent solvent breakthrough. For trials of 3-HP extraction from model solutions, those later were prepared from a commercial mother solution (TCI-Europe, 30% w/w 3-HP solution in water). The pH values were measured using a Jenco vision 6071 pH meter. Concerning organic phases, and except the use of *n*-decanol alone, two different ratios of amines in *n*-decanol (80% v/v) were used: 20% v/v TOA (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and 18% v/v TOA + 2% v/v Aliquat 336 (Sigma-Aldrich, Lyon, France) according to previous work (Moussa *et al.* 2015, Burgé *et al.* 2016).

Integrated system for simultaneous bioconversion-reactive extraction of 3-HP

Figure 1 illustrates the process and apparatus used in this study. The experimental set-up core consisted in two parts: a 3-L Biostat®-A bioreactor (Sartorius France, Dourdan, France) with temperature and pH controls for free cells glycerol bioconversion and a hollow-fiber membrane contactor (Liqui-Cel® X50, Membrana, USA) for 3-HP reactive extraction. The bioconversion broth, containing the cells, was fed to the lumen side of the HFMC and circulated back to the bioreactor. The pH regulation system through adding base to the bioreactor was not activated since the initial pH was supposed to remain stable thanks to the continuous extraction of 3-HP from the broth. Temperature was regulated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Two consecutive batch extractive bioconversions were performed to test the process performances. Experiments were carried out with 2.5 L of bioconversion medium as aqueous phase and 500 mL of solvent with extractants (20% TOA in *n*-decanol) as organic phase. The process was started by introducing 500 mL of the fermentation broth containing stationary-phase cells to the bioreactor. Samples were taken from both the bioreactor and the organic phase reservoir at regular time intervals of 15 min.

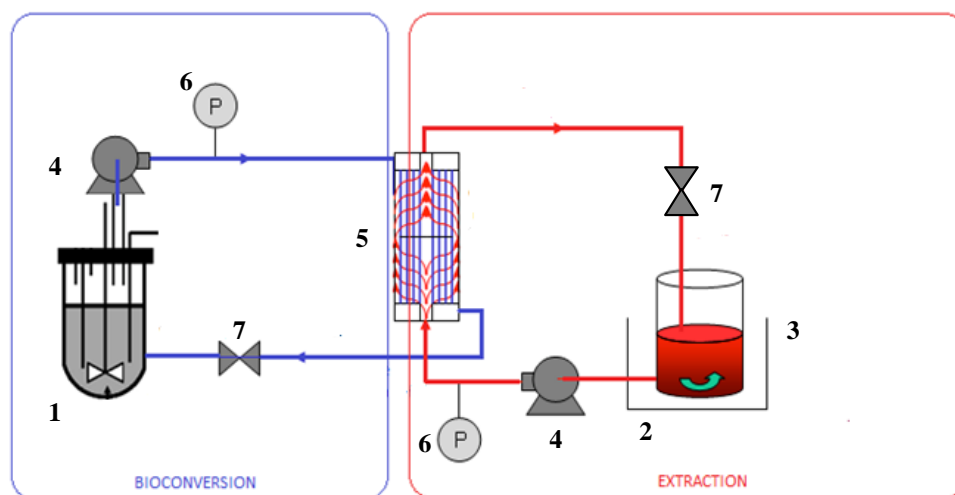


Figure 1. Experimental setup for the integrated process coupling 3-HP microbial production and *in situ* reactive extraction using a HFMC. 1. Bioconversion bioreactor; 2. Organic phase reservoir; 3. Heated bath; 4. Gear pumps; 5. Hollow-fiber membrane contactor; 6. Manometers; 7. Pressure regulating valves.

Evaluation of the cell's physiological state by flow cytometry

The viability of *L. reuteri*, as reflected by the esterase activity, itself assimilated to the whole enzymatic activity, was assessed by using carboxyfluorescein diacetate (cFDA) contained in Chemchrom V8 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). The nucleic acid dye propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, Lyon, France), widely used to reveal the loss of cellular membrane integrity, made it possible to quantify the proportion of damaged and dead cells. In order to differentiate viable, dead and damaged cells, dual staining of each sample was performed and the counts and percentages of each cell category were quantified, as described in a previous study (Burgé *et al.* 2015a).

Quantitative analysis of substrates and metabolites

Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). 3-HP was purchased from TCI-Europe (Zwyndrecht, Belgium). 3-HPA was chemically synthesized in our laboratory as described previously (Burgé *et al.* 2015b). Residual glycerol, 3-HPA, 3-HP and 1,3-PDO were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Biorad Aminex HPX-87H column (300 mm x 7.8 mm; Biorad, Richmond, USA) equipped with a cation H⁺ Micro-Guard column (30 mm x 4.6 mm; Biorad) at a controlled temperature of 50 °C. All quantifications were expressed as the means ± standard errors of two independent experiments.

Assessment of inhibitory effects on L. reuteri

- Effect of the produced metabolites

L. reuteri DSM 17938 cells were suspended in aqueous solutions of 3-HP (2.5 g.L⁻¹), 3-HPA (5 g.L⁻¹) and 1,3-PDO (2.5 g.L⁻¹) during 30 min and 3 h, before evaluation of their enzymatic activity and membrane integrity by flow cytometry. In the case of 3-HP, two different pH levels were tested: pH 3 (equilibrium pH of the solution at 2.5 g.L⁻¹) and a pH adjusted at 5 with KOH 5 N.

- Shear stress

The aqueous phase containing *L. reuteri* cells at an OD_{600 nm} of 12 (around 10¹⁰ CFU.mL⁻¹) was fed through the fibers lumen in the membrane contactor. The transmembrane pressure was equilibrated using distilled water circulating counter-currently through the shell-side of the module. Samples were collected each 15 min for 3 h and subsequently prepared for the evaluation of the cell physiological state by flow cytometry.

- Molecular level toxicity

Stock solutions of distilled water equilibrated with the different tested organic phases were first prepared. To this end, the aqueous and organic phases were vigorously mixed in separatory funnels for 3 min. The mixture was placed at 37 °C for 2 days. Then, the content of each separatory funnel was centrifuged at 5000 x g and 4 °C for 10 min to separate aqueous and organic phases. *L. reuteri* cells at an OD_{600 nm} of 12 (around 10¹⁰ CFU.mL⁻¹) were re-suspended in the aqueous phases and placed at 37 °C. Samples were collected each 15 min for 3 h and bacteria physiological state was evaluated by flow cytometry.

- Phase level toxicity

Experiments were performed to examine the effect of direct contact between the free cells and the organic phase. Equal volumes (80 mL) of suspended *L. reuteri* cells (OD_{600 nm} = 12) and organic phase were contacted in a 250 mL Schott bottle at 37 °C. The aqueous phase was then gently stirred using a magnetic stirrer to renew the interface without causing dispersive mixture of the two phases. Samples of the aqueous phase were collected each 15 min for 3 h for flow cytometry analyses. In a second set of experiments, the phase level toxicity was assessed using the membrane contactor by circulating the aqueous cell suspension into the lumen side of the HFMC while *n*-decanol alone or *n*-decanol (80% v/v) +

TOA (20% v/v) circulated through the shell side. Temperature was regulated at 37 °C. The cellular physiological state was evaluated as indicated previously.

Results and discussion

Influence of pH on bioconversion performances and L. reuteri physiological state

Previous works (Moussa *et al.* 2015, Burgé *et al.* 2016) have shown that pH of the aqueous phase played a significant role in the 3-HP reactive extraction by TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol. Indeed, the global mass transfer coefficient and the extraction yield decreased when the pH increased, because of the expected mechanisms of extraction of these two extractants. Before implementing the bioconversion with the separation process, the influence of pH on bioconversion performances and *L. reuteri* physiological state was studied (Fig. 2).

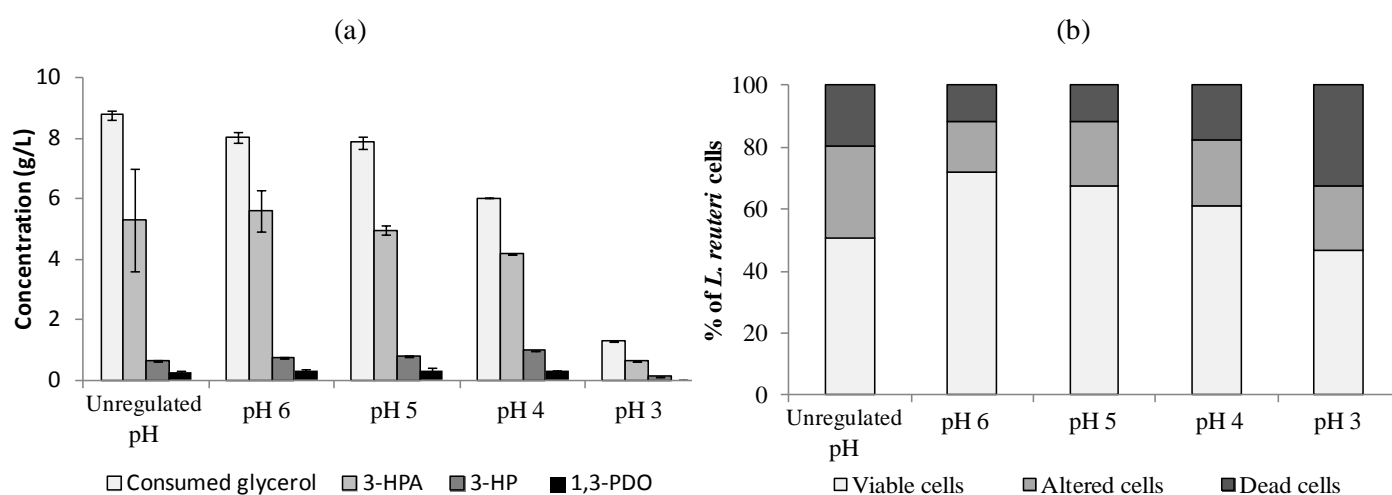


Figure 2. Influence of pH (a) on bioconversion performances and (b) on *L. reuteri* physiological state after 2 h of glycerol bioconversion. Reported data correspond to the mean values of measurements from two independent experiments, except for physiological state study (only one experiment).

Figure 2 displays the influence of different pH levels (unregulated, 3, 4, 5 and 6) on glycerol consumption, metabolites production and physiological state of *L. reuteri* DSM 17938. At pH 3, only little glycerol (1.28 g.L⁻¹) was consumed and few 3-HPA (0.64 g.L⁻¹) and 3-HP (0.12 g.L⁻¹) were produced (Fig. 2a). 1,3-PDO was not detected in the medium. In parallel, *L. reuteri* physiological state was impacted, as only 46% of the cells were detected as viable after 3 h of bioconversion (Fig. 2b). By increasing the pH of the bioconversion medium, results showed an increase of the quantity of glycerol consumed (6.02, 7.86 and 8.04 g.L⁻¹ at pH 4, 5 and 6, respectively, Fig. 2a) and 3-HPA produced (4.16, 4.95 and 5.58 g.L⁻¹ at pH 4, 5 and 6, respectively, Fig. 2a) together with a decrease of the impact on physiological

state of producing bacteria (61%, 68% and 72% of viable cells at pH 4, 5 and 6, respectively, Fig. 2b). At unregulated pH (initial pH = 6, final pH = 4.5), glycerol consumption (8.76 g.L⁻¹, Fig. 2a) and 3-HPA production (5.31 g.L⁻¹, Fig. 2a) were significant but the impact on cells physiological state was similar to the one obtained at pH 3 (only 51 % of viable cells, Fig. 2b). The high inhibition observed was probably due to the rapid and important quantity of 3-HPA produced at unregulated pH. Concerning 3-HP and 1,3-PDO production, the pH of the bioconversion medium displayed only little effect (between 0.7 and 0.9 g.L⁻¹ of 3-HP produced and 0.25 and 0.35 g.L⁻¹ of 1,3-PDO produced depending on the conditions, Fig. 2a). The mass balance analysis evidenced a higher 3-HP molar production than the one of 1,3-PDO for all the tested pH (molar ratios 3-HP/1,3-PDO > 1). These results confirm that obtained in previous study (Burgé *et al.* 2015a). If the impact of the medium pH on 3-HPA production capabilities by *L. reuteri* has yet been underlined (Lüthi-Peng *et al.* 2002, Bauer *et al.* 2010) confirming pH 6 as optimal, its influence on 3-HP production has been only poorly studied. A recent study showed a better 3-HP accumulation by increasing the pH from 5 to 7 (Dishisha *et al.* 2014).

Concerning the observed inhibition effect on *L. reuteri* physiological state (Figure 2b), it seems to be mostly related to the acidity of the bioconversion medium and to a lesser extent to the toxicity of produced metabolites (Doleyres *et al.* 2005, Cleusix *et al.* 2007, Spinler *et al.* 2008). However, as 3-HP has no impact when pH is higher than the pKa of 3-HP (i.e. 4.51), the observed decreases in cell viability at pH 5 and 6 were probably only due to the 3-HPA toxicity. This was consistent with the final product concentration (4.95 and 5.58 g.L⁻¹ at pH 5 and 6, respectively) and the minimum inhibitory concentration (2.96 g.L⁻¹) and minimum bactericidal concentration (6.67 g.L⁻¹) estimated for the 3-HPA against *L. reuteri* DSM 20016 strain (Cleusix *et al.* 2007). On the contrary, at pH 3, a little amount of 3-HPA was produced and only low medium pH could therefore explain the impact on bacterial physiological state. For the set up of extractive bioconversion, pH 5 and 6 seem to be the most appropriate because of better glycerol consumption and stress resistance compared to lower pH levels. Unregulated pH could also be adopted, because it would be regulated by 3-HP extraction from the broth.

3-HP reactive extraction and biocompatibility of the selected extractant phase

In previous study (Moussa *et al.* 2015, Burgé *et al.* 2016), the use of mixed TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol has shown high 3-HP extraction performances over a wide range of experimental conditions, highlighting a synergistic effect between the two co-extractants. However, regarding the ultimate objective of integrated extractive bioconversion the biocompatibility of this extractant mixture should be verified. Experiments were therefore performed with free *L. reuteri* cells to quantify the inhibition caused by molecular level toxicity of several extracting phases. Results are given on Table 1 and expressed in percentage of viability.

Table 1. Molecular level toxicity of the tested extractant phase with or without additional metabolites stress on *L. reuteri* physiological state. Reported data correspond to the percentage of viability compared to the control (cells in distilled water) after a 3-h stress.

Test	% of viability
<i>Molecular level toxicity</i>	
<i>n</i> -decanol (100%)	84%
<i>n</i> -decanol (80%) + TOA (20%)	93%
<i>n</i> -decanol (80%) + TOA (18%) + Aliquat 336 (2%)	39%
<i>Molecular level toxicity + metabolites inhibition</i>	
<i>n</i> -decanol (80%) + TOA (20%) + 3-HP (0.5 g.L ⁻¹)	79%
<i>n</i> -decanol (80%) + TOA (20%) + 3-HPA (1 g.L ⁻¹)	59%

Results displayed a little effect of *n*-decanol alone or *n*-decanol (80% v/v) + TOA (20% v/v) compared to the control in distilled water (84% and 93% of viability, respectively, Table 1). Conversely, the addition of only a small Aliquat 336 concentration (2% v/v) to the mixture led to a higher impact on *L. reuteri* physiological state (39% of viability, Table 1). Toxicity effects of Aliquat 336 on *L. delbrueckii* (Seevartnam *et al.* 1991) and *L. casei* (Marinova and Yankov 2009) were also previously reported. But the mechanisms at the root of this toxicity are still unclear. Given its high molecular level toxicity, Aliquat 336 was therefore removed from the extractant phase composition, despite higher extraction performances in combination with TOA. Before implementing the extractive bioconversion, 3-HP reactive extraction performances from model and real bioconversion media using TOA (20% v/v) in *n*-decanol (80% v/v) were characterized (Figure 3).

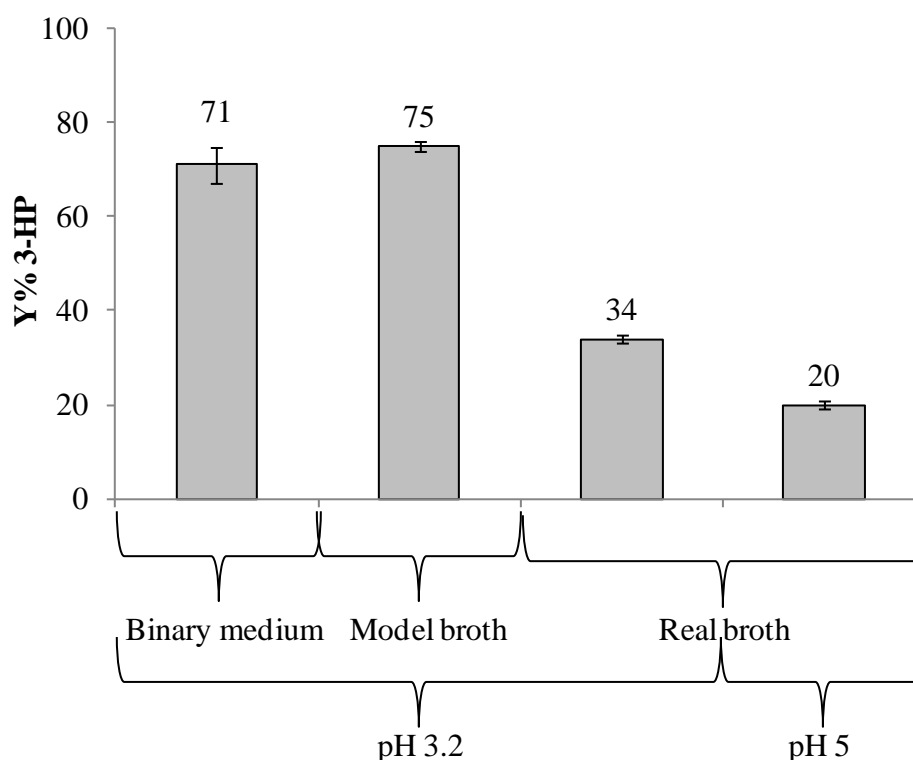


Figure 3. Impact of the aqueous phase composition on 3-HP reactive extraction at 25 °C. Extraction was performed at 25°C with TOA (20% v/v) in n-decanol (80% v/v). 1: Binary medium (3-HP at 1g.L⁻¹ in water; initial pH=3.2), 2: Model bioconversion broth (3-HP at 1g.L⁻¹, glycerol at 5 g.L⁻¹, 1,3-PDO at 1g.L⁻¹, 3-HPA at 9 g.L⁻¹ in water, initial pH=3.2), 3: Real bioconversion broth (3-HP at 1.5 g.L⁻¹, glycerol at 1.3 g.L⁻¹, 1,3-PDO at 1.6 g.L⁻¹, 3-HPA at 12.2 g.L⁻¹ in water, initial pH=3.2), 4: Real bioconversion broth (initial pH=5). Results are expressed in percentage of 3-HP extracted in organic phase (Y% 3-HP).

Comparison between the binary medium (only 3-HP in water) and the model bioconversion broth (3-HP, 3-HPA, glycerol and 1,3-PDO) indicated that there was no effect of the added compounds on the extraction yield of 3-HP. Concerning the 3-HP extraction on real bioconversion medium, results showed a lower extraction than on model medium containing only 3-HP in water. Only 34% of 3-HP was extracted (Fig. 3) in the organic phase, against 71% for 1 g.L⁻¹ of 3-HP at pH 3.2. At pH 5, separation on real bioconversion medium displayed lower performances, highlighting the important role played by pH in reactive extraction. As discussed previously, lower extraction yield on real medium was probably due to residual salts (coming from potassium phosphate buffer used to wash the cells before bioconversion) in competition with 3-HP to be extracted (Moussa *et al.* 2015) and to the presence of macromolecules such as proteins or phospholipids that could affect the 3-HP extraction kinetics in the organic phase through lower values of mass transfer coefficient (Burgé *et al.* 2016).

Study of the integrated extractive bioconversion for the *in situ* product recovery of 3-HP

The evolution of glycerol consumption and metabolites production during bioconversion at unregulated pH and 37 °C with or without *in situ* 3-HP reactive extraction is displayed on Figure 4 and its impact on producing bacteria physiological state followed by flow cytometry on Figure 5. Given that the Aliquat 336 was suspected to display a toxic effect on *L. reuteri*, the extraction phase was only composed of TOA (20% v/v) and *n*-decanol (80% v/v).

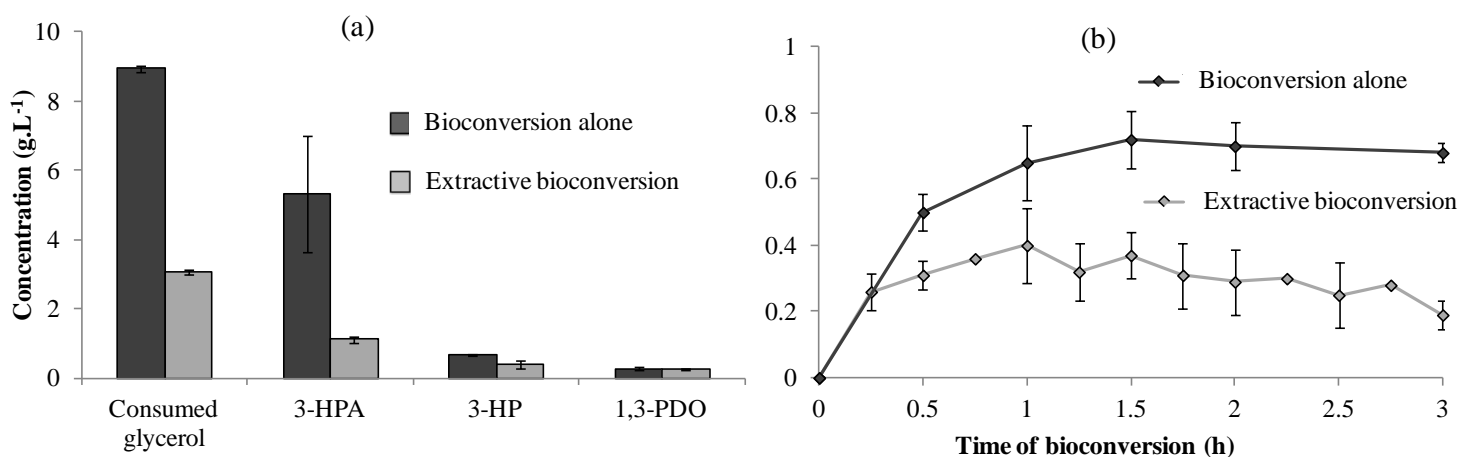


Figure 4. Results of the bioconversion at unregulated pH with or without 3-HP ISPR (reactive extraction assisted by HFMC using TOA 20% v/v and *n*-decanol 80% v/v). (a) Glycerol consumption and metabolites production during the bioconversion, (b) Evolution of 3-HP concentration in bioconversion medium. Reported data correspond to the mean values of measurements from two independent experiments.

There was a very low consumption of glycerol during these first coupling experiments (3.07 ± 0.07 g.L⁻¹ Fig. 4a) compared to bioconversion without *in situ* 3-HP extraction (8.76 ± 0.08 g.L⁻¹ Fig. 4a). Similarly, production of 3-HPA, 1,3-PDO and 3-HP were lower. In addition, 3-HPA yield (0.49 ± 0.08 mol/mol) was lower than that obtained during single bioconversion (0.74 ± 0.25 mol/mol), while 3-HP (0.15 ± 0.02 mol/mol) and 1,3-PDO (0.1 ± 0.01 mol/mol) yields were higher (against 0.07 ± 0.01 mol/mol and 0.04 ± 0.01 mol/mol, respectively). Furthermore, if we focus on the 3-HP production in the aqueous phase (Fig. 4b), there was a decrease in the 3-HP concentration when the extraction process was coupled with the bioconversion after 1 h of experiment (0.40 ± 0.11 g.L⁻¹ after 1 h, and 0.19 ± 0.04 g.L⁻¹ after 3 h). This diminution was not observed when the bioconversion was conducted alone (Fig. 4b). When bioconversion and 3-HP reactive extraction were conducted together, pH decreased to 5.21 (± 0.24) after 40 minutes before stabilizing at 5.34 (± 0.16) after 3 h (data not shown). When the bioconversion was experimented alone, it decreased to 4.83 (\pm

0.07) after 1 h and reached 4.98 (± 0.06) after 3 h (data not shown). Several hypotheses may be issued from these results to explain this higher pH obtained during the integrated process. First at all, less 3-HP was produced and it was partly extracted in organic phase (Fig. 4b). Then, organic molecules of the extractant phase (especially TOA) may partially solubilize in the bioconversion medium and therefore increase the pH value. A pH increase has already been observed after extraction with TOA when compared to the theoretical value of pH due to global acid concentration which means that the dissociation coefficient is higher after TOA extraction than equilibrium value for acid alone (data not shown). These results highlight the TOA transfer into the aqueous phase.

Concerning the impact on *L. reuteri* physiological state, a significant decrease in the percentage of viable cells was observed after 30 min (Fig. 5a). This decrease was complete after 1.5 h and all the bacteria were dead. When the bioconversion was conducted alone, the percentage of bacterial inhibition was lower, as around 50% of *L. reuteri* cells remained viable after 3 h of bioconversion (Fig. 5b). This observed toxicity was certainly mostly responsible of low 3-HP production performances during extractive bioconversion.

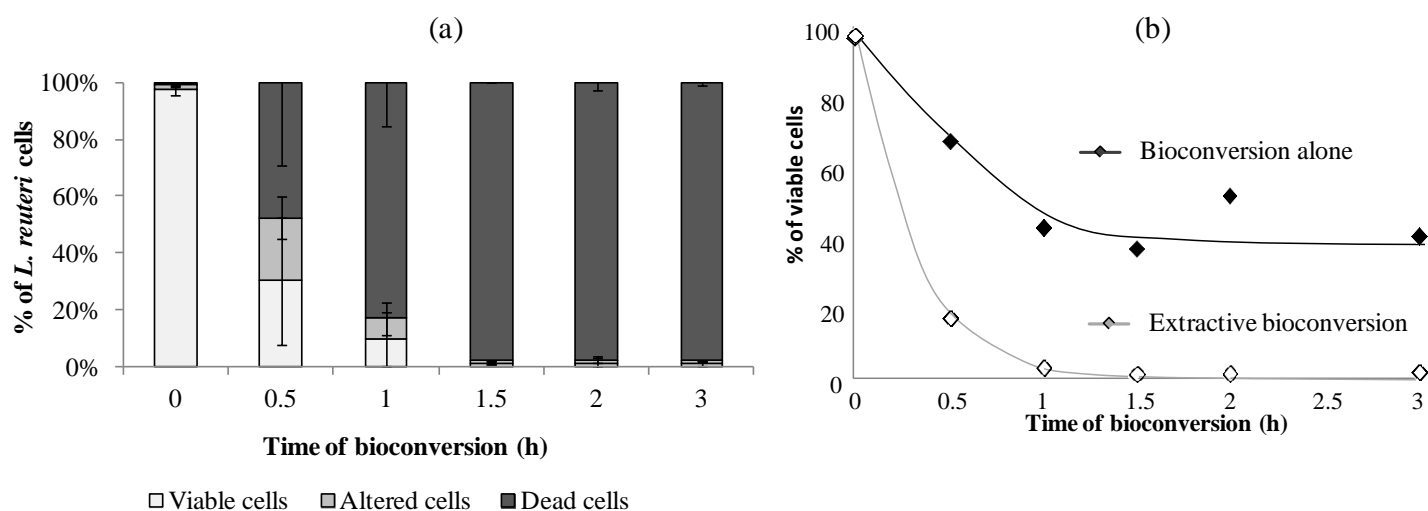


Figure 5. Results of the bioconversion at unregulated pH with or without 3-HP ISPR (reactive extraction assisted by HFMC using TOA 20% v/v and *n*-decanol 80% v/v). (a) Impact on *L. reuteri* physiological state of 3-HP extractive bioconversion, (b) Evolution of cells viability during the bioconversion. Reported data correspond to the mean values of measurements from two independent experiments.

In order to explain the high toxicity observed during the extractive bioconversion assisted by HFMC, supplementary experiments were performed. The shear stress was first studied and assessed by flow cytometry. After 3 h of circulation in the module, no loss of viability was detected (data not shown). Therefore, the circulation of *L. reuteri* cells into the module fibers and the pump has very limited impact on bacteria physiological state. Then, the effect of soluble fraction of the organic extractant phase was investigated together with cumulative impact of 3-HP and 3-HPA. Results are displayed in Table 1. 3-HP and 3-HPA concentrations were chosen in the concentration range obtained after the extractive bioconversion (0.5 g.L^{-1} and 1 g.L^{-1} for 3-HP and 3-HPA, respectively).

Whereas the soluble fraction of an organic extractant phase composed by *n*-decanol alone or *n*-decanol + TOA has limited toxic impact (93% of viability, Table 1), the addition of 3-HP or 3-HPA provoked a decrease of cell viability (79% and 59% of viability with 0.5 g.L^{-1} of 3-HP and 1 g.L^{-1} of 3-HPA, respectively, Table 1).

Then, the influence of the phase level toxicity on *L. reuteri* cells was evaluated. Two different kinds of contact were made: in bottles and directly in membrane contractor and two organic phases were tested: *n*-decanol alone (100% v/v) or *n*-decanol (80% v/v) + TOA (20% v/v). Results are displayed on Figure 6.

The use of *n*-decanol alone or *n*-decanol (80% v/v) + TOA (20% v/v) as organic extractant phases in the shell side induced a strong toxic effect as none of the circulating cells was alive after 3 h (Fig. 6a and b). Whatever the tested organic phase in membrane contactor, the final toxicity observed (no viable cells after 3 h) and its kinetics were very close to that obtained after 3-HP reactive extraction coupled with glycerol bioconversion (Fig. 5a). The presence of TOA in the organic phase displayed only a little additional impact on the observed toxicity. In order to confirm if the observed inhibition would be explained by a direct contact with the organic phase, close to the membrane pores, the phase level toxicity of *n*-decanol alone was also investigated in bottles (Fig. 6c). A drastic decrease in cell viability due to the direct contact of bacteria with decanol used as the solvent for extraction was observed. Similar results have been reported (Marinova *et al.* 2009) concerning *n*-decanol phase level toxicity, as a great impact was observed on biomass and lactic acid production by *Lactobacillus casei* cells. Nevertheless, the observed impact is not only due to the phase level toxicity but also to the molecular level toxicity, as it is

not possible to differentiate the effects due to each level of toxicity. Toxicity due to direct contact with the organic phase is therefore more deleterious than that due to dissolved organic molecules. The higher observed impact on *L. reuteri* physiological state in the HFMC compared to that in bottle was probably due to the specific exchange surface difference between HFMC and bottle (730 and 36 m²/m³ of aqueous surface, respectively), to differences in the interface regeneration between HFMC and bottles and maybe to an additive effect of shear stress. This phase level toxicity, coupled with additional effects of 3-HPA and 3-HP during glycerol bioconversion, explains for the most part the low bacterial cell viability observed extractive bioconversion assisted by HFMC.

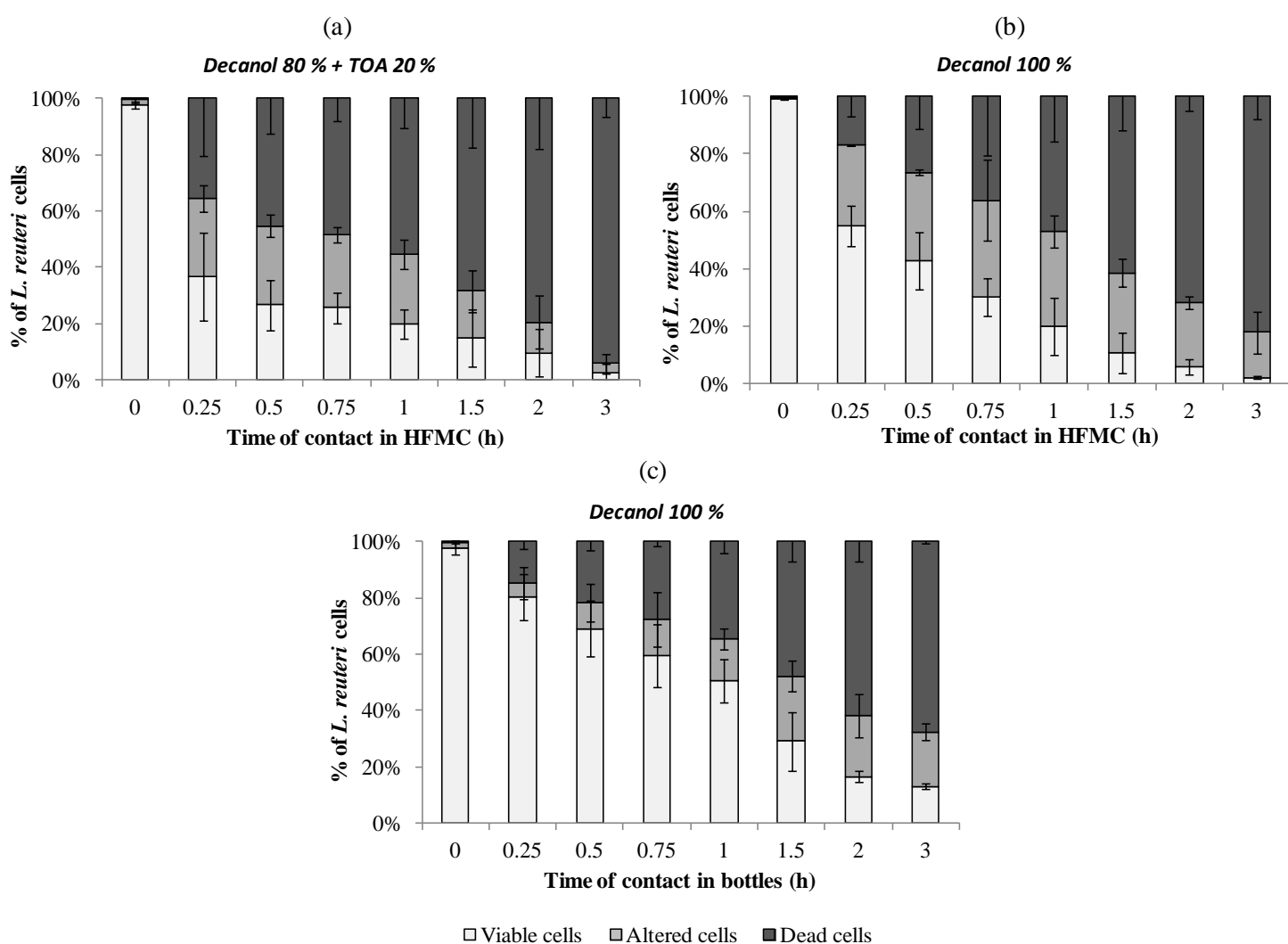


Figure 6. Impact of phase level toxicity on *L. reuteri* physiological state. Direct contact with (a) *n*-decanol (80% v/v) + TOA (20% v/v) in HFMC, (b) *n*-decanol alone (100% v/v) in HFMC and (c) *n*-decanol alone (100% v/v) in bottles. Reported data correspond to the mean values of measurements from two independent experiments.

As one would expect, the use of a well-designed membrane contactor allowed minimizing the direct contact between cells in the aqueous phase and the organic phase, compared to classical dispersive liquid-liquid extraction in separating funnel. But given the observed results, a direct contact of bacteria with the organic phase close to the HFMC pores is clearly suspected. Nevertheless, the theoretical interest of HFMC of reducing the phase level toxicity depends on the pores diameter. The average pore size of the polypropylene membrane used in our study is theoretically around 0.03 μm (supplier data) that assure bacteria exclusion from pores. Preliminary experiments to get membrane pore size distribution (Mercury intrusion performed for the X50 membrane of the Liqui-Cel® module) allowed us to suspect the existence of some larger pores size (until 1 μm). Given *L. reuteri* size during the bioconversion (between 1 to 2 μm), these larger pores could explain direct contact between bacteria and solvent and therefore the high observed inhibition due to phase level toxicity. In addition, the organic phases/water interfacial tensions have been experimentally measured at 8.5 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ for *n*-decanol alone and 9.3 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ for TOA 20 % v/v in *n*-decanol. These quite low values could also promote the presence of solvent drops at the vicinity of larger pores mouths, because of a low critical pressure, due both to the pore size and low interfacial tension of the system. This is consistent according to the Young-Laplace equation: the interface is more difficult to stabilize for larger pore size and lower interfacial tension between aqueous and organic phases (Dupuy *et al.* 2011).

Conclusion

Extractive bioconversion has already been shown to be advantageous for organic acid production leading to significant improve of productivity, product yield and final concentration. However, this relatively new process displayed currently lower performances over the conventional 3-HP production by glycerol bioconversion because of the drastic observed inhibition mostly due to an important phase level toxicity. This could be due to direct contact between bacteria and extractant phase near the pores of the membrane. Over the two components of the extractant phase (*n*-decanol + TOA), *n*-decanol seemed to be the most toxic. Methods to reduce solvent toxicity should be investigated. This may include the use of immobilized cells in bioreactors, which have been demonstrated to be better than free-cell systems in many aspects (Trauth *et al.* 2001, Tik *et al.* 2001, Wu and Yang, 2003) and the use of less toxic solvents such as oleyl alcohol (Marinova and Yankov, 2009) or paraffin oil (Seevaratnam *et al.* 1991). Given the observed molecular level toxicity, the use of oils capable of trapping the solvent molecules, especially Aliquat 336, in aqueous phase could also be envisaged (Yabannavar and Wang, 1991).

Acknowledgments

The authors are grateful to the Region Champagne-Ardenne, the Conseil Général de la Marne and Reims Métropole for their financial support.

References

- Ataei SA and Vasheghani-Farahani E, *In situ* separation of lactic acid from fermentation broth using ion exchange resins. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1229–1233 (2008).
- Bar R and Gainer JL, Acid fermentation in water-organic solvent two-liquid-phase systems. *Biotechnol Prog* 3:109–114 (1987).
- Bar R, Effect of interphase mixing on a water-organic solvent two-liquid-phase microbial system: ethanol fermentation. *J Chem Technol Biotechnol* 43:49–62 (1988).
- Bauer R, du Toit M and Kossmann J, Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *Int J Food Microbiol* 137:28–31 (2010).
- Boontawan P, Kanchanathawe S and Boontawan A, Extractive fermentation of l-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using electrodeionization (EDI) technique. *Biochem Eng J* 54:192–199 (2011).
- Bringas E, San Román MF, Urtiaga AM and Ortiz I, Integrated use of liquid membranes and membrane contactors: Enhancing the efficiency of L-L reactive separations. *Chem Eng Process* 67:120–129 (2013).
- Burgé G, Saulou-Bérion C, Moussa M, Pollet B, Flourat A, Allais F, Athès V and Spinnler HE, Diversity of *Lactobacillus reuteri* strains in converting glycerol into 3-hydroxypropionic acid. *App Biochem Biotechnol* 177:923–939 (2015a).
- Burgé G, Flourat A, Pollet B, Spinnler HE and Allais F, 3-Hydroxypropionaldehyde (3-HPA) quantification by HPLC using synthetic acrolein-free 3-hydroxypropionaldehyde system as analytical standard. *RSC Advances* 5:92619–92627 (2015b).
- Burgé G, Moussa M, Chemarin F, Saulou-Bérion C, Allais F, Spinnler E, Athès, V, Reactive extraction of bio-based 3-hydroxypropionic acid assisted by hollow-fiber membrane contactor using TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol. *J Chem Technol Biotechnol* (2016).
- Chen G, Yang D, Xiao Y and Chen H, Influence of conditions on reuterin accumulation by the resting cell biotransformation process. *Chinese J. Chem. Eng.* 19:1023–1027 (2011).

- Choudhury B, Basha A, and Swaminathan T, Study of lactic acid extraction with higher molecular weight aliphatic amines. *J Chem Technol Biotechnol* 72:111–116 (1998).
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S and Le Blay G, Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol* 7:101–109 (2007).
- Coelho IM, Silvestre P, Viegas RMC, Crespo J and Carrondo MJT, Membrane-based solvent extraction and stripping of lactate in hollow-fiber contactors. *J Membrane Sci* 134:19–32 (1997).
- Della Pina C, Falletta E and Rossi M, A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid. *Green Chem* 13:1624–1632 (2011).
- Dishisha T, Pereyra LP, Pyo SH, Britton RA and Hatti-Kaul RH, Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microb Cell Fact* 13:76–85 (2014).
- Doleyres Y, Beck P, Vollenweider S and Lacroix C, Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:467–474 (2005).
- Dupuy A, Athès V, Schenk J, Jenelten U and Souchon I, Experimental and theoretical considerations on breakthrough pressure in membrane-based solvent extraction: Focus on citrus essential oil/hydro-alcoholic solvent systems with low interfacial tension. *J Membr Sci* 378:203–213 (2011).
- Fernandes P, Prazeres DMF and Cabral JMS, Membrane-assisted extractive bioconversions. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 80:115–148 (2003).
- Gokarn RR, Selifonova OV, Jessen HJ, Steven JG, Selmer T and Buckel W., 3-hydroxypropionic acid and other organic compounds. Patent application no. PCT/US2002/42418 A2, Cargill, Inc. (2002).
- Harington T and Hossain MM, Extraction of lactic acid into sunflower oil and its recovery into an aqueous solution. *Desal* 218:287–296 (2008).
- Huang H, Yang ST and Ramey DE, A hollow-fiber membrane extraction process for recovery and separation of lactic acid from aqueous solution. *App Biochem Biotechnol* 113-116:671–688 (2004).
- Jiang X, Meng X and Xian M, Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:995–1003 (2009).

- Jin Z and Yang ST, Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol Prog* 14:457–465 (1998).
- Kumar V, Ashok S and Park S, Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnology Advances* 31: 945-961 (2013).
- Li Q, Wang D, Hu G, Xing J and Su Z, Integrated bioprocess for high-efficiency production of succinic acid in an expanded-bed adsorption system. *Biochem Eng J* 56:150–157 (2011).
- Luo LH, Seo JW, Baek JO, Oh BR, Heo S, Hong WK, Kim DH and Kim CH, Identification and characterization of the propanediol utilization protein PduP of *Lactobacillus reuteri* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:697–703 (2011).
- Lüthi-Peng Q, Schärer S and Puhan Z, Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:73–80 (2002).
- Marinova NA and Yankov DS, Toxicity of some solvents and extractants towards *Lactobacillus casei* cells. *Bulgarian Chem Com* 41:368–373 (2009).
- Matsumoto M, Mochiduki K, Kondo K, Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria. *J Biosci Bioeng* 98:344–347 (2004).
- Meynial-Salles I, Dorotyn S and Soucaille P, A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnol Bioeng* 99:129–135 (2008).
- Moussa M, Burgé G, Chemarin F, Bounader R, Saulou-Bérion C, Allais F, Spinnler HE and Athès V, Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid. *J Chem Technol Biotechnol* DOI:10.1002/jctb.4813 (2015).
- Peterson EC and Daugulis AJ, Demonstration of *in situ* product recovery of butyric acid via CO₂-facilitated pH swings and medium development in two-phase partitioning bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 111:537–44 (2014).
- Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B and Britton RA, The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiol* 156:1589–1599 (2010).
- Smithers-Rapra, Ten-year forecast of disruptive technologies in industrial biotechnology to 2021, pp. 1-124 (2011).

- Spinler JK, Taweechoatipatr M, Rognerud CL, Oub CN, Tumwasorn S and Versalovic J, Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 14:166–171 (2008).
- Seevaratnam S, Holst O, Hjorlefsdottir S and Mattiasson B, Extractive bioconversion for lactic acid production using solid sorbent and organic solvent. *Bioprocess Eng* 6:35–41 (1991).
- Sirkar KK, Membranes, phase interfaces, and separations: novel techniques and membranes-an overview. *Ind Eng Chem Res* 47:5250–5266 (2008).
- Tik N, Bayraktar E and Mehmetoglu U, *In situ* reactive extraction of lactic acid from fermentation media. *J Chem Technol Biotechnol* 76:764–768 (2001).
- Trauth E, Lemaître JP, Rojas C, Diviès C and Cachon R, Resistance of immobilized lactic acid bacteria to the inhibitory effect of quaternary ammonium sanitizers. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 34:239–243 (2001).
- Valdehuesa KNG, Liu H, Nisola GM, Chung WJ, Lee SH and Park SJ, Recent advances in the metabolic engineering of microorganisms for the production of 3-hydroxypropionic acid as C3 platform chemical. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3309–3321 (2013).
- Wu Z and Yang ST, Extractive fermentation for butyric acid production from glucose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Biotechnol Bioeng* 82:93–102 (2003).
- Xu K and Xu P, Efficient calcium lactate production by fermentation coupled with crystallization-based *in situ* product removal. *Bioresour Technol* 163:33–39 (2014).
- Yabannavar VM and Wang DIC, Strategies for reducing solvent toxicity in extractive fermentations. *Biotechnol Bioeng* 37:716–722 (1991).
- Ye K, Jin S, Shimizu K, Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation. *J Ferm Bioeng* 81:240–246 (1996).

3.3 Conclusion et perspectives de l'étude

Les travaux présentés constituent la première étude dédiée à la bioconversion extractive du 3-HP. Les performances des procédés de production du 3-HP par voie microbienne et d'extraction *in situ* de la molécule sont insuffisantes (faibles rendements de bioconversion et d'extraction). Ces résultats s'expliquent par l'impact délétère provoqué par le procédé intégré sur l'état physiologique de *L. reuteri* (perte totale de viabilité après 1h30), dû principalement à la toxicité de la phase organique extractante (TOA 20 % v/v dans *n*-décanol). En plus de l'effet induit par la fraction soluble au niveau moléculaire, le contact direct entre phase organique et bactéries présentes dans la phase aqueuse au niveau de la sortie des pores de la membrane hydrophobe du contacteur est fortement suspecté. L'utilisation de solvants biocompatibles (alcool oléique, huiles végétales) pourrait constituer une alternative intéressante, même si les performances d'extraction associées risquent d'être diminuées (Harington and Hossain 2008, Kyuchoukov and Yankov 2012). De même, l'utilisation d'un contacteur à membrane de nature hydrophile, au sein duquel les pores seraient remplis non plus par la phase organique mais par la phase aqueuse, évitant le contact direct entre bactéries et phase extractante, est à étudier. L'immobilisation des bactéries dans le réacteur au sein de billes de gel ou leur rétention par une membrane en sortie de bioréacteur sont également envisagées.

Concernant les performances d'extraction, les conditions opératoires mises en œuvre lors de la bioconversion extractive (pH non régulé, phase organique composée de TOA et *n*-décanol sans Aliquat 336, milieu de bioconversion riche en molécules relarguées par les bactéries ou issues de leur lyse, et potentiellement tensioactives, présence de sels issus du lavage) ne sont pas optimales en comparaison à celles mises en évidence précédemment (Moussa *et al.* 2015, Burgé *et al.* 2016). Afin d'optimiser le rendement et la cinétique d'extraction du 3-HP en milieu aqueux, une modification du protocole de lavage des bactéries, responsable de la présence de sels de phosphate dans le milieu de bioconversion, est envisagée. Enfin, l'intégration d'un second contacteur à membrane au sein du procédé couplé, permettant la régénération de la phase organique extractante et la récupération du 3-HP purifié en milieu aqueux, devrait conduire à une amélioration des performances d'extraction via une augmentation de la force motrice de transfert du 3-HP.

CHAPITRE IV :
CONCLUSION GÉNÉRALE
ET PERSPECTIVES

CHAPITRE IV : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

« Le danger qui menace les chercheurs aujourd'hui serait de conclure qu'il n'y a plus rien à découvrir » (Pierre Joliot-Curie, *La recherche passionnément*, 2002)

Le 3-HP peut être utilisé comme intermédiaire pour la synthèse chimique de nombreux produits, entrant notamment dans la composition d'adhésifs, de polymères, d'emballages plastiques, de fibres, d'agents de nettoyage et de résines, ce qui représente un marché important. Actuellement, le prix très élevé du 3-HP, produit exclusivement par synthèse chimique organique, limite son utilisation pour des marchés de masse. Cette difficulté pourrait être levée grâce aux biotechnologies microbiennes. En effet, des travaux ont établi que certains micro-organismes, parmi lesquels *L. reuteri*, produisaient naturellement le 3-HP par bioconversion du glycérol, co-produit de la fabrication de biodiesel, et donc potentiellement disponible en quantité. Cependant, les résultats obtenus en termes de concentration finale, rendement et productivité sont encore insuffisants pour envisager un changement d'échelle et une production industrielle. La présence d'un co-produit, le 1,3-PDO, et l'impact délétère avéré du 3-HP et de son intermédiaire métabolique, le 3-HPA, à l'encontre des bactéries productrices, explique en grande partie les faibles performances obtenues. Deux approches différentes sont dès lors envisageables pour lever ces verrous : (i) l'optimisation de la voie de production de la molécule d'intérêt par ingénierie métabolique de bactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. reuteri*) ou de levures (*S. cerevisiae*), (ii) l'optimisation de la production du 3-HP par le contrôle du bioprocédé, notamment en couplant les étapes de bioconversion du glycérol et d'extraction *in situ* de la molécule d'intérêt (approche d'*In Situ Product Recovery*). Cette intégration de procédé permettrait de lever l'inhibition exercée par le 3-HP, d'améliorer les performances de production bactérienne et de récupérer la molécule ciblée. Déjà décrite dans le cas de l'extraction de son isomère de position, le 2-HP (acide lactique), l'extraction liquide-liquide réactive assistée par contacteur membranaire constitue une technique d'intérêt étant données les contraintes rencontrées pour la production microbienne de 3-HP: molécule hydrophile, non volatile, de faible masse molaire et produite à faible concentration.

Dans ce contexte, ce travail de thèse avait pour objectifs d'identifier les déterminants métaboliques de la bioconversion du glycérol par *L. reuteri* afin d'améliorer la production de 3-HP, de développer un procédé de séparation adapté à la récupération du 3-HP en milieu aqueux, de coupler la bioconversion au procédé d'extraction *in situ* et d'étudier l'impact de ce procédé intégré sur les performances de production et l'état physiologique des bactéries productrices. Pour

atteindre ces objectifs, nous nous sommes attachés à évaluer la nature et le niveau des inhibitions des bactéries par les métabolites de la voie de biosynthèse du 3-HP et à en étudier les mécanismes, à concevoir un procédé de séparation adapté à l'extraction du 3-HP au sein d'un milieu aqueux et biocompatible avec les bactéries mises en œuvre, et à comprendre les mécanismes limitant le transfert du 3-HP dans le procédé d'extraction.

La première étape de ce travail a consisté à sélectionner une souche de *L. reuteri* pour la suite du projet, sur la base de ses performances tant de croissance sur glucose que de bioconversion du glycérol. Trois souches (DSM 20016, DSM 17938 et ATCC 53608), choisies sur la base de leur distance génétique significative, et permettant donc de s'attendre à des variations au niveau métabolique, ont ainsi été étudiées. Outre cette différence phylogénétique, la souche DSM 17938 est utilisée comme probiotique (société Biogaia), la souche DSM 20016 (qui correspond à la souche type de laboratoire) et la souche ATCC 53608 sont mises en œuvre dans plusieurs travaux de la littérature, facilitant la comparaison des résultats expérimentaux. Bien que la grande majorité des études concernant la production biotechnologique de 3-HP utilisent des micro-organismes modifiés par ingénierie métabolique, conduisant à des performances intéressantes (jusqu'à 57 g.L⁻¹ de 3-HP produit à partir de glycérol avec *E. coli*, avec un rendement de 0,88 g/g et une productivité de 1,59 g.L⁻¹.h⁻¹ ; Kim *et al.* 2014), le projet a été réalisé avec des souches de *L. reuteri* non modifiées. Ce parti pris présente plusieurs avantages, parmi lesquels le statut G.R.A.S. du micro-organisme, sa prototrophie pour la vitamine B12 ou encore sa meilleure résistance aux inhibitions générées par les métabolites produits, en comparaison aux autres micro-organismes testés.

La comparaison des performances de croissance sur glucose par les trois souches a permis de montrer une variabilité intra-espèce dans l'utilisation des deux voies métaboliques de catabolisme du glucose : la glycolyse (EMP) et la voie des pentoses phosphates (PKP). Bien que la compréhension de divers mécanismes, telle que la résistance au stress acide, soit en partie liée à celle de cette balance métabolique, les raisons de cette dernière ne sont pas encore clairement identifiées. La souche DSM 17938, qui montre la cinétique de croissance la plus rapide et la bascule métabolique la plus importante (utilisation quasi-exclusive de l'EMP en début de croissance puis quasi-exclusive de la PKP en fin de croissance), constitue la souche la plus intéressante pour la production d'acide lactique, certainement en raison de sa meilleure résistance à un milieu acide. Cette résistance constituerait un avantage dans la perspective de production du 3-HP.

Les trois souches de *L. reuteri* ont ensuite été étudiées du point de vue de leurs performances de bioconversion du glycérol. Plusieurs paramètres ont ainsi été pris en compte, comme la concentration finale en 3-HP, le rendement de conversion du substrat et la capacité à résister aux stress générés pendant la bioconversion. Cette partie du travail a permis d'avancer dans la compréhension de l'orientation du flux de carbone issu du glycérol au sein de la voie métabolique de bioconversion et de celle d'une partie des mécanismes responsables de l'inhibition observée durant cette production. L'impact global de la bioconversion a d'abord été évalué par des mesures de cultivabilité sur milieu solide (concentration cellulaire divisée par un facteur 10^{10} à 10^{12} avant la première heure et demie). Pour tenter de discriminer le rôle joué par chacun des métabolites, des mesures d'activité enzymatique et d'intégrité membranaire ont été effectuées simultanément par cytométrie en flux, confirmant l'action prépondérante du 3-HPA dans le phénomène d'inhibition, ainsi que l'impact additionnel du 3-HP à pH acide. Si de nombreux travaux se sont intéressés aux mécanismes responsables du stress induit par le 3-HPA sur *L. reuteri* et sur d'autres bactéries (*E. coli* notamment, Vollenweider *et al.* 2010, Schaefer *et al.* 2010), peu d'informations sont disponibles concernant le 3-HP. Des mesures de pH intracellulaire ont donc été entreprises suite à l'ajout de différentes concentrations de 3-HP ou lors de bioconversions à partir de glycérol, pour tenter d'avancer dans la compréhension de ces mécanismes. Les résultats ne semblent cependant pas indiquer de chute du pH intracellulaire liée à la présence ou à la production de 3-HP, potentiellement grâce à l'ATP produit durant l'oxydation du 3-HPA en 3-HP, qui permettrait d'alimenter les pompes à protons nécessaires au maintien du pH interne. Des répétitions de ces expériences en cytométrie en flux et des tests complémentaires (en RMN du proton par exemple) sont nécessaires pour confirmer ces premiers résultats. Le 3-HPA étant connu pour générer un stress oxydatif, nous avons également voulu vérifier la capacité du 3-HP à générer ce même type de stress. Les résultats des analyses effectuées par cytométrie en flux permettent de suspecter une production de ROS sous forme d' O_2^- au sein des bactéries en présence de 3-HP à pH acide. Là encore, des expérimentations complémentaires sont nécessaires afin de conclure avec certitude. La détection de ROS de type H_2O_2 et OH^\bullet par cytométrie en flux est donc envisagée afin de conforter cette hypothèse d'un lien entre stress acide et stress oxydatif.

Concernant les performances de production du 3-HP, la souche DSM 17938 s'est révélée la plus intéressante et a ainsi été retenue pour la suite du projet : meilleur rendement de production du 3-HP, consommation du substrat plus importante, résistance au stress 3-HPA plus élevée mais sensibilité au stress acide et 3-HP, en comparaison avec les deux autres souches. L'évaluation de

la capacité de croissance des bactéries en milieu liquide en présence de 3-HP a permis de confirmer ces résultats. Ces deux dernières caractéristiques sont importantes à prendre en compte dans la perspective de l'extraction *in situ* du 3-HP, puisqu'en théorie seul le stress 3-HPA devrait perdurer.

L'utilisation d'un bioréacteur, permettant la conduite de la bioconversion en conditions maîtrisées (régulation du pH et de l'agitation), n'a pas permis d'améliorer les performances dans le cas de la souche DSM 17938. Cependant, l'étude réalisée à différents niveaux de pH, paramètre influençant fortement l'efficacité de l'extraction réactive, a confirmé son impact sur le métabolisme du glycérol chez *L. reuteri*. Ainsi, plus la bioconversion est mise en œuvre à pH faible, plus l'altération de l'état physiologique est importante et plus la consommation du substrat et la production de 3-HPA diminuent. Cet impact délétère observé est au moins en partie lié à l'acidité du milieu, même si un impact plus marqué du 3-HPA à faible pH est également envisageable, ce qui pose une nouvelle fois la question de l'interaction entre ces deux molécules dans le phénomène général d'inhibition bactérienne lors de la bioconversion. En revanche, la production de 3-HP et 1,3-PDO n'est que peu impactée.

Les faibles performances de production s'expliquant au moins en partie par l'inhibition provoquée par le 3-HPA, une conduite en mode « fed-batch » a été mise en place afin d'apporter progressivement le glycérol. Les premiers résultats sont encourageants, cette stratégie permettant de limiter l'accumulation de 3-HPA dans le milieu extracellulaire, ce qui se traduit par un allongement de la durée de production du 3-HP et par une augmentation du rendement de conversion par rapport au mode « batch ». Des expériences complémentaires, concernant notamment le débit d'alimentation en glycérol, doivent être réalisées afin d'optimiser encore les performances de bioconversion de *L. reuteri*.

En parallèle de l'étude de la bioconversion du glycérol par *L. reuteri*, des travaux portant sur la conception d'un procédé de séparation adapté à l'extraction du 3-HP au sein d'un milieu aqueux ont été menés. L'état de l'art réalisé a permis d'évaluer les intérêts et les limites des différentes techniques permettant l'extraction *in situ* de la molécule d'intérêt. Compte tenu des caractéristiques physico-chimiques de la molécule et de son faible titre dans le milieu de bioconversion, le choix s'est porté sur l'extraction liquide-liquide réactive. En effet, le 3-HP n'étant pas soluble en phase organique, il est nécessaire d'ajouter au solvant des molécules permettant de réagir sélectivement avec l'acide afin de former un complexe plus hydrophobe et

donc soluble en phase organique. Parmi les différentes molécules extractantes ayant montré leur efficacité pour l'extraction d'acides organiques et faiblement solubles dans l'eau, une amine tertiaire, la tri-*n*-octylamine (TOA), et un sel d'ammonium quaternaire, l'Aliquat 336, ont été sélectionnés. De même, un diluant actif, le *n*-décanol a été choisi pour solubiliser le complexe formé.

Différents paramètres opératoires (pH initial de la phase aqueuse, concentration en acide, proportions des différents constituants de la phase organique) ont ainsi été étudiés pour l'extraction en ampoules à décanter du 3-HP en milieu binaire (eau + 3-HP). A des fins de comparaison avec la littérature et de compréhension des mécanismes d'extraction, des essais d'extraction de l'acide lactique (2-HP, isomère de position du 3-HP) dans des conditions opératoires similaires ont également été effectués. Un phénomène de synergie entre la TOA et l'Aliquat 336 a été souligné, correspondant à une amélioration significative des performances d'extraction par rapport à l'utilisation des deux extractants de manière indépendante. Ce phénomène est encore plus marqué à pH acide, ce qui souligne le rôle de l'amine tertiaire dans cette synergie, de par ses mécanismes d'action. L'Aliquat 336, en formant un complexe ternaire avec la TOA et le 3-HP permettrait alors la stabilisation de celui-ci, lui assurant notamment une meilleure solubilité en phase organique. Même si l'extraction réactive du 3-HP s'est révélée moins performante que celle de son isomère de position, cette partie du travail a confirmé l'intérêt de la technique de séparation envisagée pour la récupération *in situ* de la molécule d'intérêt. Des tests sur milieu modèle, mimant la composition du milieu de bioconversion en métabolites de la voie (i.e. glycérol, 3-HPA, 3-HP et 1,3-PDO), ont montré que la présence de ces autres molécules n'influe pas sur le rendement et la sélectivité de l'extraction réactive. En revanche, l'utilisation d'un milieu réel (milieu de bioconversion dépourvu de bactéries) a conduit à une diminution des performances d'extraction du 3-HP. La présence dans le milieu de bioconversion de molécules, vraisemblablement excrétées par les bactéries (protéines, phospholipides), ainsi que de sels résiduels issus de la phase de lavage au tampon phosphate, pourraient expliquer cette diminution de performances.

L'utilisation d'amines et de solvants actifs pour l'extraction réactive d'acides organiques est souvent à l'origine d'une toxicité à l'encontre des bactéries productrices. Pour limiter le contact direct entre les bactéries présentes dans le milieu de bioconversion et la phase organique extractante et pour augmenter la surface d'échange disponible, une extraction liquide-liquide réactive assistée par un contacteur à membrane a été envisagée. En effet, l'utilisation d'un

contacteur membranaire, déjà décrite dans la littérature pour d'autres acides organiques (lactique, succinique, butyrique, propionique notamment), est compatible avec une approche *ISPR* et confère de nombreux avantages (modularité, contact non dispersif et intensifié, technique peu énergivore, possibilité de régénérer la phase extractante). Ce travail a d'abord permis de confirmer les résultats de l'extraction réactive du 3-HP en ampoules à décanter : synergie entre la TOA et l'Aliquat 336, sélectivité pour la molécule ciblée, et influence de la composition du milieu de bioconversion sur le rendement, cinétique et sélectivité de l'extraction réactive. L'estimation du coefficient global de transfert de matière et du temps caractéristique a permis d'identifier certaines limitations du transfert de matière. Ainsi, la présence de composés tels que protéines et lipides (bactériens ou issus du milieu de croissance) ou encore de sels résiduels du lavage, impacte davantage le rendement d'extraction (en lien avec une compétition moléculaire, ces molécules pouvant être extraites aux dépens du 3-HP) que la cinétique de transfert. L'étude concernant l'influence du pH initial du milieu et la concentration en acide en phase aqueuse confirme une nouvelle fois la pertinence du choix de l'extraction réactive. En effet, l'extraction du 3-HP est favorable dans la gamme de concentration à laquelle la molécule est produite (entre 0,5 et 2 g.L⁻¹) et dans une gamme de pH (3 à 7) compatible avec la bioconversion.

Après avoir mis au point séparément les étapes de bioconversion et d'extraction *in situ*, et avant de procéder aux premières expériences d'intégration au sein d'un même procédé, des tests de biocompatibilité ont été entrepris afin d'évaluer l'impact des phases extractantes sélectionnées sur l'état physiologique des bactéries. Réalisée par cytométrie en flux, cette étude a permis de souligner la toxicité importante de la fraction soluble (*molecular level toxicity*) du sel d'ammonium quaternaire utilisé (Aliquat 336), à l'inverse de l'amine tertiaire (TOA) et du diluant (*n*-décanol). De ce fait, l'Aliquat 336 n'a pas été sélectionné pour les expériences de couplage malgré la synergie observée en sa présence sur l'extraction réactive du 3-HP. L'effet des contraintes de cisaillement (circulation dans le module et les conduites, dans la pompe) pouvant être générées par le procédé de séparation a également été évalué par cytométrie en flux, montrant l'absence d'impact.

La bioconversion extractive du 3-HP a ensuite été mise en œuvre en bioréacteur à pH non régulé, en se basant sur les résultats des études précédentes. La production s'est cependant révélée moins performante que lors des bioconversions seules (diminution de la concentration maximale en 3-HP et de la consommation de glycérol, réduction de la durée de production). Ces résultats s'expliquent par la perte totale de viabilité cellulaire (estimée par l'intermédiaire de l'activité

enzymatique et de l'intégrité membranaire par cytométrie en flux) après 1h30 lors ce couplage. Des études complémentaires visant à comprendre l'origine de cette altération de l'état physiologique ont d'abord montré un effet cumulé des différents stress observés séparément (inhibition induite par les métabolites et toxicité de la fraction soluble des composants de la phase extractante, probablement liée à une interaction de ces molécules solubilisées avec la membrane bactérienne conduisant à une altération de celle-ci). L'impact de la *phase level toxicity* a ensuite été constaté par l'intermédiaire d'analyses par cytométrie en flux, en ampoules et directement en contacteur. Ces résultats ont donc permis de poser clairement l'hypothèse d'un contact direct entre les bactéries et la phase extractante au niveau des pores de la membrane du contacteur.

En résumé, le travail réalisé a permis d'évaluer la nature et l'intensité des inhibitions induites sur les bactéries productrices par les métabolites de la voie de biosynthèse du 3-HP et d'avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués. Un procédé d'extraction du 3-HP au sein d'un milieu aqueux a été conçu et une étude approfondie a permis d'identifier les mécanismes limitant le transfert du 3-HP dans ce procédé. Enfin, l'approche intégrée a permis d'évaluer et de comprendre l'impact du couplage de procédés sur les performances d'extraction et l'état physiologique des bactéries productrices. A l'heure actuelle, la forte toxicité observée lors de la mise en œuvre de l'extraction *in situ* de la molécule d'intérêt pendant la bioconversion constitue encore un verrou à une optimisation de la production biotechnologique de 3-HP par cette approche.

Les résultats obtenus au cours de ce projet, qui constitue la première étude dédiée à la bioconversion extractive du 3-HP, ouvrent cependant des pistes pour lever les verrous rencontrés, ce qui offre de **nombreuses perspectives de travail à court et moyen termes**.

L'impact des conditions de croissance de *L. reuteri* sur ses performances de bioconversion du glycérol en 3-HP n'a pas été spécifiquement étudié au cours de ce projet. Plusieurs travaux relatent l'importance de cette première étape, notamment pour la préparation de la machinerie enzymatique de l'opéron pdu par ajout de molécules inductrices (glycérol ou 1,2-propanediol, Sriramulu *et al.* 2008, Dishisha *et al.* 2014). De même, la composition du milieu de culture constitue un paramètre majeur pour obtenir des bactéries dans un état physiologique optimal pour la bioconversion. Ce travail mené sur l'impact des conditions de croissance permettrait également d'approfondir la compréhension des mécanismes biologiques à l'origine de l'adaptation et de la

résistance des bactéries aux stress ultérieurs provoqués par la bioconversion (stress acide par exemple).

Même s'il a été vérifié qu'elle n'était pas génératrice de stress, l'étape de lavage entre croissance et bioconversion a été basée sur l'état de l'art et n'a pas été optimisée (nombre d'étapes, type de tampon, barème de centrifugation). La présence de sels résiduels, issus de cette phase de lavage, dans le milieu de bioconversion constitue vraisemblablement la principale cause de la diminution du rendement d'extraction observée lors des essais avec milieu réel. Ainsi, une nouvelle stratégie de lavage des cellules, incluant éventuellement un changement de tampon (PPB à l'heure actuelle) doit être envisagée pour la suite du projet.

Concernant la compréhension des mécanismes à la base des effets inhibiteurs provoqués par les métabolites de la voie, notamment par le 3-HP, des analyses transcriptomiques pourraient être mises en œuvre, afin de valider l'hypothèse de l'implication de cette molécule dans la génération d'un stress oxydatif ou dans une acidification du cytoplasme entraînant la perte d'activité des enzymes de biosynthèse et du métabolisme global. L'évaluation de l'inhibition des micro-organismes à différentes échelles d'observation permettrait également d'avancer dans la compréhension des mécanismes associés. Si des tests aux échelles de la population (cultivabilité suite à la bioconversion et cinétiques de croissance en présence de 3-HP) et de la cellule unique (marquages fluorescents spécifiques de marqueurs de l'état physiologique, détectés par cytométrie en flux) ont été réalisés dans la présente étude, des tests à l'échelle moléculaire pourraient être entrepris (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour identifier les modifications de la composition biochimique des bactéries soumises au stress induit par le 3-HP, comme déjà réalisé dans le cas du 3-HPA ; Zoumpopoulou *et al.* 2010). De même, s'il est avéré que le 3-HP et le 3-HPA ont un effet inhibiteur sur *L. reuteri*, l'action cumulée de ces deux molécules n'a pas encore été étudiée.

Les performances de production obtenues jusqu'à présent sont encore insuffisantes. Le travail entrepris concernant l'apport contrôlé du substrat (mode « fed-batch ») doit donc être poursuivi. Afin de comprendre plus précisément les déterminants métaboliques impliqués dans la production de 3-HP par *L. reuteri* (balance rédox, énergétique cellulaire...), l'impact du pH sur les performances de production et l'état physiologique des bactéries a été étudié. Une attention particulière devra être portée à l'impact de deux autres paramètres physico-chimiques : la composition de l'atmosphère et celle du milieu de bioconversion (ajout de vitamine B12 ou de

NAD⁺ par exemple), y compris en gaz dissous. Comme effectué par Zhu *et al.* (2009) avec une souche recombinante de *K. pneumoniae*, différentes conditions d'aération (aérobie, micro-aérobie, anaérobie, par injection d'air ou d'azote) pourront donc être comparées, dans l'optique de favoriser l'oxydation du 3-HPA en 3-HP.

L'un des principaux verrous à lever dans le futur concerne la problématique liée à la biocompatibilité de la phase organique extractante. L'Aliquat 336, malgré des performances d'extraction très élevées en synergie avec la TOA, a été retiré de la formulation du fait de la toxicité de sa fraction soluble en phase aqueuse. Bien que moins impactante, la toxicité au niveau moléculaire de la phase organique sélectionnée (TOA diluée dans *n*-décane) est cependant à prendre en considération, en lien avec l'effet cumulatif observé en présence des métabolites inhibiteurs de la bioconversion du glycérol (3-HPA et 3-HP), même à faible concentration.

De plus, le probable contact direct des bactéries productrices avec la phase organique au niveau des pores de la membrane du contacteur impacte leur état physiologique, conduisant à des performances moindres du procédé intégré par rapport à la bioconversion seule. Outre l'utilisation de solvants moins toxiques décrits dans la littérature (liquides ioniques, huiles végétales, alcools à longue chaîne de carbone), l'immobilisation des bactéries dans des billes de gel (alginate, chitosane, agarose, gélatine) constituerait une approche pertinente, déjà appliquée avec succès pour la production d'acide lactique (Trauth *et al.* 2001, Tik *et al.* 2001). Cette stratégie permettrait, sans éviter la toxicité de la fraction soluble de la phase organique, d'empêcher tout contact direct entre bactéries et phase extractante en les maintenant à l'intérieur du bioréacteur de production, même si elle serait à l'origine de nouvelles questions (disponibilité du substrat, sensibilité à la toxicité des métabolites). La mise en place d'une membrane de microfiltration entre le bioréacteur et le contacteur membranaire pourrait également permettre de limiter cette toxicité due au contact direct avec la phase extractante (sans empêcher celle liée à la fraction soluble), tout en soulevant potentiellement d'autres problèmes (colmatage, conduite du procédé). De même, l'utilisation d'un contacteur à membrane de nature hydrophile, au sein duquel les pores seraient remplis par la phase aqueuse, évitant le contact direct entre bactéries et phase extractante, est à étudier.

Des analyses transcriptomiques ou protéomiques pourraient également permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes à la base de la toxicité générée par les différents composants de la phase organique extractante, tant celle liée à la fraction soluble que celle due au

contact direct entre phases, conduisant à l'identification des cibles d'action de ces molécules. Approche déjà décrite dans la littérature (Sardessai and Bhosle 2002, Torres *et al.* 2011, Segura *et al.* 2012), l'identification de gènes de résistance pourrait ainsi conduire à envisager le développement de bactéries résistantes aux solvants et molécules extractantes par ingénierie métabolique.

L'intégration d'un second contacteur membranaire au sein du procédé couplé permettrait non seulement de régénérer les extractants et de récupérer le 3-HP extrait dans une phase aqueuse, mais aussi d'améliorer encore les performances d'extraction en permettant le maintien de la force motrice à une valeur maximale (Jin and Yang 1998, Wu and Yang 2003).

Ces différentes approches, ainsi qu'un travail spécifique sur la compréhension des mécanismes d'extraction, du point de vue de la réactivité des espèces et du transfert de matière, et sur le développement d'un modèle mécanistique de l'extraction réactive du 3-HP, sont actuellement entreprises dans le cadre de la thèse de Florian Chemarin (débutée en octobre 2014 sous la codirection du Pr. V. Athès et du Dr. M. Moussa; co-financement Chaire ABI et INRA).

De manière plus prospective, la mise au point de techniques d'extraction *in situ* innovantes, telles que l'extraction par des polymères à empreintes moléculaires (MIPs), pourrait également constituer une alternative intéressante pour la récupération sélective du 3-HP en milieu de bioconversion (Lye and Woodley 1999). L'utilisation des MIPs, qui se caractérisent par une sélectivité comparable à celle des récepteurs biologiques, se révèle en effet particulièrement efficace dès lors que les cibles sont de petites molécules organiques fonctionnalisées, permettant l'établissement d'interactions spécifiques (Derrien and Bayouhd 2008). Alors que l'ERCM ne serait pas envisageable en cas de couplage entre croissance et bioconversion, du fait de la présence d'acide lactique en plus du 3-HP dans le milieu, une extraction par les MIPs serait sélective de l'isomère désiré. En effet, ces polymères ont prouvé leur capacité de discrimination sur la base de la différence de position d'un unique groupement hydroxyle (Whitcombe *et al.* 1995).

Enfin, déjà décrite dans la littérature pour l'optimisation de la production de 3-HP, l'amélioration ciblée de micro-organismes par ingénierie métabolique constituerait une approche intéressante et complémentaire de la bioconversion extractive. C'est l'objectif de la thèse d'Aïda Kalantari, débutée en 2013 sous la direction du Pr. I. Mijakovic et également financée par la Chaire ABI. Ce projet vise à (i) introduire la voie de biosynthèse du 3-HP chez *Bacillus subtilis* permettant une production simultanée à la croissance ; (ii) augmenter la résistance naturelle de

l'hôte envers le 3-HP et le 3-HPA ; (iii) maximiser la production du 3-HP en optimisant la répartition des ressources de la cellule et en utilisant au mieux le réseau de régulation métabolique existant. Ainsi, l'objectif final consisterait en la mise en œuvre de la souche optimisée par ingénierie métabolique dans le procédé intégré.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce projet de thèse et les perspectives qui en découlent soulignent bien l'importance d'une approche multidisciplinaire pour lever les nombreux verrous existants. Ainsi, le génie microbiologique, le génie des procédés séparatifs, la chimie analytique et organique ont été les disciplines principalement mobilisées dans ce travail. Les futurs travaux nécessiteront quant à eux d'acquérir et d'assembler des connaissances supplémentaires issues de la biologie moléculaire, de la bioinformatique, du génie chimique ou encore d'utiliser la modélisation en vue de l'optimisation du procédé. Cette multidisciplinarité doit ainsi évoluer pour devenir réellement transdisciplinarité et constituer la clef de voûte indispensable à l'accomplissement d'un travail de cette envergure, depuis le laboratoire vers l'échelle pilote puis, éventuellement, industrielle. C'est tout l'intérêt de la démarche intégrative développée dans le cadre de ce projet.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abeles RH, Brownstein AM, Randles CH (1960) β -hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta.* 41:530–531.

Agler MT, Spirito CM, Usack JG, Werner JJ, Angenent LT (2012) Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. *Energy Environ. Sci.* 5:8189–8192.

Agrahari GK, Pandey N, Verma N, Bhattacharya PK (2014) Membrane contactor for reactive extraction of succinic acid from aqueous solution by tertiary amine. *Chem. Eng. Res. Design.* 92:2705–2714.

Ahrné S, Nobaek S, Jeppsson B, Adlerberth I, Wold AE, Molin G (1998) The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J. Appl. Microbiol.* 85:88–94.

Alexandratos SD (2009) Ion-exchange resins: a retrospective. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48:388–398.

Andersen G, Björnberg O, Polakova S, Pynyaha Y, Rasmussen A, Møller K, Hofer A, Moritz T, Sandrinl MPB, Merico AM, Compagno C, Åkerlund HE, Gojkovic Z, Piškur J (2008) A second pathway to degrade pyrimidine nucleic acid precursors in eukaryotes. *J. Mol. Biol.* 380:656–66.

Andreeßen B, Lange AB, Robenek H, Steinbüchel A (2010) Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:622–626.

Andreeßen B, Steinbüchel A (2010) Biosynthesis and biodegradation of 3-hydroxypropionate-containing polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4919–4925.

Ansede JH, Pellechia PJ, Yoch DC (1999) Metabolism of acrylate to β -hydroxypropionate and its role in dimethylsulfoniopropionate lyase induction by a salt marsh sediment bacterium, *Alcaligenes faecalis* M3A. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5075–5081.

Arceo E, Marsden P, Bergman RG, Ellman JA (2009) An efficient didehydroxylation method for the biomass-derived polyols glycerol and erythritol. Mechanistic studies of a formic acid-mediated deoxygenation. *Chem. Commun.* 23:3357–3359.

Arora MB, Hestekin JA, Snyder SW, St.Martin EJ, Lin YJ, Donnelly MI, Millard CS (2007) The separative bioreactor: a continuous separation process for the simultaneous production and direct capture of organic acids. *Sep. Sci. Technol.* 42:2519–2538.

Arqués JL, Fernandez J, Gaya P, Nunez M, Rodriguez E, Medina M (2004) Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 95:225–229.

Arqués JL, Rodriguez E, Nunez M, Medina M (2011) Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. *Food Cont.* 22:457–461.

Årsköld E, Lohmeier-Vogel E, Cao R, Roos S, Rådström P, van Niel EWJ (2008) Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *J. Bacteriol.* 190:206–212.

Ashok S, Raj SM, Rathnasingh C, Park S (2011) Development of recombinant *Klebsiella pneumoniae* Δ dhaT strain for the co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:1253–1265.

Ashok S, Sankaranarayanan M, Ko Y, Jae K-E, Ainala SK, Kumar V, Park S (2013a) Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by recombinant *Klebsiella pneumoniae* Δ dhaT Δ yhqD which can produce vitamin B12 naturally. *Biotechnol. Bioeng.* 110:511–24.

Ashok S, Raj SM, Ko Y, Sankaranarayanan M, Zhou S, Kumar V, Park S (2013b) Effect of puuC overexpression and nitrate addition on glycerol metabolism and anaerobic 3-hydroxypropionic acid production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* Δ glpK Δ dhaT. *Metab. Eng.* 15:10–24.

Ataei SA, Vasheghani-Farahani E (2008) *In situ* separation of lactic acid from fermentation broth using ion exchange resins. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35:1229–1233.

Athankar KK, Varma MN, Shende DZ, Yoo CK, Wasewar KL (2013) Reactive extraction of phenylacetic acid with tri-*n*-butyl phosphate in benzene, hexanol, and rice bran oil at 298 K. *J. Chem. Eng. Data.* 58:3240–3248.

Athankar KK, Wasewar KL, Varma MN, Shende DZ (2015) Relative basicity approach for separation of α -toluic acid with triglycerides of fatty acids by reactive extraction. *J. Ind. Eng. Chem.* 22:240–247.

Axelsson L, Chung TC, Dobrogosz WJ, Lindgren SE (1989) Production of a broad-spectrum antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2:131–136.

B

Baba H, Tanahashi N, Kumagai Y, Doi Y (1992) Effects of molecular structure on enzymatic degradation of polyesters. *J. Chem. Soc. Jpn.* 5:527–533.

Bar R, Gainer JL (1987) Acid fermentation in water-organic solvent two-liquid-phase systems. *Biotechnol. Prog.* 3:109–114.

Bar R (1988) Effect of interphase mixing on a water-organic solvent two-liquid-phase microbial system: ethanol fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 43:49–62.

Barbirato F, Grivet JP, Soucaille P, Bories A (1996) 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. *Appl Environ. Microbiol.* 62:1448–1451.

Basu R, Sirkar KK (1992) Citric-acid extraction with microporous hollow fibers *Solvent Extr. Ion Exc.* 10:119–143.

- Bauer R, du Toit M, Kossmann J (2010a) Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *Int. J. Food Microbiol.* 137:28–31.
- Bauer R, Cowan DA, Crouch A (2010b) Acrolein in wine: Importance of 3-hydroxypropionaldehyde and derivatives in production and detection. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3243–3250.
- Berg IA, Kockelkorn D, Buckel W, Fuchs G (2007) A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science* 318:1782–1786.
- Bergman RG, Ellman JA, Rebollo EA (2008) Conversion of glycerol from biodiesel production to allyl alcohol, U.S. Provisional Patent Application, No. WO 2008092115 A1.
- Bernardo P, Clarizia G (2011) Potential of membrane operations in redesigning industrial processes. The ethylene oxide manufacture. *Chem. Eng. Transactions.* 25:617–622.
- Bizek V, Horacek I, Rericha R, Kousova M (1992) Amine extraction of hydroxycarboxylic acids. 1. Extraction of citric acid with 1-octanol/n-heptane solutions of trialkylamine. *Ind. Eng. Chem. Res.* 31:1554–1662.
- Bizek V, Horacek I, Kousova M (1993) Amine extraction of citric acid: effect of diluent. *Chem. Eng. Sci.* 46:1447–1457.
- Boontawan P, Kanchanathawee S, Boontawan A (2011) Extractive fermentation of l-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using electrodeionization (EDI) technique. *Biochem. Eng. J.* 54:192–199.
- Booth IR, Cash P, O'Byrne C (2002) Sensing and adapting to acid stress. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81:33–42.
- Boucif N (2012) Modélisation et simulation de contacteurs membranaires pour les procédés d'absorption de gaz acides par solvant chimique. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. 133 p.
- Boyaval P, Corre C, Madec MN (1994) Propionic acid production in a membrane bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 16:883–886.
- Bozell JJ, Petersen GR (2010) Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy's "Top 10" revisited. *Green. Chem.* 12:539–554.
- Braibant M, Gilot P, Content J (2000) The ATP binding cassette (ABC) transport system of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:449–467.
- Breeuwer P, Abee, T (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 55:193–200.

Breeuwer P, Abee T (2004) Assessment of the membrane potential, intracellular pH and respiration of bacteria employing fluorescence techniques. *Mol. Microb. Ecol. Manual* 2:1563–1580.

Brethauer S (2007) *In-situ* product removal as an approach to improve the fermentative production of clavulanic acid. PhD Thesis. ETH Zürich.

Bringas E, San Román MF, Urtiaga AM, Ortiz I (2013) Integrated use of liquid membranes and membrane contactors: Enhancing the efficiency of L-L reactive separations. *Chem. Eng. Process.* 67:120–129.

Brink LES, Tramper J (1985) Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.* 27:1258–1269.

Bulthuis BA, Whited GM, Trimbur DE, Gatenby AA (2002) Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant organisms comprising genes for vitamin B12 transport. Patent application No. US 6432686.

Burgé G, Saulou-Bérion C, Moussa M, Allais F, Athès V, Spinnler HE (2015a) Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or Phosphoketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains. *J. Microbiol.* 53:702–710.

Burgé G, Saulou-Bérion C, Moussa M, Pollet B, Flourat A, Allais F, Athès V, Spinnler HE (2015b) Diversity of *Lactobacillus reuteri* strains in converting glycerol into 3-hydroxypropionic acid. *App. Biochem. Biotechnol.* 177:923–939.

Burgé G, Flourat AL, Pollet B, Spinnler HE, Allais F (2015c) 3-Hydroxypropionaldehyde (3-HPA) quantification by HPLC using synthetic acrolein-free 3-hydroxypropionaldehyde system as analytical standard. *RSC Adv.* 5:92619–92627.

Burgé G, Chemarin F, Moussa M, Saulou-Bérion C, Allais F, Spinnler HE, Athès V (2016) Reactive extraction of bio-based 3-hydroxypropionic acid assisted by hollow-fiber membrane contactor using TOA and Aliquat 336 in *n*-decanol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (submitted)

C

Carlescu A, Blaga AC, Galaction AI, Turnea M, Cașcaval D (2014) Interfacial mass transfer in the reactive extraction process of succinic acid from viscous aqueous solutions. *Sep. Sci. Technol.* 49: 974–980.

Casal M, Paiva S, Queiros O, Soares-Silva I (2008) Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:974–994.

- Casas IA, Dobrogosz WJ (2000) Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12:247–285.
- Caşcaval D, Kloetzer L, Galaction AI, Vlysidis A, Webb C (2013a) Fractionation of carboxylic acids mixture obtained by succinic fermentation using reactive extraction. *Sep. Sci. Technol.* 48:634–643.
- Caşcaval D, Poştaru M, Galaction AI, Kloetzer L, Blaga AC (2013b) Fractionation of carboxylic acids mixture obtained by *P. acidipropionici* fermentation using pertraction with tri-*n*-octylamine and 1-octanol. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52:2685–2692.
- Caşcaval D, Cârlescu A, Galaction AI, Turnea M (2013c) Study on biomass impact on the reactive extraction of succinic acid from *Actinobacillus succinogenes* suspensions. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52:10261–10268.
- Cath TY, Gormly S, Beaudry EG, Flynn MT, Dean Adams V, Childress AE (2005) Membrane contactor processes for waste-water reclamation in space. Part I. Direct osmotic concentration as pre-treatment for reverse osmosis. *J. Membr. Sci.* 257:85–98.
- Celinska E (2010) Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. *Biotechnol. Adv.* 28:519–530.
- Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, Kuhad RC (2007) Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.* 98:1947–1950.
- Chen G, Yang D, Xiao Y, Chen H (2011) Influence of conditions on reuterin accumulation by the resting cell biotransformation process. *Chinese J. Chem. Eng.* 19:1023–1027.
- Chen G, Chen J (2013) A novel cell modification method used in biotransformation of glycerol to 3-HPA by *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:4325–4332.
- Chen CN, Sung HW, Liang HF, Chang WH (2002) Feasibility study using a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* in sterilizing and crosslinking biological tissues. *J. Biomed. Mater. Res.* 61:360–369.
- Chen YC, Chang WH, Chang Y, Huang CM, Sung HW (2004) A natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for hemoglobin polymerization as a blood substitute. *Biotechnol. Bioeng.* 87:34–42.
- Chen Y, Bao J, Kim IK, Siewers V, Nielsen J (2014) Coupled incremental precursor and co-factor supply improves 3-hydroxypropionic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabol. Eng.* 22:104–109.

- Chen Z, Liu H, Liu D (2009) Regulation of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in *Klebsiella pneumoniae* by overexpression of *dhaT* and *dhaD* genes. *Enzyme Microbiol. Technol.* 45:305–309.
- Choi K, Jeon BS, Kim BC, Oh MK, Um Y, Sang BI (2013) *In situ* biphasic extractive fermentation for hexanoic acid production from sucrose by *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171:1094–1107.
- Choi S, Song CW, Shin JH, Lee SY (2015) Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metabol. Eng.* 28:223–239.
- Chotani G, Dogde T, Hsu A, Kumar M, LaDuca R, Trimbur D, Weyler W, Sanford K (2000) The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim. Biophys. Acta* 1543:434–455.
- Choudhury B, Basha A, Swaminathan T (1998) Study of lactic acid extraction with higher molecular weight aliphatic amines. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 72:111–116.
- Christen P, Minier M, Renon H (1990) Ethanol extraction by supported liquid membrane during fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 36:116–123.
- Circle SJ, Stone L, Boruff CS (1945) Acrolein determination by means of tryptophan. *Ind. Eng. Chem.* 17:259–262.
- Clements MO, Watson SP, Foster S (1999) Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *J. Bacteriol.* 181:3898–3903.
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G (2007) Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol.* 7:101–109.
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Le Blay G (2008) Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an *in vitro* model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63:56–64.
- Ciriminna R, Della Pina C, Rossi M, Pagliaro M (2014) Understanding the glycerol market. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, Special feature.
- Cockrem MCM, Johnson PD (1993) Recovery of lactate and lactic acid from fermentation broth. Patent application No. US 5,210,296.
- Coelhos IM, Silvestre E, Viegas RMC, Crespo JESG, Carrondo MJT (1997) Membrane-based solvent extraction and stripping of lactate in hollow-fibre contactors. *J. Membr. Sci.* 134:19–32.
- Colin T, Bories A, Moulin G (2000) Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 201–205.

Corma A, Iborra S, Velty A (2007) Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals. *Chem. Rev.* 107:2411–2502.

Corrieu G, Spinnler HE, Jomier Y, Picque D (1988) Automated system to follow up and control the acidification activity of lactic acid starters. Patent application No. FR 2 629 612 (INRA).

Corrieu G, Luquet FM (2008) *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Lavoisier. 849 p.

Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:777–788.

D

Dahuron L (1987) Designing liquid-liquid extractions in hollow fiber modules. PhD Thesis. University of Minnesota. 162 p.

da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 27:30–39.

Datta D, Kumar S (2011) Reactive extraction of glycolic acid using tri-n-butyl phosphate and tri-n-octylamine in six different diluents: experimental data and theoretical predictions. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50:3041–3048.

Datta D, Kumar S, Wasewar KL (2011) Reactive extraction of benzoic acid and pyridine-3-carboxylic acid using organophosphoric and aminic extractant dissolved in binary diluent mixtures. *J. Chem. Eng. Data.* 56:3367–3375.

Datta D, Kumar S (2014) Reactive extraction of pyridine-2-carboxylic acid (picolinic acid) using nontoxic extractant and diluent systems. *J. Chem. Eng. Data.* 59:1540–1548.

Dave H, Ramakrishna C, Desai JD (1996) Degradation of acrylic acid by fungi from petrochemical activated sludge. *Biotechnol. Lett.* 18:963–964.

Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC, Janssens D (1994) Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques*. Vol 1. De Roissard H et Luquet FM (ed.). Loriga: Uriage. 25-116.

Della Pina C, Falletta E, Prait L, Rossi M (2008) Selective oxidation using gold. *Chem. Soc. Rev.* 37:2077–2095.

Della Pina C, Falletta E, Rossi M (2009) Oxidation of allyl alcohol in the presence of a gold catalyst: A route to 3-Hydroxypropionic acid. *Chem. Sus. Chem.* 2:57–58.

Della Pina C, Falletta E, Rossi M (2011) A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid. *Green Chem.* 13:1624–1632.

D'Elia NA, Dahuron L, Cussler EL (1986) Liquid-liquid extractions with microporous hollow fibers. *J. Membr. Sci.* 29:309–319.

- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. App. Bacteriol.* 23:130–135.
- Demirci A, Pometto III AL, Harkins KR (1999) Rapid screening of solvents and carrier compounds for lactic acid recovery by emulsion liquid extraction and toxicity on *Lactobacillus casei* (ATCC 11443). *Biosepar.* 7:297–308.
- Demirci A, Cotton JC, Pometto III AL, Harkins KR, Hinz PN (2003) Resistance of *Lactobacillus casei* in plastic-composite-support biofilm reactors during liquid membrane extraction and optimization of the lactic acid extraction system. *Biotechnol. Bioeng.* 83:749–759.
- Derrien D, Bayouhd S (2008) Polymères à empreintes moléculaires, intérêt et applications pour l'analyse. *Spectra Analyse.* 260:30–34.
- Dishisha D, Pereyra LP, Pyo SH, Britton RA, Hatti-Kaul R (2014) Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microb. Cell Fact.* 13:76–85.
- Dobrogosz WJ, Casas IA, Pagano GA, Sjöberg BM, Talarico TL, Karlsson M (1989) *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota in the regulatory and protective role of the normal microflora (R. Grubb, T. Midtvedt, and E. Norin, eds.) Macmillan Press Ltd., London.
- Dobrogosz WJ, Lindgren SE (1994) Method of determining the presence of an antibiotic produced by *Lactobacillus reuteri*. US Patent No. 5,352,586.
- Dobrogosz WJ, Lindgren SE (1995). Method for inhibiting microorganism growth. US Patent No. 5,439,678.
- Dobson R, Gray V, Rumbold K (2012) Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39:217–26.
- Doleyres Y (2003) Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat. Université de Laval (Québec). 148p.
- Doleyres Y, Fliss I, Lacroix C (2004a) Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology. *Biotechnol. Progr.* 20:145–150.
- Doleyres Y, Fliss I, Lacroix C (2004b) Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactococcus lactis* produced during continuous mixed-strain immobilized-cell fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 97:527–539.
- Doleyres Y, Beck P, Vollenweider S, Lacroix C (2005) Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:467–474.
- Drozdzyńska A, Leja K, Czaczyk K (2011) Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol, *BioTechnologia* 92:92–100.

Dunn-Coleman NS, Gatenby AA, Valle F (2006) Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant organisms comprising genes for coenzyme B12 synthesis. Patent application No. US 7074608.

Dupuy A (2010) Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire : Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huiles essentielles d'agrumes. Thèse de doctorat. AgroParisTech. 305 p.

Dupuy A, Athes V, Schenk J, Jenelten U, Souchon A (2011) Experimental and theoretical considerations on breakthrough pressure in membrane-based solvent systems: Focus on citrus essential oil/hydro-alcoholic solvent systems with low interfacial tension. *J. Membr. Sci.* 378:203–213.

E

El-Ziney MG, Arneborg N, Uyttendaele M, Debevere J, Jakobsen M (1998) Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 20:913–916.

F

Fernandes P, Prazeres DMF, Cabral JMS (2003) Membrane-assisted extractive bioconversions. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 80:115–148.

Ferreira BS (2011) Ten-year forecast of disruptive technologies in industrial biotechnology to 2021. Leatherhead: Pira International Ltd, 1–124.

Freeman A, Woodley JM, Lilly MD (1993) *In-situ* product removal as a tool for bioprocessing. *Biotechnol.* 11:1007–1012.

Frese SA, Benson AK, Tannock GW, Loach DM, Kim J, Zhang M, Oh PL, Heng NCK, Patil PB, Juge N, MacKenzie DA, Pearson BM, Lapidus A, Dalin E, Tice H, Goltsman E, Land M, Hauser L, Ivanova N, Kyrpides NC, Walter J (2011) The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*. *PLoS Genet.* 7:e1001314.

G

Galaction AI, Carlescu A, Turnea M, Cascaval D (2012) Direct extraction of propionic acid from *Propionibacterium acidipropionici* broths with tri-n-octylamine. *Chem. Eng. Technol.* 35:1657–1663.

Gao MT, Shimamura T, Ishida N, Nagamori E, Takahashi H, Umemoto S, Omasa T, Ohtake H (2009a) Extractive lactic acid fermentation with tri-n-decylamine as the extractant. *Enzyme Microb. Technol.* 44:350–354.

Gao MT, Shimamura T, Ishida N, Takahashi H (2009b) Application of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* to extractive lactic acid fermentation. *Biochem. Eng. J.* 44:251–255.

- Gao M-T, Shimamura T, Ishida N, Takahashi H (2011) pH-uncontrolled lactic acid fermentation with activated carbon as an adsorbent. *Enzym. Microb. Technol.* 48:526–530.
- Garai-Ibabe G, Ibarburu I, Berregi A, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Irastorza A, Dueñas MT (2008) Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *Int. J. Food Microbiol.* 121:253–61.
- Garlotta D (2002) A literature review of poly(lactic acid). *J. Pol. Environ.* 9:63–84.
- Garrigues C, Loubière P, Lindley ND, Coccagn-Bousquet M (1997) Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *J. Bacteriol.* 179:5282–5287.
- Garrigues C, Mercade M, Coccagn-Bousquet M, Lindley ND, Loubière P (2001) Regulation of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* depends on the imbalance between catabolism and anabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 74:108–115.
- Gilliland SE (1990) Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:175–188.
- Gokarn RR, Selifonova OV, Jessen HJ, Steven JG, Selmer T, Buckel W (2012) 3-hydroxypropionic acid and other organic compounds. Patent application No. PCT/US2001/043607.
- Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65:45–80.
- Gorden J, Zeiner T, Brandenbusch C (2015) Reactive extraction of cis,cis-muconic acid. *Fluid Phase Equilib.* 393:78–84.
- Gresham TL, Jansen JE, Shaver FW (1948) β -Propiolactone. I. Polymerization reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 70:998–999.
- Groot WJ (2011) Process for manufacturing succinic acid. Patent application No. WO 2011098598 A1 20110818.
- Gu Z, Glatz BA, Glatz CE (1998) Propionic acid production by extractive fermentation. I. Solvent considerations. *Biotechnol. Bioeng.* 57:454–461.

H

- Hábová V, Melzoch K, Rychtera M (2004) Modern method of lactic acid recovery from fermentation broth. *Czech J. Food Sci.* 22:87–94.
- Hall RH, Stern ES (1950) Acid-catalysed hydration of acraldehyde. Kinetics of the reaction and isolation of 3-HPA. *J. Chem. Soc.* 1950:490–498.

- Halm M, Hornbæk T, Arneborg N, Sefa-Dedeh S, Jespersen L (2004) Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. *Int. J. Food Microbiol.* 94:97–103.
- Hansen EB (2002) Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.* 78:119–131.
- Hao J, Lin R, Zheng Z, Sun Y, Liu D (2008) 3-Hydroxypropionaldehyde guided glycerol feeding strategy in aerobic 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35:1615–1624.
- Harington T, Hossain MM (2008) Extraction of lactic acid into sunflower oil and its recovery into an aqueous solution. *Desalinization.* 218:287–296.
- Heinrich D, Andreeßen B, Madkour MH, Al-Ghamd MA, Shabbaj I, Steinbüchel A (2013) From waste to plastic: synthesis of poly(3-hydroxypropionate). *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3582–3589.
- Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, Keweloh H, de Bont JAM (1994) Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* 12:409–415.
- Henry CS, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V (2010) Discovery and analysis of novel metabolic pathways for the biosynthesis of industrial chemicals: 3-hydroxypropanoate. *Biotechnol. Bioeng.* 106:462–473.
- Hepburn AJ, Daugulis AJ (2012) The use of CO₂ for reversible pH shifting, and the removal of succinic acid in a polymer-based two-phase partitioning bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87:42–50.
- Heyberger A, Prochfizka J, Volaufova E (1998) Extraction of citric acid with tertiary amine--third-phase formation. *Chem. Eng. Sci.* 53:515–521.
- Holo H (1989) *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hydroxypropionate, a possible intermediate in the assimilation of CO₂ and acetate. *Arch. Microbiol.* 151:252–256.
- Honda H, Toyama Y, Takahashi H, Nakareko T, Kobayashi T (1995) Effective lactic acid production by two-stage extractive fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 79:589–593.
- Hong YK, Hong WH, Han DH (2001) Application of reactive extraction to recovery of carboxylic acids. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6:386–394.
- Hornig YT, Chang KC, Chou TC, Yu CJ, Chien CC, Wei YH, Soo PC (2010) Inactivation of dhaD and dhaK abolishes by-product accumulation during 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:707–716.
- Hossain MM, Maisuria JL (2008) Effects of organic phase, fermentation media, and operating conditions on lactic acid extraction. *Biotechnol. Prog.* 24:757–765.

Hügler M, Huber H, Stetter KO, Fuchs G (2003) Autotrophic CO₂ fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). *Arch. Microbiol.* 179:160–173.

Huang H, Yang ST, Ramey DE (2004) A hollow-fiber membrane extraction process for recovery and separation of lactic acid from aqueous solution. *App. Biochem. Biotechnol.* 113-116:671–688.

Huang Y, Li Z, Shimizu K, Ye Q (2012) Simultaneous production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol by a recombinant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Bioresour. Technol.* 103:351–359.

Huang Y, Li Z, Shimizu K, Ye Q (2013) Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* expressing aldH under microaerobic conditions. *Bioresour. Technol.* 128:505–512.

Hughenoltz J, Smid EJ (2002) Nutraceutical production with foodgrade microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:497–507.

I

Ichikawa M, Nakamura K, Yoshie N, Asakawa N, Inoue Y (1996) Morphological study of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate). *Macromol. Chem. Phys.* 197:2467–2480.

Itoh T (1992) Functional benefits from lactic acid bacteria used in cultured milk. *Anim. Sci. Technol.* 63:1276–1289.

J

Jeon BS, Moon C, Kim BC, Kim H, Um Y, Sang BI (2013) *In situ* extractive fermentation for the production of hexanoic acid from galactitol by *Clostridium* sp. BS-1. *Enzym. Microb. Technol.* 53:143–51.

Jiang X, Meng X, Xian M (2009) Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:995–1003.

Jin L, Tao L, Pavlova SI, So JS, Kiwanuka N, Namukwaya Z, Saberbein BA, Wawer M (2007) Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea. *J. Appl. Microbiol.* 102:1107–1115.

Jin Z, Yang ST (1998) Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol. Prog.* 14:457–465.

Joglekar HG, Rahman I, Babu S, Kulkarni BD, Joshi A (2006) Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid, *J. Sep. Purif. Technol.* 52:1–17.

Jolly J, Hitzmann B, Ramalingam S, Ramachandran KB (2014) Biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol with *Lactobacillus reuteri*: Effect of operating variables. *J. Biosc. Bioeng.* 118:188–194.

Juang RS, Huang RH (1997a) Kinetic studies on lactic acid extraction with amine using a microporous membrane-based stirred cell. *J. Membr. Sci.* 129:185–196.

Juang RS, Huang RH (1997b) Equilibrium studies on reactive extraction of lactic acid with an amine extractant. *Chem. Eng. J.* 65:47–53.

Juang RS, Huang RH, Wu RT (1997) Separation of citric and lactic acids in aqueous solutions by solvent extraction and liquid membrane processes. *J. Membr. Sci.* 136:89–99.

Juang RS, Lee SH, Huang RH (1998) Modeling of amine-facilitated liquid membrane transport of binary organic acids. *Sep. Sci. Technol.* 33:2379–2395.

Juang RS, Wu RT (1999) Extraction of acetate from simulated waste solutions in chloromycetin production. *Sep. Purif. Technol.* 17:225–233.

Jung IW, Lee JW, Min WK, Park YC, Seo JH (2015) Simultaneous conversion of glucose and xylose to 3-hydroxypropionic acid in engineered *Escherichia coli* by modulation of sugar transport and glycerol synthesis. *Bioresour. Technol.* 198:709–716.

Jung WS, Kang JH, Chu HS, Choi IS, Cho KM (2014) Elevated production of 3-hydroxypropionic acid by metabolic engineering of the glycerol metabolism in *Escherichia coli*. *Metabol. Eng.* 23:116–122.

K

Kächele M, Monakhova YB, Kuballa T, Lachenmeier DW (2014) NMR investigation of acrolein stability in hydroalcoholic solution as a foundation for the valid HS-SPME/GC–MS quantification of the unsaturated aldehyde in beverages. *Anal. Chim. Acta* 820:112–118.

Kahya E, Bayraktar E, Mehmetoglu U (2001) Optimization of process parameters for reactive lactic acid extraction. *Turk J. Chem.* 25:223–230.

Kandler O, Stetter KO, Köhl R (1980) *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a new species of heterofermentative *Lactobacilli*. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Orig. C.* 1:264–269.

Kaur G, Srivastava AK, Chand S (2012) Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochem. Eng. J.* 64:106–118.

Kaur G, Elst K (2014) Development of reactive extraction systems for itaconic acid: a step towards in situ product recovery for itaconic acid fermentation. *RSC Adv.* 4:45029–45039.

Kerfeld CA, Heinhorst S, Cannon GC (2010) Bacterial microcompartments. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:391–408.

Kertes AS, King CJ (1986) Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. *Biotechnol. Bioeng.* 28:269–282.

- Keshav A, Wasewar KL, Chand S (2008a) Extraction of propionic acid with tri-*n*-octyl amine in different diluents. *Sep. Purif. Technol.* 63:179–183.
- Keshav A, Wasewar KL, Chand S (2008b) Reactive extraction of propionic acid using tri-*n*-octylamine, tri-*n*-butyl phosphate and Aliquat 336 in sunflower oil as diluent. *J Chem. Technol. Biotechnol.* 84:484–489.
- Keshav A, Wasewar KL, Chand S (2009a) Recovery of propionic acid from an aqueous stream by reactive extraction: effect of diluents. *Desalination* 244:12–23.
- Keshav A, Wasewar KL, Chand S (2009b) Recovery of propionic acid from aqueous phase by reactive extraction using quarternary amine (Aliquat 336) in various diluents. *Chem. Eng. J.* 152:95–102.
- Keshav A, Wasewar KL, Chand S (2009c) Extraction of acrylic, propionic, and butyric acid using Aliquat 336 in oleyl alcohol: equilibria and effect of temperature. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48:888–893.
- Keshav A, Norge P, Wasewar KL (2012) Reactive extraction of citric acid using tri-*n*-octylamine in nontoxic natural diluents: Part 1-Equilibrium studies from aqueous solutions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167:197–213.
- Kiani A, Bhave RR, Sirkar KK (1984) Solvent extraction with immobilized interfaces in a microporous hydrophobic membrane. *J. Membr. Sci.* 20:125–145.
- Kildegaard KR, Hallström BM, Blicher TH, Sonnenschein N, Jensen NB, Sherstyk S, Harrison SJ, Maury J, Herrgard MJ, Juncker AS, Forster J, Nielsen J, Borodina I (2014) Evolution reveals a glutathione-dependent mechanism of 3-hydroxypropionic acid tolerance. *Metabol. Eng.* 26:57–66.
- Kim GB, Kim SJ, Kim MH, Hong CU, Kang HS (2009) Development of a hollow fiber membrane module for using implantable artificial lung. *J. Membr. Sci.* 326:130–136.
- Kim JY, Kim YJ, Hong WH, Wozny G (2000) Recovery process of lactic acid using two distillation columns. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5:196–201.
- Kim KS, Pelton JG, Inwood WB, Andersen U, Kustu S, Wemmer DE (2010) The Rut pathway for pyrimidine degradation: novel chemistry and toxicity problems. *J. Bacteriol.* 192:4089–4102.
- Kim K, Kim SK, Park YC, Seo JH (2014) Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by modulation of glycerol metabolism in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* 156:170–175.
- Kim YH, Moon SH (2001) Lactic acid recovery from fermentation broth using one stage electrodialysis. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 76:169–178.
- Klaassen R, Jansen AE (2001) The membrane contactor: environmental applications and possibilities. *Env. Progress.* 20:37–43.

- Ko Y, Ashok S, Zhou S, Kumar V, Park S (2012) Aldehyde dehydrogenase activity is important to the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by recombinant *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochem.* 47:1135–1143.
- Konings WN, Lolkema JS, Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B, Driessen AJM (1997) The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 71:117–128.
- Krämer, J (1997) *Lebensmittel-Mikrobiologie*, 3. Auflage. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Krauter H, Willke T, Vorlop KD (2012) Production of high amounts of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* with strongly increased biocatalyst lifetime and productivity. *New Biotechnol.* 29:211-217.
- Krzyżaniak A, Leeman M, Vossebeld F, Visser TJ, Schuur B, de Haan AB (2013) Novel extractants for the recovery of fermentation derived lactic acid. *Sep. Purif. Technol.* 111:82–89.
- Krzyżaniak A, Schuur B, de Haan AB (2014) Equilibrium studies on lactic acid extraction with N,N-didodecylpyridin-4-amine (DDAP) extractant. *Chem. Eng. Sci.* 109:236–243.
- Kumar S, Uslu H, Datta D, Rarotra S, Rajput K (2015) Investigation of extraction of 4-oxopentanoic acid by *n,n*-dioctyloctan-1-amine in six different diluents: equilibrium study. *J. Chem. Eng. Data.* 60:1447–1453.
- Kumar V, Muges S, Jae K, Durgapal M, Ashok S, Ko Y, Sarkar R, Park S (2012) Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol using resting cells of *Klebsiella pneumoniae* J2B strain with overexpression of KGSADH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96:373–383.
- Kumar V, Ashok S, Park S (2013a) Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnol. Adv.* 31:945–961.
- Kumar V, Sankaranarayanan M, Durgapal M, Zhou S, Ko Y, Ashok S, Sarkar R, Park S (2013b) Simultaneous production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol using resting cells of the lactate dehydrogenase-deficient recombinant *Klebsiella pneumoniae* overexpressing an aldehyde dehydrogenase. *Bioresour. Technol.* 135:555–563.
- Kwak S, Park YC, Seo JH (2013) Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant *Escherichia coli* expressing *Lactobacillus brevis* dhaB and dhaR gene clusters and *E. coli* K-12 aldH. *Bioresour. Technol.* 135:432–439.
- Kyuchoukov G, Marinova M, Molinier J, Albet J, Malmay G (2001) Extraction of lactic acid by means of a mixed extractant. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40:5635–5639.
- Kyuchoukov G, Labbaci A, Albet J, Molinier J (2006) Simultaneous influence of active and “inert” diluents on the extraction of lactic acid by means of tri-*n*-octylamine (TOA) and tri-iso-octylamine (TIOA). *Ind. Eng. Chem. Res.* 45:503–510.

Kyuchoukov G, Yankov D (2012) Lactic acid extraction by means of long chain tertiary amines: a comparative theoretical and experimental study. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51:9117–9122.

L

Labbaci A, Douani M, Albet J, Kyuchoukov G (2012) Treatment of effluents issued from agro-food industries by liquid–liquid extraction of malic and lactic acids using tri-*n*-octylamine and tri-*n*-butyl phosphate. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51:12471–12478.

Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL (2005) Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol. Microbiol.* 58:1054–1073.

Leon R, Fernandes P, Pinheiro HM, Cabral JMS (1998) Whole cell bioacatalysis in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 23:483–500.

Li A, Sachdeva S, Urbanus JH, Punt PJ (2013) In-stream itaconic acid recovery from *Aspergillus terreus* fedbatch fermentation. *Ind. Biotechnol.* 9:139–145.

Li H, Mustacchi R, Knowles CJ, Skibar W, Sunderland G, Dalrymple I, Jackman SA (2004) An electrokinetic bioreactor: using direct electric current for enhanced lactic acid fermentation and product recovery. *Tetrahedron.* 60:655–661.

Li Q, Wang D, Hu G, Xing J, Su Z (2011) Integrated bioprocess for high-efficiency production of succinic acid in an expanded-bed adsorption system. *Biochem. Eng. J.* 56:150–157.

Li Z, Qin W, Dai Y (2002) Liquid-Liquid equilibria of acetic, propionic, butyric, and valeric acids with trioctylamine as extractant. *J. Chem. Eng. Data.* 47:843–848.

Liao HH, Gokarn RR, Gort SJ, Jessen HJ, Selifonova OV (2007) Production of 3-hydropropionic acid using beta-alanine/pyruvate aminotransferase. Patent application No. 20070107080.

Lilga MA, White JF, Holladay JE, Zacher AH, Muzatko DS, Orth RJ (2010) Method for conversion of β -hydroxy carbonyl compounds. Patent application No. PCT/US2007/687661 B2 (Battelle Memorial Institute).

Lindgren SE and Dobrogosz WJ (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:149–163.

Loh KD, Gyaneshwar P, Papadimiyriou EM, Fong R, Kim KS, Parales R, Zhou WI, Kustu S (2006) A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:5114–5119.

Long FA, Purchase M (1950) The kinetics of hydrolysis of β -propiolactone in acid, neutral and basic solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 72:3267–3273.

Long WS, Bhatia S, Kamaruddin A (2003) Modeling and simulation of enzymatic membrane reactor for kinetic resolution of ibuprofen ester. *J. Membr. Sci.* 219:69–89.

Lopez JL, Matson SL (1997) A multiphase/extractive enzyme membrane reactor for production of diltiazem chiral intermediate. *J. Membr. Sci.* 125:189–211.

Lopez Garzon CS, Straathof AJJ (2014) Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnol. Adv.* 32:873–904.

Loubiere P, Salou P, Leroy MJ, Lindley ND, Pareilleux A (1992) Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose/malate mixtures. *J. Bacteriol.* 174:5302–5308.

Luo LH, Seo JW, Baek JO, Oh BR, Heo SY, Hong WK, Kim DH, Kim CH (2011a) Identification and characterization of the propanediol utilization protein PduP of *Lactobacillus reuteri* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:697–703.

Luo LH, Seo JW, Oh BR, Seo PS, Heo SY, Hong WK, Kim DH, Kim CH (2011b) Stimulation of reductive glycerol metabolism by overexpression of an aldehyde dehydrogenase in a recombinant *Klebsiella pneumoniae* strain defective in the oxidative pathway. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38:991–999.

Luo LH, Kim CH, Heo SY, Oh BR, Hong WK, Kim S, Kim DH, Seo JW (2012) Production of 3-hydroxypropionic acid through propionaldehyde dehydrogenase PduP mediated biosynthetic pathway in *Klebsiella pneumoniae*. *Bioresour. Technol.* 103:1–6.

Lüthi-Peng Q, Dileme FB, Puhan Z (2002a) Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:289–296.

Lüthi-Peng Q, Schärer S, Puhan Z (2002b) Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:73–80.

Ly GJ, Woodley JM (1999) Application of *in situ* product-removal techniques to biocatalytic processes. *Trends Biotechnol.* 17:395–402.

M

Ma CQ, Li JC, Qiu JH, Wang M, Xu P (2006) Recovery of pyruvic acid from biotransformation solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:308–314.

Ma C, Zhang L, Dai J, Xiu Z (2010) Relaxing the coenzyme specificity of 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae* by rational design. *J Biotechnol.* 146:173–178.

Marinova M, Kyuchoukov G, Albet J, Molinier J, Malmay G (2004) Separation of tartaric and lactic acids by means of solvent extraction. *Sep. Purif. Technol.* 37:199–207.

Marinova M, Albet J, Molinier J, Kyuchoukov G (2005) Specific influence of the modifier (1-decanol) on the extraction of tartaric acid by different extractants. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44:6534–6538.

- Marinova NA, Yankov DS (2009) Toxicity of some solvents and extractants towards *Lactobacillus casei* cells. *Bulgarian Chem. Com.* 41:368–373.
- Martak J, Schlosser S (2007) Extraction of lactic acid by phosphonium ionic liquids. *Sep. Purif. Technol.* 57:483–494.
- Marti ME, Gurkan T, Doraiswamy LK (2011) Equilibrium and kinetic studies on reactive extraction of pyruvic acid with trioctylamine in 1-octanol. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50:13518–13525.
- Marx A, Wendisch VF, Rittmann D, Buchholz S (2007) Microbiological production of 3-hydroxypropionic acid. Patent application No WO/2007/042494.
- Matsumoto M, Otono T, Kondo K (2001) Synergistic extraction of organic acids with tri-*n*-octylamine and tri-*n*-butylphosphate. *Sep. Purif. Technol.* 24:337–342.
- Matsumoto M, Takahashi T, Fukushima K (2003) Synergistic extraction of lactic acid with alkylamine and tri-*n*-butylphosphate: effects of amines, diluents and temperature. *Sep. Purif. Technol.* 33:89–93.
- Matsumoto M, Mochiduki K, Kondo K (2004a) Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 98:344–347.
- Matsumoto M, Mochiduki K, Fukunishi K, Kondo K (2004b) Extraction of organic acids using imidazolium-based ionic liquids and their toxicity to *Lactobacillus rhamnosus*. *Sep. Purif. Technol.* 40:97–101.
- Mcgall G, Barone AD, Diggelmann M, Lockhart DJ, Caviani PAM, Chee M (2004) Methods for testing oligonucleotide arrays. Patent application No. US 0,076,987.
- Meng DC, Wang Y, Wu LP, Shen R, Chen JC, Wu Q, Chen GQ (2015) Production of poly(3-hydroxypropionate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) from glucose by engineering *Escherichia coli*. *Metabol. Eng.* 29:189–195.
- Meng X, Tsobanakis P, Malsam J, Abraham TW (2007) Process for preparing carboxylic acids and derivatives thereof I. Patent application No. US 7,186,856 B2 (Cargill, Inc.).
- Meynial-Salles I, Dorotyn S, Soucaille P (2008) A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnol. Bioeng.* 99:129–135.
- Min-tian G, Hirata M, Koide M, Takanashi H, Hano T (2004) Production of L-lactic acid by electro dialysis fermentation (EDF). *Process Biochem.* 39:1903–1907.
- Min-Tian G, Koide M, Gotou R, Takanashi H, Hirata M, Hano T (2005) Development of a continuous electro dialysis fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. *Process Biochem.* 40:1033–1036.
- Mirata MA, Heerd D, Schrader J (2009) Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. *Process Biochem.* 44:764–771.

Montiel R, Martín-Cabrejas I, Langa S, El Aouad N, Arqués JL, Reyes F, Medina M (2014) Antimicrobial activity of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* 44:1–5.

Moraes LS, Kronemberger FA, Ferraz HC, Habert AC (2015) Liquid–liquid extraction of succinic acid using a hollow fiber membrane contactor. *J. Ind. Eng. Chem.* 21:206–211.

Morales AF, Albet J, Kyuchoukov G, Malmay G, Molinier J (2003) Influence of extractant (TBP and TOA), diluent, and modifier on extraction equilibrium of monocarboxylic acids. *J. Chem. Eng. Data.* 48:874–886.

Morita H, Toh H, Fukuda S, Horikawa H, Oshima K, Suzuki T, Murakami M, Hisamatsu S, Kato Y, Takizawa T, Fukuoka H, Yoshimura T, Itoh K, O'Sullivan DJ, McKay LL, Ohno H, Kikuchi J, Masaoka T, Hattori M (2008) Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res.* 15:151–161.

Moussa M, Burgé G, Chemarin F, Bounader R, Saulou-Bérion C, Allais F, Spinnler HE Athès V (2015) Reactive extraction of 3-hydroxypropionic acid from model aqueous solutions and real bioconversion media. Comparison with its isomer 2-hydroxypropionic (lactic) acid. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* DOI: 10.1002/jctb.4813.

Mustafa S, Ahmad T, Naeem A, Shah KH, Waseem M (2010) Kinetics of chromium ion removal from tannery wastes using Amberlite IRA-400 Cl⁻ and its hybrids. *Water Air Soil Pollut.* 210:43–50.

N

Nielsen AT, Moore DW, Schuetze Jr. A. ¹³C and ¹H NMR study of formaldehyde reactions with acetaldehyde and acrolein. Synthesis of 2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol. *Pol. J. Chem.* 55:1393–1403.

Niu W, Molefe MN, Frost JW (2003) Microbial synthesis of the energetic material precursor 1,2,4-butanetriol. *J. Am. Chem. Soc.* 125:12998–12999.

Nocker A, Cheung CY, Camper AK (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Met.* 67:310–320.

O

Oliveira FS, Araújo JMM, Ferreira R, Rebelo LPN, Marrucho IM (2012) Extraction of L-lactic, L-malic, and succinic acids using phosphonium-based ionic liquids. *Sep. Purif. Technol.* 85:137–146.

P

- Pabby AK, Sastre AM (2013) State-of-the-art review on hollow fibre contactor technology and membrane-based extraction processes. *J. Membr. Sci.* 430:263–303.
- Pagliari M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, Della Pina C (2009) Recent advances in the conversion of bioglycerol into value-added products *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111:788–799.
- Paje MLF, Neilan BA, Couperwhite I (1997) A *Rhodococcus* species that drives on medium saturated with liquid benzene. *Microbiol.* 143:2975–2981.
- Peterson EC, Daugulis AJ (2014) Demonstration of *in situ* product recovery of butyric acid via CO₂-facilitated pH swings and medium development in two-phase partitioning bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 111:537–44.
- Picque D, Perret B, Latrille E, Corrieu G (1992) Caractérisation et classification de bactéries lactiques à partir de la mesure de leur cinétique d'acidification. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* 25:181–186.
- Pierre FX, Souchon I, Marin M (2001) Recovery of sulfur aroma compounds using membrane-based solvent extraction. *J. Membr. Sci.* 187:239–253.
- Pierre FX, Souchon I, Athes-Dutour V, Marin M (2002) Membrane-based solvent extraction of sulfur aroma compounds: influence of operating conditions on mass transfer coefficients in a hollow fiber contactor. *Desalination.* 148:199–204.
- Pierre FX (2002) Les contacteurs membranaires appliqués à l'extraction de composés d'arôme. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon. 169 p.
- Pieterse B, Leer RJ, Schuren FHJ, van der Werf MJ (2005) Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiol.* 151, 3881–3894.
- Pinheiro HM, Cabral JMS (1991) Effects of solvent molecular toxicity and microenvironment composition on the A⁺ dehydrogenation activity of *Arthrobacter simplex* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 37:97–102.
- Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 147:2635–2642.
- Poelarends GJ, Mazurkiewicz P, Putman M, Cool RH, van Veen HW, Konings WN (2000) An ABC-type transporter of *Lactococcus lactis* possesses an exceptionally broad substrate specificity. *Drug Resist. Updates.* 3:330–334.
- Poposka F, Nikolovski K, Tomovska R (1998) Kinetics, mechanism and mathematical modelling of extraction of citric acid with isodecanol/n-paraffins solutions of trioctylamine. *Chem. Eng. Sci.* 53:3227–3237.

Poposka FA, Prochazka J, Tomovska R, Nikolovski K, Grizo A (2000) Extraction of tartaric acid from aqueous solutions with tri-iso-octylamine (HOSTAREX A 324). Equilibrium and kinetics. Chem. Eng. Sci. 55:1591–1604.

Prasad R, Sirkar KK (1987) Solvent extraction with microporous hydrophilic and composite membranes. AIChE J. 33:1057–1066.

Prasad R, Sirkar KK (1988) Dispersion-free solvent extraction with microporous hollow-fiber modules. AIChE J. 34:177–188.

Prasad R, Sirkar KK (1989) Hollow fiber solvent extraction of pharmaceutical products: a case study. J. Membr. Sci. 47:253–259.

Prasad R, Sirkar KK (1992) Membrane-based solvent extraction. Membrane Handbook. Ho and Sirkar. New York, Chapman & Hall. 727-763.

Pursell MR, Mendes-Tassis MA, Stuckey DC (2004) Effect of fermentation broth and biosurfactants on mass transfer during liquid–liquid extraction. Biotechnol. Bioeng. 85:155–165.

R

Rahmanian A, Ghaziaskar HS (2008) Selective extraction of maleic acid and phthalic acid by supercritical carbon dioxide saturated with trioctylamine. J. Supercritical Fluids 46:118–122.

Raj SM, Rathnasingh C, Jo JE, Park S (2008) Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. Process Biochem. 43:1440–1446.

Raj SM, Rathnasingh C, Jung WC, Park SH (2009) Effect of process parameters on 3-hydroxypropionic acid production from glycerol using a recombinant *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84:649–57.

Raj SM, Rathnasingh C, Jung WC, Selvakumar E, Park S (2010) A novel NAD⁺- dependent aldehyde dehydrogenase encoded by the puuC gene of *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. Biotechnol. Bioprocess Eng. 15:131–138.

Rajagopal AN (1996) Growth of Gram-negative bacteria in the presence of organic solvents. Enzyme Microb. Technol. 19:606–613.

Ramakrishna VV, Patil SK (1984) Synergistic extraction of actinides, in Structure and Bonding new Developments. Springer-Verlag: Heidelberg, Berlin.

Ramaswamy S, Huang Bandaru HJ, Ramarao V (2013) Separation and Purification, Technologies in Biorefineries. John Wiley & Sons, 608 p.

Rao Z, Ma Z, Shen W, Fang H, Zhuge J, Wang X (2008) Engineered *Saccharomyces cerevisiae* that produces 1,3-propanediol from D-glucose. J. Appl. Microbiol. 105:1768–1776.

- Rasch M (2002) The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 72:225–231.
- Rathnasingh C, Raj SM, Jo JE, Park SH (2009) Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. *Biotechnol. Bioeng.* 104:729–739.
- Rathnasingh C, Raj SM, Lee Y, Catherine C, Ashok S, Park S (2012) Production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains. *J. Biotechnol.* 157:633–640.
- Rault A, Béal C, Ghorbal S, Ogier JC, Bouix M (2007) Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiol.* 55:35–43.
- Rault A (2009) Incidence de l'état physiologique des lactobacilles d'intérêt laitier sur leur cryotolérance. Thèse de doctorat. AgroParisTech. 269 p.
- Raynaud C, Sarçabal P, Meynial-Salles I, Croux C, Soucaille P (2003) Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100:5010–5015.
- Rechinger KB and Siegumfeldt H (2002) Rapid assessment of cell viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by measurement of intracellular pH in individual cells using Fluorescence Ratio Imaging Microscopy. *Int. J. Food Microbiol.* 75:53–60.
- Roa Engel C (2010) Integration of fermentation and cooling crystallization to produce organic acids. PhD thesis. Delft University of Technology.
- Rodriguez C, Rimaux T, Fornaguera MJ, Vrancken G, Font de Valdez G, De Vuyst L, Mozzi F (2012) Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:2519–2527.
- Rodriguez E, Arques JL, Rodriguez R, Nunez M, Medina M (2003) Reuterin production by *lactobacilli* isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:259–263.
- Roe AJ, O'Byrne C, Mc Laggan D, Booth IR (2002) Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiol.* 148:2215–2222.
- Rosander A, Connolly E, Roos S (2008) Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6032–6040.

Rütli DP, Lacroix C, Jeremic T, Mathis M, Díe A, Vollenweider S (2011) Development of a reversible binding process for *in situ* removal of 3-hydroxypropionaldehyde during biotechnological conversion of glycerol. *Biochem. Eng. J* 55:176–184.

S

Sabet-Azad R, Linares-Pasten JA, Torkelson L, Sardari RRR, Hatti-Kaul R (2013) Coenzyme A-acylating propionaldehyde dehydrogenase (PduP) from *Lactobacillus reuteri*: Kinetic characterization and molecular modeling. *Enzyme Microb. Technol.* 53: 235–242.

Sabolova E, Schlosser S, Martak J (2001) Liquid-liquid equilibria of butyric acid in water + solvent systems with trioctylamine as extractant. *J. Chem. Eng. Data.* 46:735–745.

Sardari RRR (2013) Bio-based C-3 Platform Chemical. Biotechnological Production and - Conversion of 3-Hydroxypropionaldehyde. PhD Thesis. Lund University. 60 p.

Sardari RRR, Dishisha T, Pyo SH, Hatti-Kaul R (2013a) Improved production of 3-hydroxypropionaldehyde by complex formation with bisulfite during bio-transformation of glycerol. *Biotechnol. Bioeng.* 110:1243–1248.

Sardari RRR, Dishisha T, Pyo SH, Hatti-Kaul R (2013b) Biotransformation of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde: Improved production by *in situ* complexation with bisulfite in a fed-batch mode and separation on anion exchanger. *J. Biotechnol.* 168:534–542.

Sardari RRR, Dishisha T, Pyo SH, Hatti-Kaul R (2014) Semicarbazide-functionalized resin as a new scavenger for *in situ* recovery of 3-hydroxypropionaldehyde during biotransformation of glycerol by *Lactobacillus reuteri*. *J. Biotechnol.* 192:223–230.

Sardessai Y, Bhosle S (2002) Tolerance of bacteria to organic solvents. *Res. Microbiol.* 153:263–268.

Sarkar R, Ray S and Basu S (2014) Synergism in solvent extraction and solvent extraction kinetics. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* 4:3156–3181.

Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P (2008) Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 26:100–108.

Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R (2007) *Lactobacillus reuteri* (American type culture collection strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: A prospective randomized study. *Pediatrics* 119:E124-E130.

Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol. Adv.* 27:895–913.

Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B, Britton RA (2010) The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiol.* 156:1589–1599.

- Schepers AW, Thibault J, Lacroix C (2002) *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part II: kinetic modeling and model validation. *Enzyme Microb. Technol.* 30:187–194.
- Schleifer KH, Ludwig W (1995) Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:461–467.
- Schlosser S, Kertesz R, Martak J (2005) Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction. An overview with a case study on recovery of MPCA. *Sep. Purif. Technol.* 41:237–266.
- Schöner P, Plucinski P, Nitsch W, Daiminger U (1998) Mass transfer in the shell side of cross flow hollow fiber modules. *Chem. Eng. Sci.* 53:2319–2326.
- Schügerl K (2005) Extraction of primary and secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 92:1–48.
- Schwarz M, Köpcke B, Weber R, Sterner O, Anke H (2004) 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. *Phytochem.* 65:2239–45.
- Sebastianes FLS, Cabedo N, El Aouad N, Valente AMMP, Lacava PT, Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner AA, Cortes D (2012) 3-Hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. *Curr. Microbiol.* 65:622–632.
- Segura A, Molina L, Fillet S, Krell T, Bernal P, Munoz-Rojas J, Ramos JL (2012) Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:415–421.
- Sengupta A, Basu R, Prasad R, Sirkar KK (1988a) Separation of liquid solutions by contained liquid membranes. *Sep. Sci. Technol.* 23:1735–1751.
- Sengupta A, Basu R, Sirkar KK (1988b) Separation of solutes from aqueous solutions by contained liquid membranes. *AIChE J.* 34:1698–1708.
- Senol A (2000) Extraction equilibria of formic and levulinic acids using Alamine 308: diluent and conventional solvent systems. *Sep. Purif. Technol.* 21:165–179.
- Senol A (2001) Extraction equilibria of nicotinic acid using Alamine 336 and conventional solvents: effect of diluent. *Chem. Eng. J.* 83:155–163.
- Senol A (2002) Extraction equilibria of valeric acid using (Alamine 336/diluent) and conventional solvent systems. Modeling considerations. *Chem. Eng. Process.* 41:681–692.
- Senol A (2005) Influence of conventional diluents on amine extraction of picolinic acid. *Sep. Purif. Technol.* 43:49–57.
- Senol A (2006) Influence of diluent on amine extraction of pyruvic acid using Alamine system. *Chem. Eng. Process.* 45:755–763.

- Shimamura E, Scandola M, Doi Y (1994) Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate). *Macromol.* 27:4429–4435.
- Shin CH, Kim JY, Kim JY, Kim HS, Lee HS, Mohapatra D, Ahn JW, Ahn JG, Bae W (2009a) A solvent extraction approach to recover acetic acid from mixed waste acids produced during semiconductor wafer process. *J. Hazard. Mater.* 162:1278–1284.
- Shin CH, Kim JY, Kim JY, Kim HS, Lee HS, Mohapatra D, Ahn JW, Ahn JG, Bae W (2009b) Recovery of nitric acid from waste etching solution using solvent extraction. *J. Hazard. Mater.* 163:729–734.
- Sirkar KK (2008) Membranes, phase interfaces, and separations: novel techniques and membranes-an overview. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47:5250–5266.
- Sirman T, Pyle DL, Grandison AS (1990) Extraction of citric acid using a supported liquid membrane. In *Separations for biotechnology 2*. Ed. Pyle DL. Elsevier Applied Science. London. 245–254.
- Slininger PJ, Bothast RJ, Smiley KL (1983) Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:62–67.
- Smithers-Rapra (2011) Ten-Year forecast of disruptive technologies in industrial biotechnology to 2021.
- Smithers-Rapra (2012) The future of bioplastics: Market forecasts to 2017
- Sobolov M, Smiley FA (1960) Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* 79:261–266.
- Solichien MS, O'Brien D, Hammond EG, Glatz CE (1995) Membrane-based extractive fermentation to produce propionic and acetic acids: Toxicity and mass transfer considerations. *Enzyme Microb. Technol.* 17:23–31.
- Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Oub CN, Tumwasorn S, Versalovic J (2008) Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe.* 14:166–171.
- Spinnler HE, Corrieu G (1989) Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *J. Dairy Res.* 56:755–764.
- Sriramulu DD, Liang M, Hernandez-Romero D, Raux-Deery E, Lünsdorf H, Parsons JB, Warren MJ, Prentice MB (2008) *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 produces cobalamin-dependent diol dehydratase in metabolosomes and metabolizes 1,2-propanediol by disproportionation. *J. Bacteriol.* 190:4559–4567.
- Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Van Sinderen D (2005) Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:198–203.

Stark D, von Stockar U (2003) *In situ* product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 80:149–175.

Stevens MJA, Vollenweider S, Meile L, Lacroix C (2011) 1.3 propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microb. Cell Fact.* 10:61–69.

Stevens MJA, Vollenweider S, Mertes P, Lacroix C (2013) Bisulfite as scavenger for enhanced biotechnological production of 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri*. *Biochem. Eng. J.* 79:239–245.

Straathof AJJ, Sie S, Franco TT, van der Wielen LAM (2005) Feasibility of acrylic acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:727–34.

Straathof AJJ (2014) Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. *Chem. Rev.* 114:1871–1908.

Sun X, Wang Q, Zhao W, Ma H, Sakata, K (2006) Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolysis method. *Sep. Purif. Technol.* 49:43–48.

Sung HW, Chen CN, Chang Y, Liang HF (2002) Biocompatibility study of biological tissues fixed by a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri*. *Biomater.* 23:3203–3214.

Sung HW, Chen CN, Liang HF, Hong MH (2003) A natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for biological-tissue fixation. *Biomater.* 24:1335–1347.

Suthers PF, Cameron DC (2005) Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms. Patent application No. US 6,852,517.

Seevaratnam S, Holst O, Hjorlefsdottir S, Mattiasson B (1991) Extractive bioconversion for lactic acid production using solid sorbent and organic solvent. *Bioprocess Eng.* 6:35–41.

T

Takamizawa K, Horitsu H, Ichikawa T, Kawai K, Suzuki T (1993) β -hydroxypropionic acid production by *Byssoschlamys sp.* grown on acrylic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:196–200

Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ (1988) Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1854–8.

Talarico TL, Dobrogosz WJ (1989) Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:674–679.

Talarico TL, Dobrogosz WJ (1990) Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Env. Microbiol.* 56:1195–1197.

Tamada JA, Kertes AS, King CJ (1990a), Extraction of carboxylic acid with amine extractants. 1. Equilibria and law of mass modelling. *Ind. Eng. Chem. Res.* 29:1319–1326.

Tamada JA, King CJ (1990b) Extraction of carboxylic-acids with amine extractants. 2. Chemical interactions and interpretation of data. *Ind. Eng. Chem. Res.* 29:1327–1333.

Tamada JA, Kertes AS, King CJ (1990c) Extraction of carboxylic acid with amine extractants. 3. Effect of temperature, water coextraction, and process considerations, *Ind. Eng. Chem. Res.* 29:1319–1326.

Thomas TD, Ellwood DC, Longyear VMC (1979) Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *J. Bacteriol.* 138:109–117.

Tik N, Bayraktar E, Mehmetoglu U (2001) *In situ* reactive extraction of lactic acid from fermentation media. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76:764–768.

Tong Y, Hirata M, Takanashi H, Hano T, Matsumoto M, Miura S (1998) Solvent screening for production of lactic acid by extractive fermentation. *Sep. Sci. Technol.* 33: 1439–1453.

Tong Y, Hirata M, Takanashi H, Hano T (1999) Back extraction of lactic acid with microporous hollow fiber membrane, *J. Membr. Sci.* 157:189–198.

Toraya T (2000) Radical catalysis of B12 enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. *Cell Mol. Life Sci.* 57:106–127.

Torres S, Pandey A, Castro GR (2011) Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: Applications and biotechnological potentials. *Biotechnol. Adv.* 29:442–452.

Tripathi L, Wu LP, Meng D, Chen J, Chen GQ (2013) Biosynthesis and characterization of diblock copolymer of p(3-Hydroxypropionate)-block-p(4-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli*. *Biomacromol.* 14:862–870.

Trauth E, Lemaître JP, Rojas C, Diviès C, Cachon R (2001) Resistance of immobilized lactic acid bacteria to the inhibitory effect of quaternary ammonium sanitizers. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 34:239–243.

Tsobanakis P, Meng X, Abraham TW (2009) Methods of manufacturing derivatives of beta-hydroxylic acids. Patent application No. PCT/US2009/0298144 A1 (Cargill, Inc.).

U

Ulmer C, Zeng AP (2007) Microbial production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol bioconversion. *Chem. Biochem. Eng.* 21:321-326.

Uslu H (2007) Liquid + liquid equilibria of the (water + tartaric acid + Alamine 336 + organic solvents) at 298.15K. *Fluid Phase Equilib.* 253:12–18.

Uslu H, Gök A, Kirbaslar I (2008) Phase equilibria of (water + levulinic acid + alcohol) ternary systems. *Fluid Phase Equilib.* 273:21–26.

Uslu H, Bayat C, Gökmen S, Yorulmaz Y (2009) Reactive extraction and LSER model consideration of lactic acid with tripropylamine + organic solvent systems from aqueous solution at room temperature. *Desalination* 249:694–698.

Uslu H, Kirbaslar I (2010a) Extraction of aqueous of malic acid by trioctylamine extractant in various diluents. *Fluid Phase Equilib.* 287:134–140.

Uslu H, Kirbaslar I (2010b) Solvent effects on the extraction of malic acid from aqueous solution by secondary amine extractant. *Sep. Purif. Technol.* 71:22–29.

V

Vaidyanathan H, Kandasamy V, Ramakrishnan GG, Ramachandran KB, Jayaraman G, Ramalingam S (2011) Glycerol conversion to 1,3-Propanediol is enhanced by the expression of a heterologous alcohol dehydrogenase gene in *Lactobacillus reuteri*. *AMB Express.* 1:37–44.

Valdehuesa KNG, Liu H, Nisola GM, Chung WJ, Lee SH, Park SJ (2013) Recent advances in the metabolic engineering of microorganisms for the production of 3-hydroxypropionic acid as C3 platform chemical. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:3309–3321.

Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K (2004) Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1176–1181.

Vancauwenberge JE, Slininger PJ, Bothast RJ (1990) Bacterial conversion of glycerol to beta-hydroxypropionaldehyde. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:329–332.

van Coillie E, Goris J, Cleenwerck I, Grijspeerdt K, Botteldoorn N, Van Immerseel F, de Buck J, Vancanneyt M, Swings J, Herman L, Heyndrickx M (2007) Identification of *lactobacilli* isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella enteritidis*. *J. Appl. Microbiol.* 102:1095–1106.

van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:187–216.

Vandeputte J (2012) Le glycerol, « building blocks » majeur de la bioraffinerie oleagineuse. *OC.* 19:16-21.

van Hecke W, Kaur G, DeWever H (2014) Advances in *in-situ* product recovery (ISPR) in whole cell biotechnology during the last decade. *Biotechnol. Adv.* 32:1245–1255.

van Keulen F, Correia CN, da Fonseca MMR (1998) Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 5:295–299.

van Maris AJA, Konings WN, Van Dijken JP, Pronk JT (2004) Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes. *Metab. Eng.* 6:245–55.

- van Niel EWJ, Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B (2002) Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 under different growth conditions. *App. Env. Microbiol.* 68:4350–4356.
- van Niel EWJ, Larsson CU, Lohmeier-Vogel EM, Rådström P (2012) The potential of biodegradation activity as a probiotic property of *Lactobacillus reuteri*. *Int. J. Food Microbiol.* 152:206–210.
- Velly H (2014) Etude de l'évolution de l'état physiologique de *L. lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation et de son incidence sur la résistance à la lyophilisation et au stockage. Thèse de doctorat. AgroParisTech. 250 p.
- Vermuë M, Sikkema J, Verheul A, Bakker R, Tramper J (1993) Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* Sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Sp. *Biotechnol. Bioeng.* 42:747–758.
- Vieira PB, Kilikian BV, Bastos RV, Perpetuo EA, Nascimento CAO (2015) Process strategies for enhanced production of 1,3-propanediol by *Lactobacillus reuteri* using glycerol as a co-substrate. *Biochem. Eng. J.* 94:30–38.
- Viladomat FG, Souchon I, Pierre FX, Marin M (2006) Liquid-liquid and liquid gas extraction of aroma compounds with hollow fibers. *Aiche J.* 52:2079–2088.
- Voisenet E (1910) Formation of formaldehyde in the oxidation of ethyl alcohol. *C.R. Acad. Sci.* 150:1614–1616.
- Vollenweider S, Grassi G, König I, Puhán Z (2003) Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. *J. Agricult Food Chem.* 51:3287–3293.
- Vollenweider S, Lacroix C (2004) 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:16–27.
- Vollenweider S, Evers S, Zubriggen K, Lacroix C (2010) Unraveling the hydroxypropionaldehyde (HPA) system: an active antimicrobial agent against human pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 58:10315–10322.
- von Frieling P, Schügerl K (1999) Recovery of lactic acid from aqueous model solutions and fermentation broths. *Process Biochem.* 34:685–696.

W

- Waghmare MD, Wasewar KL, Sonawane SS, Shende DZ (2011) Natural non-toxic solvents for recovery of picolinic acid by reactive extraction, *Ind. Eng. Chem. Res.* 50:13526–13537.
- Waghmare MD, Wasewar KL, Sonawane SS, Shende DZ (2013) Reactive extraction of picolinic and nicotinic acid by natural non-toxic solvent. *Sep. Purif. Technol.* 120:296–303.

- Wang K, Chang Z, Ma Y, Lei C, Wang J, Zhu T, Liu H, Zuo Y, Li X (2009) Study on solvent extraction of propionic acid from simulated discharged water in vitamin B12 production by anaerobic fermentation. *Bioresour. Technol.* 100:2878–2882.
- Wang P, Wang Y, Liu Y, Shi H, Su Z (2012a) Novel *in situ* product removal technique for simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 by expanded bed adsorption bioreactor. *Bioresour. Technol.* 104:652–659.
- Wang P, Wang Y, Su Z (2012b) Microbial production of propionic acid with *Propionibacterium freudenreichii* using an anion exchanger-based *in situ* product recovery (ISPR) process with direct and indirect contact of cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166:974–986.
- Wang Q, Yang P, Liu C, Xue Y, Xian M, Zhao G (2013) Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol by recombinant *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* 131:548–551.
- Wang W, Sun J, Hartlep M, Deckwer WD, Zeng AP (2003) Combined use of proteomic analysis and enzyme activity assays for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol. Bioeng.* 83:525–536.
- Wang X, Wang Y, Zhang X, Xu T (2012c) *In situ* combination of fermentation and electro dialysis with bipolar membranes for the production of lactic acid: operational compatibility and uniformity. *Bioresour. Technol.* 125:165–171.
- Wang X, Wang Y, Zhang X, Feng H, Xu T (2013) *In-situ* combination of fermentation and electro dialysis with bipolar membranes for the production of lactic acid: continuous operation. *Bioresour. Technol.* 147:442–448.
- Wang Y, Zhang N, Huang C, Xu T (2011a) Production of monoprotic, diprotic, and triprotic organic acids by using electro dialysis with bipolar membranes: Effect of cell configurations. *J. Membr. Sci.* 385–386:226–233.
- Wang Y, Huang C, Xu T (2011b) Which is more competitive for production of organic acids, ion-exchange or electro dialysis with bipolar membranes? *J. Membr. Sci.* 374:150–156.
- Warnecke TE, Lynch MD, Karimpour-Fard A, Sandoval N, Gill RT (2008) A genomics approach to improve the analysis and design of strain selections. *Metabol. Eng.* 10:154–165.
- Warnecke TE, Lynch MD, Karimpour-Fard A, Lipscomb ML, Handke P, Mills T, Ramey CJ, Hoang T, Gill RT (2010) Rapid dissection of a complex phenotype through genomic-scale mapping of fitness altering genes. *Metab. Eng.* 12:241–250.
- Warnecke T, Gill RT (2005) Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microb. Cell Fact.* 4:425–432.

Warnecke TE, Lynch MD, Lipscomb ML, Gill RT (2012) Identification of a 21 amino acid peptide conferring 3-hydroxypropionic acid stress-tolerance to *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 109:1347–1352.

Wasewar KL, Heesink ABM, Versteeg GF, Pangarkar VG (2002a) Reactive extraction of lactic acid using Alamine 336 in MIBK: equilibria and kinetics. *J. Biotechnol.* 97:59–68.

Wasewar KL, Heesink ABM, Versteeg GF, Pangarkar VG (2002b) Equilibria and kinetics for reactive extraction of lactic acid using Alamine 336 in decanol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77:1068–1075.

Wasewar KL, Heesink ABM, Versteeg GF, Pangarkar VG (2003) Intensification of enzymatic conversion of glucose to lactic acid accompanied by reactive extraction. *Chem. Eng. Sci.* 58:3385–3394.

Wasewar KL, Yawalkar AA, Moulijn JA, Pangarkar VG (2004) Fermentation of glucose to lactic acid coupled with reactive extraction: A review. *Ind. Eng. Chem. Res.* 43:5969–5982.

Wasewar KL, Shende D, Keshav A (2011) Reactive extraction of itaconic acid using tri-n-butyl phosphate and Aliquat 336 in sunflower oil as a non-toxic diluent. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86:319–323.

Wei G, Yang X, Zhou W, Lin J, Wei D (2009) Adsorptive bioconversion of ethylene glycol to glycolic acid by *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Biochem. Eng. J.* 47:127–131.

Weissermel K, Arpe HJ (1997) *Industrial organic chemistry* 3rd ed. Weinheim: VCH 142–146.

Werner S, Diekert G, Schuster S (2010) Revisiting the thermodynamic theory of optimal ATP stoichiometries by analysis of various ATP-producing metabolic pathways. *J. Mol. Evol.* 71:346–355.

Werpy T, Petersen G (2004) *Top value added chemicals from biomass, vol 1: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas.* US Department of Energy.

Whitcombe MJ, Esther Rodriguez M, Villar P, Vulfson EN (1995) A New Method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* 117:7105–7111.

Wu Z, Yang ST (2003) Extractive fermentation for butyric acid production from glucose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Biotechnol. Bioeng.* 82:93–102.

X

Xavier AMRB, Gonçalves LMD, Moreira JL, Carrondo MJT (1995) Operational patterns affecting lactic acid production in ultrafiltration cell recycle bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 45:320–327.

Xu K, Xu P (2014) Efficient calcium lactate production by fermentation coupled with crystallization-based *in situ* product removal. *Bioresour. Technol.* 163:33–39.

Xue YP, Liu ZQ, Xu M, Wang YJ, Zheng YG, Shen YC (2010) Enhanced biotransformation of (R, S)-mandelonitrile to (R)-(-)-mandelic acid with *in situ* production removal by addition of resin. *Biochem. Eng. J.* 53:143–149.

Y

Yabannavar VM, Wang DIC (1987) Reactive extraction of lactic acid. *Ann. NY Acad. Sci.* 506:523–535.

Yabannavar VM, Wang DIC (1991a) Extractive fermentation for lactic acid production. *Biotechnol. Bioeng.* 37:1095–1100.

Yabannavar VM, Wang DIC (1991b) Strategies for reducing solvent toxicity in extractive fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 37:716–722.

Yabannavar VM, Wang DIC (1991c) Analysis of mass transfer for immobilized cells in an extractive lactic acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 37:544–550.

Yamamoto T, Kojima K, Mori H, Kawasaki H, Sayama M (2011) Extraction of lactic acid using long chain amines dissolved in non-polar diluents. *J. Chem. Eng. Jap.* 44:949–956.

Yamanishi M, Kinoshita K, Fukuoka M, Saito T, Tanokuchi A, Ikeda Y, Obayashi H, Mori K, Shibata N, Tobimatsu T, Toraya T (2012) Redesign of coenzyme B12 dependent diol dehydratase to be resistant to the mechanism-based inactivation by glycerol and act on longer chain 1,2-diols. *FEBS J.* 279:793-804.

Yamashita M, Takemoto Y, Ihara E, Yasuda H (1996) Organolanthanide-initiated living polymerizations of ϵ -caprolactone, β -valerolactone, and β -propiolactone. *Macromol.* 29:1798–1806.

Yang S, White SA, Hsu S (1991) Extraction of carboxylic acids with tertiary and quaternary amines: Effect of pH. *Ind. Eng. Chem. Res.* 30:1335–1342.

Yankov D, Molinier J, Albet J, Malmay G, Kyuchoukov G (2004) Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri-n-octylamine dissolved in decanol and dodecane. *Biochem. Eng. J.* 21:63–71.

Yankov D, Molinier J, Kyuchoukov G, Albet J, Malmay G (2005) Improvement of the lactic acid extraction. Extraction from aqueous solutions and simulated fermentation broth by means of mixed extractant and TOA, partially loaded with HCl. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 19:17–24.

Yasuda S, Mukoyama M, Horikawa H, Toraya T, Morita H (2007) Process for producing 1,3-propanediol and/or 3-hydroxypropionic acid. US Patent application No. 20070148749 A1.

Ye K, Jin S, Shimizu K (1996) Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation. *J. Ferm. Bioeng.* 81:240–246.

Younas M (2011) Modélisation dynamique des contacteurs membranaires pour l'extraction liquide-liquide : expérimentation et simulation. Thèse de doctorat. Université de Montpellier II. 188 p.

Yunmbam MK, Roberts JF (1992) The *in vitro* efficacy of reuterin on the culture and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 101:235–238.

Yunmbam MK, Roberts JF (1993) *In vivo* evaluation of reuterin and its combinations with suramin, melarsoprol, DL-alpha-difluoromethylornithine and bleomycin in mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 105:521–524.

Z

Zamudio-Jaramillo MA, Hernandez-Mendoza A, Robles VJ, Mendoza-Garcia PG, Espinosa-de-los-Monteros JJ, Garcia HS (2009) Reuterin production by *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 immobilized in alginate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84:100–105.

Zarzycki J, Brecht V, Müller M, Fuchs G (2009) Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:21317–21322.

Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:545–552.

Zelic B, Gostovic S, Vuorilehto K, Vasic-Racki D, Takors R (2004) Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: from repetitive fed-batch to *in situ* product recovery with fully integrated electrodialysis. *Biotechnol. Bioeng.* 85:638–646.

Zhang D, Hillmyer MA, Tolman WB (2004) A new synthetic route to poly[3-hydroxypropionic acid] (P[3-HP]): ring-opening polymerization of 3-HP macrocyclic esters. *Macromol.* 37:8198–8200.

Zhang K (2012) Fumaric acid fermentation by *Rhizopus oryzae* with integrated separation technologies. PhD Thesis. Ohio State University.

Zheng P, Wereath K, Sun J, van den Heuvel J, Zeng A (2006) Overexpression of genes of the dha regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1, 3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochem.* 41:2160–2169.

Zhu JG, Ji XJ, Huang H, Du J, Li S, Ding YY (2009) Production of 3-hydroxypropionic acid by recombinant *Klebsiella pneumoniae* based on aeration and ORP controlled strategy. *Korean J. Chem. Eng.* 26:1679–1685.

Zoumpopoulou G, Papadimitriou K, Polissiou MG, Tarantilis PA, Tsakalidou E (2010) Detection of changes in the cellular composition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the presence of antimicrobial compound(s) of *Lactobacillus* strains using Fourier transform infrared spectroscopy. *Int. J. Food Microbiol.* 144:202–207.

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van't Riet K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1875–1881.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE I : Résultats de l'analyse bibliographique par recherche de mots clefs dans la base de données *Web of Knowledge*

ANNEXE II : Métabolisme du glycérol chez *K. pneumoniae* et *E. coli*

ANNEXE III : Résumé des études portant sur la fermentation extractive d'acides organiques entre 2003 et 2014

ANNEXE IV : Liste des acides organiques séparés par extraction réactive recensés dans la littérature

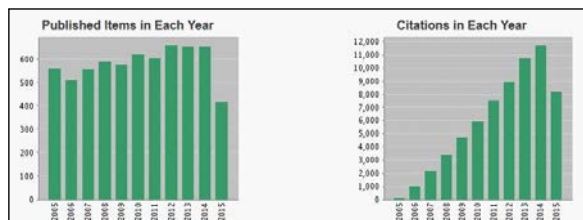
ANNEXE V : Tableau de synthèse des différentes valeurs de KD reportées dans la littérature dans le cas de l'acide lactique en fonction du diluant et des extractants utilisés

ANNEXE VI : Protocole d'utilisation du bioréacteur Sétric 7L

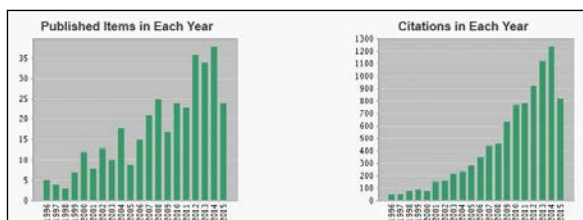
ANNEXE VII : Protocole d'utilisation du bioréacteur Sartorius Biostat A plus

ANNEXE I : Résultats de l'analyse bibliographique par recherche de mots clés dans la base de données *Web of Knowledge*

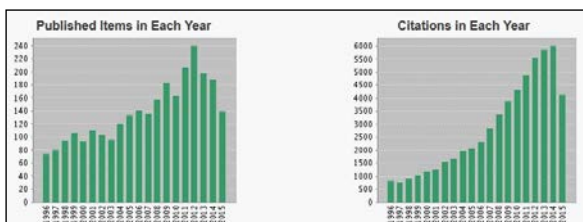
Généralités



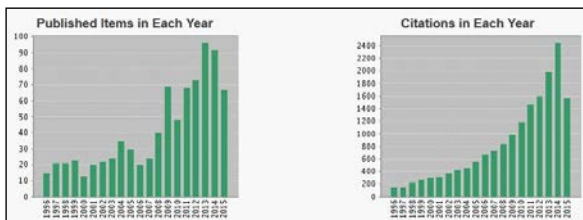
« carboxylic acids » (119 834 réponses)



«microbial production» + « carboxylic acids » (383 réponses)

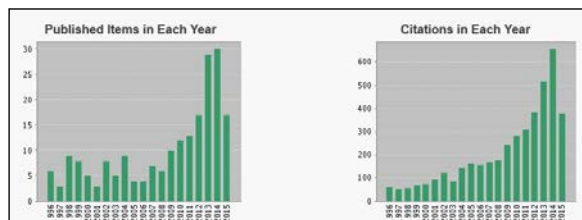


« extraction » + « carboxylic acids » (3420 réponses)



« in situ product recovery » (916 réponses)

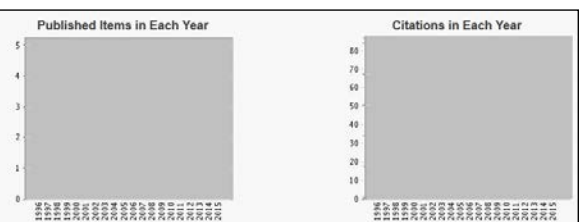
3-HP



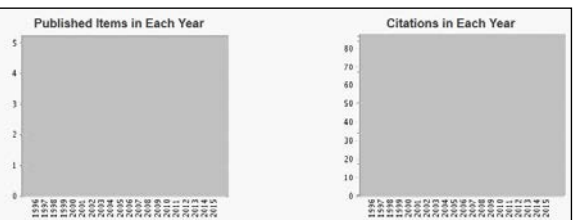
« 3-hydroxypropionic acid » (268 réponses)



« microbial production » + « 3-hydroxypropionic acid » (21 réponses)

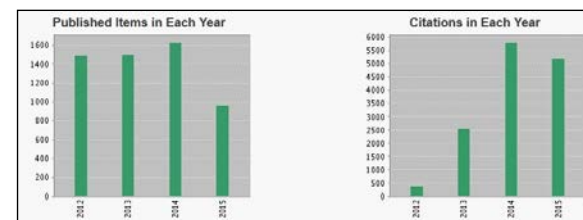


« extraction » + « 3-hydroxypropionic acid » (0 réponse)

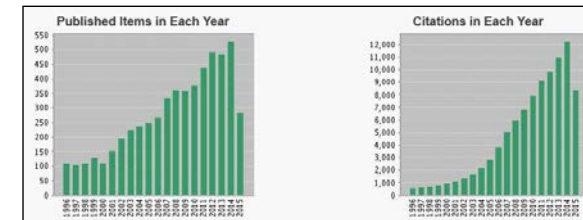


« in situ product recovery » + « 3-hydroxypropionic acid » (0 réponse)

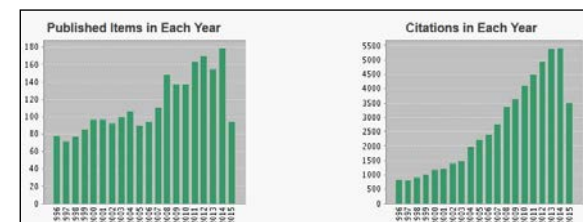
2-HP(acide lactique)



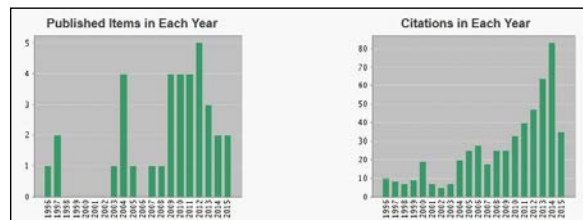
« lactic acid » (167 624 réponses)



« microbial production » + « lactic acid » (8412 réponses)

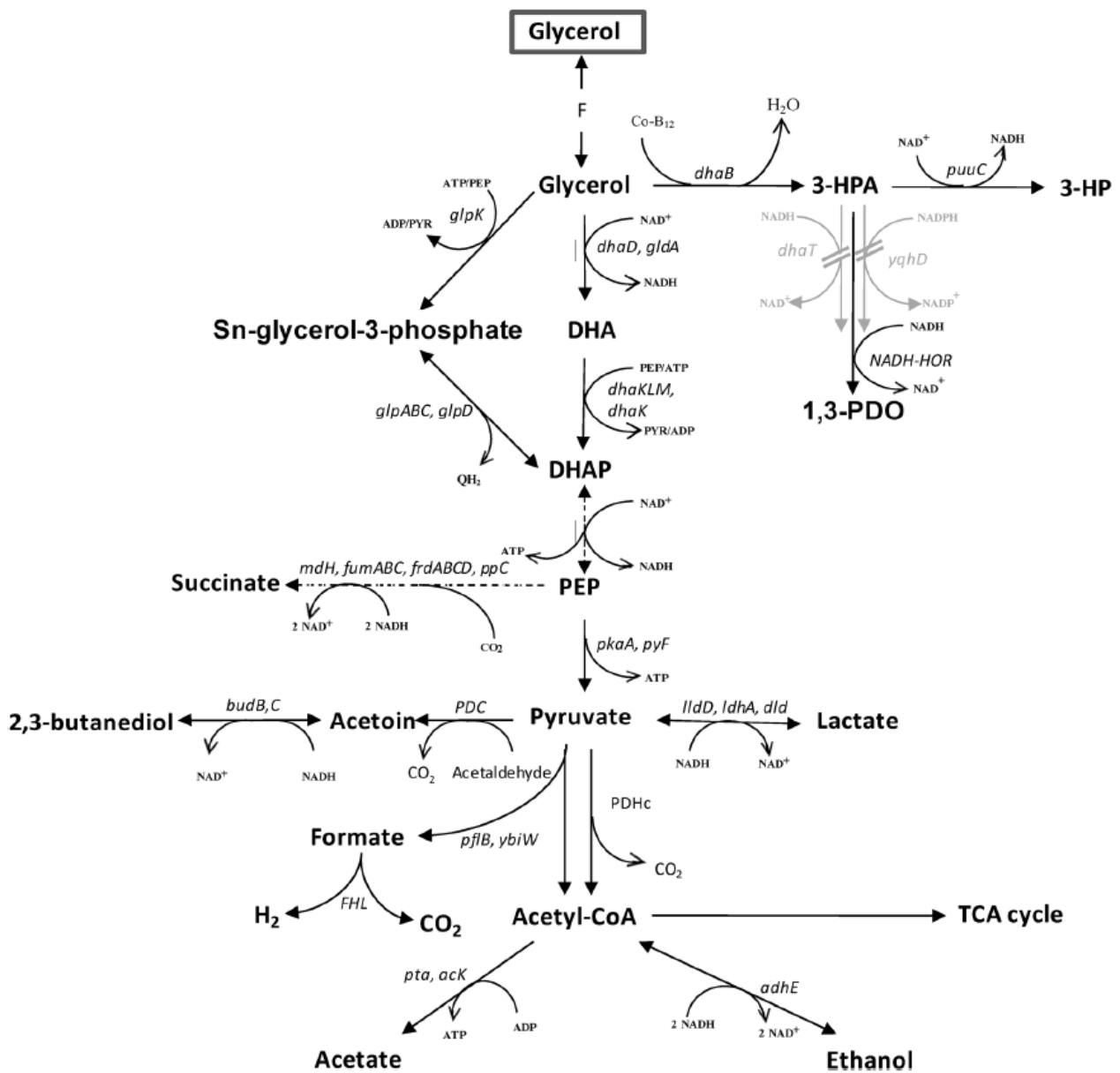


« extraction » + « lactic acid » (2938 réponses)

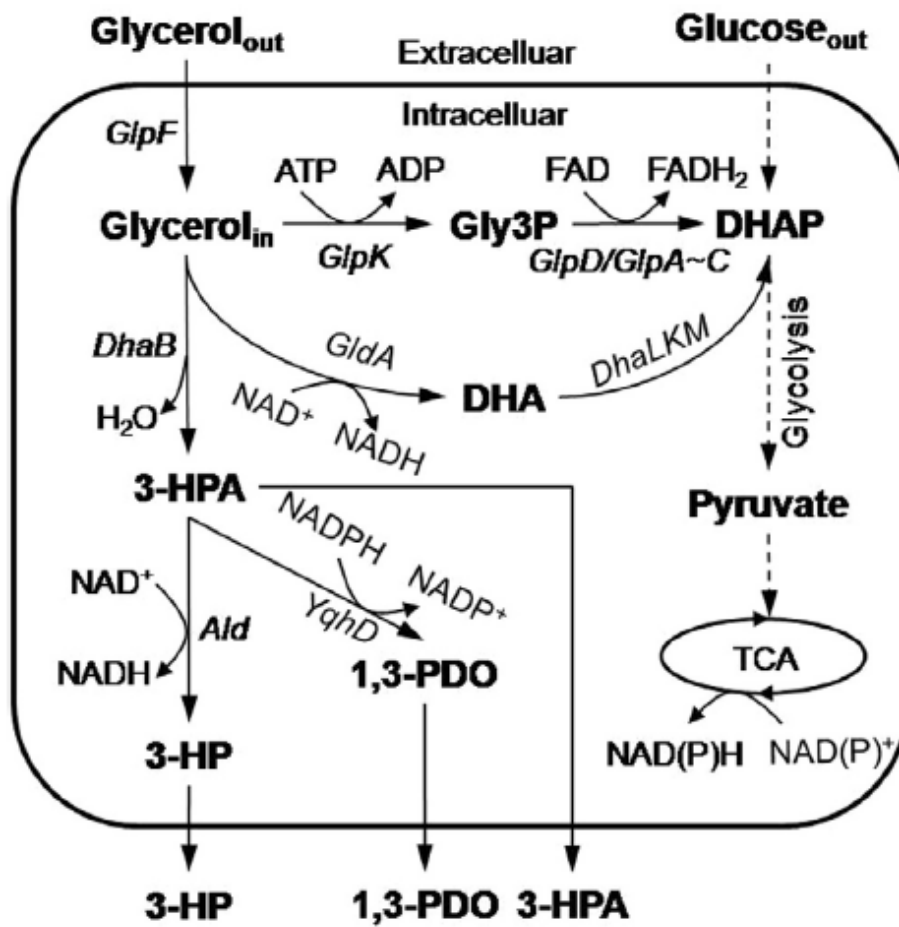


« in situ product recovery » + « lactic acid » (40 réponses)

ANNEXE II : Métabolisme du glycérol chez *K. pneumoniae* et *E. coli*



Métabolisme du glycérol chez *K. pneumoniae* (Ashok et al. 2013a)



Métabolisme du glycérol chez *E. coli* (Kim *et al.* 2014)

ANNEXE III : Résumé des études portant sur la fermentation extractive d'acides organiques entre 2003 et 2014

Pour le mode de production : B – batch, FB – fed-batch, RB – batch répété, C – continu. Pour la configuration : ID – interne direct, II – interne indirect, ED – externe direct, EI –externe indirect (van Hecke *et al.* 2014)

Product	Mode of cultivation	ISPR Technique										ISPR configuration	Total fermentation time (h)	Result with ISPR					Reference
		Liquid-liquid extraction	ATPS	Solid-liquid extraction	Ionic liquid-based extraction	Pertraction	Electrodialysis	Electrodeionization	Crystallization	Ion-exchange adsorption	Hydrophobic adsorption			Affinity adsorption	Product in concentrate (g.L ⁻¹)	Product in reactor (g.L ⁻¹)	Overall product (g.L ⁻¹)	Yield (g.g ⁻¹)	
butyric acid	B			√								ED	35	-	-	~19	0.35	0.54	Peterson and Daugulis (2014)
clavulanic acid	FB								√			EI	130	-	-	0.77	-	0.01	Brethauer <i>et al.</i> (2007)
fumaric acid	B									√		EI	290	-	-	46.5	-	0.16	Roa Engel (2010)
fumaric acid	B								√			EI	96-120	3.7	-	33.7	-	0.35	Zhang (2012)
glycolic acid	FB								√			EI	50	-	73.1	93.2	-	1.86	Wei <i>et al.</i> (2009)
hexanoic acid	B	√										ID	384	32	1-2	-	0.42	0.34	Jeon <i>et al.</i> (2013)
hexanoic acid	B	√										ID	144	26.5	1.9	-	0.50	0.20	Choi <i>et al.</i> (2013)
hexanoic acid	C					√						EI	2880	-	-	-	-	0.083	Agler <i>et al.</i> (2012)

Product	Mode of cultivation	ISPR Technique										ISPR configuration	Total fermentation time (h)	Result with ISPR					Reference
		Liquid-liquid extraction	ATPS	Solid-liquid extraction	Ionic liquid-based extraction	Pertraction	Electrodialysis	Electrodeionization	Crystallization	Ion-exchange adsorption	Hydrophobic adsorption			Affinity adsorption	Product in concentrate (g.L ⁻¹)	Product in reactor (g.L ⁻¹)	Overall product (g.L ⁻¹)	Yield (g.g ⁻¹)	
itaconic acid	B					√						EI	168	-	-	-	-	-	Li <i>et al.</i> (2013a)
lactic acid	B						√					II	197	-	-	10.8	0.62	0.05	Li <i>et al.</i> (2004)
lactic acid	B B ^a						√ √					EI	60 71	~100 ~170	0 -	- -	0.53 0.67	2.25 3.05	Min-tian <i>et al.</i> (2004)
lactic acid	B							√				ED	>24	-	-	3.0	-	0.02	Arora <i>et al.</i> (2007)
lactic acid	B								√			EI	38	-	-	-	0.85	0.98	Ataei and Vasheghani (2008)
lactic acid	B	√										ID	100	80-90	50	-	-	-	Gao <i>et al.</i> (2009)
lactic acid	B						√					EI	27	80	0	-	-	3.64	Boontawan <i>et al.</i> (2011)
lactic acid	B								√			ID	~80	-	<35	<50	0.75	-	Gao <i>et al.</i> (2011)
lactic acid	B						√					EI	13	-	-	-	-	-	Wang <i>et al.</i> (2012c)

Product	Mode of cultivation	ISPR Technique										ISPR configuration	Total fermentation time (h)	Result with ISPR					Reference
		Liquid-liquid extraction	ATPS	Solid-liquid extraction	Ionic liquid-based extraction	Pertraction	Electrodialysis	Electrodeionization	Crystallization	Ion-exchange adsorption	Hydrophobic adsorption			Affinity adsorption	Product in concentrate (g.L ⁻¹)	Product in reactor (g.L ⁻¹)	Overall product (g.L ⁻¹)	Yield (g.g ⁻¹)	
lactic acid	FB						√					EI	250	184	0	-	0.87	0.78	Boontawan <i>et al.</i> (2011)
lactic acid	FB							√				ED	~70	-	~120	168	0.93	5	Xu and Xu (2014)
lactic acid	C ^b						√					EI	81	-	-	-	0.85	3.36	Min-tian <i>et al.</i> (2004)
lactic acid	C						√					EI	350	-	-	-	0.71	8.18	Min-tian <i>et al.</i> (2005)
lactic acid	C						√					ED	35	<135	-	-	0.73-0.82	1.07-2.42	Wang <i>et al.</i> (2013)
<i>R</i> -(-)-mandelic acid	B								√			ID	2	2.6	0	-	0.86	2.6	Xue <i>et al.</i> (2010a)
<i>R</i> -(-)-mandelic acid	FB								√			ID	11	27.4	0	-	-	2.57	Xue <i>et al.</i> (2010a)
perillic acid	FB								√			ED	96	26.9	4.2	31	-	0.3	Mirata <i>et al.</i> (2009)

Product	Mode of cultivation	ISPR Technique											Total fermentation time (h)	Result with ISPR					Reference
		Liquid-liquid extraction	ATPS	Solid-liquid extraction	Ionic liquid-based extraction	Pertraction	Electrodialysis	Electrodeionization	Crystallization	Ion-exchange adsorption	Hydrophobic adsorption	Affinity adsorption		ISPR configuration	Product in concentrate (g.L ⁻¹)	Product in reactor (g.L ⁻¹)	Overall product (g.L ⁻¹)	Yield (g.g ⁻¹)	
propionic acid	B									√		ED	120	14.1	30	44.1	0.74	0.37	Wang <i>et al.</i> (2012b)
propionic acid	FB									√		ED	160	-	~10	52.5	0.66	0.33	Wang <i>et al.</i> (2012a)
propionic acid	FB									√		ED	140	-	-	62.5	0.78	0.45	Wang <i>et al.</i> (2012b)
pyruvate	FB						√					EI	~15	48	~17	-	0.87	6.04	Zelic <i>et al.</i> (2004)
succinic acid	B			√								ID	50	10	~35	-	-	-	Hepburn and Daugulis (2012)
succinic acid	FB									√		ED	126	-	~20	145.2	0.52	1.3	Li <i>et al.</i> (2011)
succinic acid	C						√					EI	>350	83	20	-	0.88	10.4	Meynial-Salles <i>et al.</i> (2008)

^a intermittent coupling in batch cultivation, ^b intermittent coupling in continuous cultivation

ANNEXE IV : Liste des acides organiques séparés par extraction réactive recensés dans la littérature

Nom usuel	Synonyme(s)	Numéro CAS	Formule semi développée	Auteurs
Acide acétique	Acide éthanoïque Acide éthylique	64-19-7	CH ₃ -COOH	Juang and Wu (1999) Li <i>et al.</i> (2002) Morales <i>et al.</i> (2003) Shin <i>et al.</i> (2009a) Cascaval <i>et al.</i> (2013a) Cascaval <i>et al.</i> (2013b)
Acide acrylique	Acide acroléique Acide prop-2-énoïque	79-10-7	CH ₂ -CH-COOH	Keshav <i>et al.</i> (2009c)
Acide benzoïque	Acide benzèncarboxylique	65-85-0	C ₆ H ₅ -COOH	Datta <i>et al.</i> (2011)
Acide butyrique	Acide butanoïque Acide éthyl-acétique	107-92-6	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -COOH	Sabolova <i>et al.</i> (2001) Li <i>et al.</i> (2002) Morales <i>et al.</i> (2003) Wu and Yang (2003) Keshav <i>et al.</i> (2009c)
Acide citrique	Acide 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylique Acide 3-carboxy-3-hydroxypentanedioïque	77-92-9	HOOC-CH ₂ -COH-COOH-CH ₂ -COOH	Bizek <i>et al.</i> (1992) Bizek <i>et al.</i> (1993) Juang <i>et al.</i> (1997) Heyberger <i>et al.</i> (1998) Poposka <i>et al.</i> (1998) Keshav <i>et al.</i> (2012)
Acide formique	Acide méthanoïque Acide hydroxycarboxylique	64-18-6	H-COOH	Senol (2000) Morales <i>et al.</i> (2003) Cascaval <i>et al.</i> (2013a)
Acide glycolique	Acide hydroxyéthanoïque Acide hydroxyacétique	79-14-1	C-OH-COOH	Datta and Kumar (2011)
Acide itaconique	Acide méthylène-succinique		CH ₂ -C-COOH-CH ₂ -COOH	Wasewar <i>et al.</i> (2011) Kaur and Elst (2014)
Acide lactique	Acide 2-hydroxypropionique (2-HP) Acide 2-hydroxypropanoïque	598-82-3	CH ₃ -CH-OH-COOH	Coelhoso <i>et al.</i> (1997) Juang and Huang (1997) Choudhury <i>et al.</i> (1998) von Frieling and Schügerl (1999) Kahya <i>et al.</i> (2001) Kyuchoukov <i>et al.</i> (2001) Tik <i>et al.</i> (2001) Wasewar <i>et al.</i> (2002) Matsumoto <i>et al.</i> (2003) Morales <i>et al.</i> (2003) Wasewar <i>et al.</i> (2003) Wasewar <i>et al.</i> (2004) Yankov <i>et al.</i> (2004) Yankov <i>et al.</i> (2005) Kyuchoukov <i>et al.</i> (2006) Joglekar <i>et al.</i> (2006) Harrington and Hossain (2008) Hossain and Maisuria (2008) Gao <i>et al.</i> (2009) Uslu <i>et al.</i> (2009) Yamamoto <i>et al.</i> (2011) Kyuchoukov and Yankov (2012) Krzyzaniak <i>et al.</i> (2013) Krzyzaniak <i>et al.</i> (2014)
Acide levulinique	Acide 4-oxopentanoïque Acide 3-acétopropionique	123-76-2	CH ₃ -C(O)-CH ₂ -CH ₂ -COOH	Senol (2000) Uslu <i>et al.</i> (2008) Kumar <i>et al.</i> (2015)

Acide maléique	Acide (Z)-but-2-èn-1,4-dioïque	110-16-7	HOOC-C-C-COOH	Rahmanian and Ghaziaskar (2008)
Acide malique	Acide 2-hydroxybutane-1,4-dioïque	6915-15-7	HOOC-CH ₂ -CHOH-COOH	Uslu and Kirbaslar (2010) Labbaci <i>et al.</i> (2012)
Acide muconique	Acide (2E,4E)-hexa-2,4-diène dioïque Acide <i>trans,trans</i> -buta-1,3-diène-1,4-dicarboxylique	3588-17-8	HOOC-CH=CH-CH=CH-COOH	Gorden <i>et al.</i> (2015)
Acide nicotinique	Niacine	59-67-6	C ₅ H ₅ N-COOH	Senol (2001) Waghmare <i>et al.</i> (2013)
Acide phtalique	Acide benzène-1,2-dicarboxylique	88-99-3	C ₆ H ₄ -(COOH) ₂	Rahmanian and Ghaziaskar (2008)
Acide picolinique	Acide pyridine-2-carboxylique	98-98-6	C ₅ H ₄ N-COOH	Senol (2005) Waghmare <i>et al.</i> (2011) Waghmare <i>et al.</i> (2013) Datta and Kumar (2014)
Acide propionique	Acide propanoïque Acide éthylformique Acide méthylacétique	79-09-4	CH ₃ -CH ₂ -COOH	Gu <i>et al.</i> (1997) Li <i>et al.</i> (2002) Morales <i>et al.</i> (2003) Keshav <i>et al.</i> (2008) Wasewar <i>et al.</i> (2008) Keshav <i>et al.</i> (2009) Wang <i>et al.</i> (2009) Galaction <i>et al.</i> (2012) Cascaval <i>et al.</i> (2013a)
Acide pyruvique	Acide 2-oxopropanoïque	127-17-3	CH ₃ -CO-COOH	Senol (2006) Martí <i>et al.</i> (2011)
Acide succinique	Acide butanedioïque	110-15-6	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -COOH	Cascaval <i>et al.</i> (2013) Agrahari <i>et al.</i> (2014) Carlescu <i>et al.</i> (2014) Moraes <i>et al.</i> (2015)
Acide tartrique	Acide 2,3-dihydroxybutanedioïque Acide 2,3-dihydroxy succinique	133-37-9	HOOC-CHOH-CHOH-COOH	Poposka <i>et al.</i> (2000) Marinova <i>et al.</i> (2004) Marinova <i>et al.</i> (2005) Uslu (2007)
Acide α-toluique	Acide phényl-acétique Acide benzylique	103-82-2	C ₆ H ₅ -CH ₂ -COOH	Athankar <i>et al.</i> (2013) Athankar <i>et al.</i> (2015)
Acide valérique	Acide pentanoïque Acide méthyléthylacétique	109-52-4	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -COOH	Senol (2002) Li <i>et al.</i> (2002)


Noms IUPAC en gras dans le tableau

ANNEXE V : Tableau de synthèse des différentes valeurs de K_D reportées dans la littérature dans le cas de l'acide lactique en fonction du diluant et des extractants utilisés

Diluant	Extractant(s)	pH	K_D	Y%	Auteurs
Alcool oléique	/	2.40	0.67	40.12	Hossain and Maisuria (2008)
Alcool oléique	15 % Alamine 336	/	3.00	75.00	Yabannavar <i>et al.</i> (1987)
Alcool oléique	30 % Alamine 336	/	4.50	81.82	Yabannavar <i>et al.</i> (1987)
Alcool oléique	50 % Alamine 336	/	6.50	86.67	Yabannavar <i>et al.</i> (1987)
Alcool oléique	50 % di-n-hexylamine	2.50 - 3.20	0.76	43.18	Honda <i>et al.</i> (1995)
Alcool oléique	50 % di-n-octylamine	2.50 - 3.20	1.10	52.38	Honda <i>et al.</i> (1995)
Alcool oléique	50 % di-n-decylamine	2.50 - 3.20	7.76	88.58	Honda <i>et al.</i> (1995)
Alcool oléique	50 % di-n-pentylamine	2.50 - 3.20	0.72	41.86	Honda <i>et al.</i> (1995)
Alcool oléique	50 % di-n-hexylamine	2.50 - 3.20	2.94	74.62	Honda <i>et al.</i> (1995)
Alcool oléique	50 % di-n-octylamine	2.50 - 3.20	1.90	65.52	Honda <i>et al.</i> (1995)
Alcool oléique	50 % di-n-decylamine	2.50 - 3.20	1.66	62.41	Honda <i>et al.</i> (1995)
Alcool oléique	50 % Alamine 336	2.50 - 3.20	2.62	72.38	Honda <i>et al.</i> (1995)
Alcool oléique	15 % Alamine 336	2.00	10.50	91.30	Kahya <i>et al.</i> (2001)
Alcool oléique	50 % Alamine 336	2.00	13.00	92.86	Kahya <i>et al.</i> (2001)
Alcool oléique	15 % Alamine 336	4.00	0.20	16.67	Kahya <i>et al.</i> (2001)
Alcool oléique	50 % Alamine 336	4.00	0.30	23.08	Kahya <i>et al.</i> (2001)
Alcool oléique	20 % TOA	/	9.00	90.00	Kyuchoukov and Yankov (2012)
Alcool oléique	40 % TOA	/	10.00	90.91	Kyuchoukov and Yankov (2012)
Alcool oléique	60 % TOA	/	6.50	86.67	Kyuchoukov and Yankov (2012)
Huile de tournesol	/	2.40	0.11	9.91	Hossain and Maisuria (2008)
Huile de tournesol	20 % TOA	4.00	0.40	28.57	Harington and Hossain (2008)
Huile de tournesol	20 % Aliquat 336	4.00	0.50	33.33	Harington and Hossain (2008)
Huile de tournesol	5 % TOA + 15 % Aliquat 336	4.00	1.20	54.55	Harington and Hossain (2008)
Huile de tournesol	15 % TOA + 15 % Aliquat 336	4.00	2.20	68.75	Harington and Hossain (2008)
Huile de tournesol	20 % TOA	6.00	0.05	4.76	Harington and Hossain (2008)
Huile de tournesol	20 % Aliquat 336	6.00	0.05	4.76	Harington and Hossain (2008)
Huile de tournesol	5 % TOA + 15 % Aliquat 336	6.00	0.09	8.26	Harington and Hossain (2008)
Huile de tournesol	15 % TOA + 15 % Aliquat 336	6.00	0.13	11.50	Harington and Hossain (2008)
MIBK	/	/	0.10	9.09	Kertes and King (1986)
MIBK	/	/	0.31	23.66	Wasewar <i>et al.</i> (2002a)
MIBK	20 % Alamine 336	/	0.72	41.86	Wasewar <i>et al.</i> (2002a)
MIBK	30 % Alamine 336	/	2.68	72.83	Wasewar <i>et al.</i> (2002a)
MIBK	40 % Alamine 336	/	4.24	80.92	Wasewar <i>et al.</i> (2002a)
Octanol	/	/	0.32	24.24	Kertes and King (1986)
Octanol	/	/	0.29	22.48	Wasewar <i>et al.</i> (2003)
Octanol	10 % Alamine 336	/	15.35	93.88	Wasewar <i>et al.</i> (2003)
Octanol	20 % Alamine 336	/	19.69	95.17	Wasewar <i>et al.</i> (2003)
Octanol	30 % Alamine 336	/	25.95	96.29	Wasewar <i>et al.</i> (2003)
Octanol	30 % TOA	2.80	0.90	47.37	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
Octanol	90 % TOA	2.80	1.20	54.55	Choudhury <i>et al.</i> (1998)
Octanol + dodécane	20 % TOA	/	2.50	71.43	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2006)
Octanol + dodécane	30 % TOA	/	7.00	87.50	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2006)
Octanol + dodécane	40 % TOA	/	11.00	91.67	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2006)
Octanol + dodécane	50 % TOA	/	22.00	95.65	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2006)

Décanol	/	2.40	0.43	30.07	Hossain and Maisuria (2008)
Décanol	/	2.68	0.12	10.53	Labbaci <i>et al.</i> (2012)
Décanol	/	1.80 - 3.40	0.13	11.50	Wasewar <i>et al.</i> (2002b)
Décanol	20 % Alamine 336	1.80 - 3.40	12.57	92.63	Wasewar <i>et al.</i> (2002b)
Décanol	30 % Alamine 336	1.80 - 3.40	16.44	94.27	Wasewar <i>et al.</i> (2002b)
Décanol	40 % Alamine 336	1.80 - 3.40	23.37	95.90	Wasewar <i>et al.</i> (2002b)
Décanol	15 % TOA + 15 % Aliquat 336	2.68	33.00	97.06	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2001)
Décanol	15 % TOA + 15 % Aliquat 336	5.00	0.70	41.18	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2001)
Décanol	30 % TOA	2.68	6.75	87.09	Labbaci <i>et al.</i> (2012)
Décanol + dodécane	20 % TOA	/	2.00	66.67	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2006)
Décanol + dodécane	30 % TOA	/	5.00	83.33	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2006)
Décanol + dodécane	40 % TOA	/	7.50	88.24	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2006)
Décanol + dodécane	50 % TOA	/	12.50	92.59	Kyuchoukov <i>et al.</i> (2006)
Décanol + dodécane	15 % TOA	2.40	0.30	23.08	Yankov <i>et al.</i> (2004)
Décanol + dodécane	20 % TOA	2.40	0.70	41.18	Yankov <i>et al.</i> (2004)
Décanol + dodécane	30 % TOA	2.40	2.30	69.70	Yankov <i>et al.</i> (2004)
Décanol + dodécane	15 % Aliquat 336	2.40	0.15	13.04	Yankov <i>et al.</i> (2005)
Décanol + dodécane	30 % Aliquat 336	2.40	0.25	20.00	Yankov <i>et al.</i> (2005)
Décanol + dodécane	15 % TOA	2.40	0.50	33.33	Yankov <i>et al.</i> (2005)
Décanol + dodécane	30 % TOA	2.40	2.30	69.70	Yankov <i>et al.</i> (2005)
Décanol + dodécane	15 % TOA + 15 % Aliquat 336	6.00	1.90	65.52	Yankov <i>et al.</i> (2005)
Décanol + dodécane	15 % Aliquat 336	6.00	0.40	28.57	Yankov <i>et al.</i> (2005)
Décanol + dodécane	30 % Aliquat 336	6.00	0.60	37.50	Yankov <i>et al.</i> (2005)
Décanol + dodécane	15 % TOA	6.00	0.00	0.00	Yankov <i>et al.</i> (2005)
Décanol + dodécane	30 % TOA	6.00	0.05	4.76	Yankov <i>et al.</i> (2005)
Décanol + dodécane	15 % TOA + 15 % Aliquat 336	6.00	0.50	33.33	Yankov <i>et al.</i> (2005)
/	100 % TOA	/	0.63	38.65	Honda <i>et al.</i> (1995)
/	100 % TOA	/	0.23	18.70	Kyuchoukov and Yankov (2012)
/	100 % TOA	2.68	0.19	16.22	Labbaci <i>et al.</i> (2012)
/	100 % Alamine 336	/	0.55	35.48	Yang <i>et al.</i> (1991)
/	100 % Alamine 336	/	0.76	43.18	Honda <i>et al.</i> (1995)
/	100 % Aliquat 336	/	2.17	68.45	Yang <i>et al.</i> (1991)

ANNEXE VI : Protocole d'utilisation du bioréacteur Sétric 7L

	Mode opératoire	Réf :
Unité 0782 UMR Génie et Microbiologie des procédés alimentaires	Fonctionnement du fermenteur 7L (préparation, utilisation et nettoyage)	Version 1 date : 23/09/2014 page 1/5

1. Objet et domaine d'application

Préparation, utilisation et nettoyage du fermenteur 7L

2. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Sans objet

3. Historique des modifications

Version	Date	Nature de la modification
1	23/09/14	-

4. Hygiène et sécurité

La manipulation d'hydroxyde de potassium (KOH) fortement concentré nécessite de porter des gants adaptés, des lunettes de protection, une blouse et des chaussures fermées. Jeter tout déchet de soude dans un bidon réservé à cet usage.

5. Principe de la méthode

Le fermenteur permettant le réglage de paramètres au cours de la fermentation, l'étalonnage des instruments est donc primordial afin d'être sûr de suivre correctement le procédé. Il est donc nécessaire de respecter les étapes d'étalonnage, d'utilisation et de nettoyage. Le fermenteur aura été préalablement autoclavé à vide puis rempli afin d'éviter la contamination de la souche bactérienne.

6. Matériels nécessaires

Pour l'étalonnage :

- Balance
- Masses (petite et grosse)
- Solutions tampons (pH 7 et 4)
- Porte sonde
- Pompe + vis

Pour l'ensemencement :

- Pipette stérile
- Pipette boy

Pour l'utilisation : (récolte)

- béchers
- pots de centrifugation

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	<i>Mariane Kniest</i>		
Fonction :	<i>Stagiaire</i>		
Visa :	<i>MK</i>		

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

Hydroxyde de potassium ()

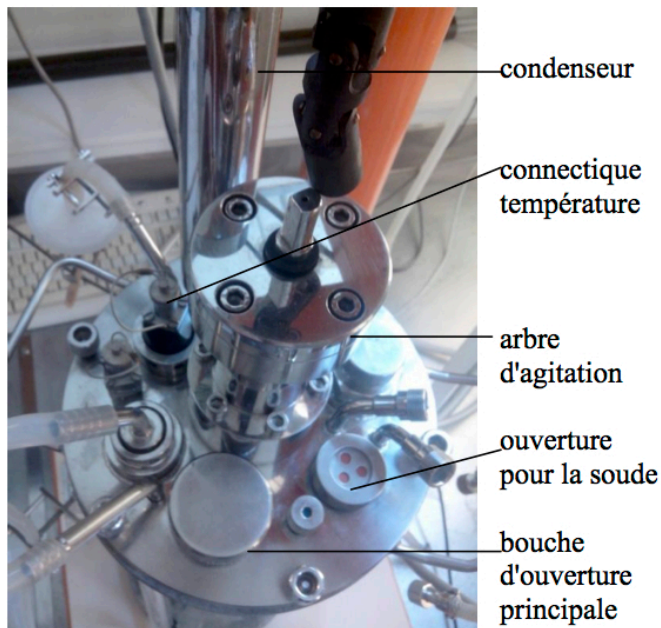
8. Contraintes de la méthode

La principale contrainte du fermenteur est de rester stérile. Pour cela l'utilisation d'un bec benzène est de rigueur, il faudra donc positionner le fermenteur de telle façon que les ouvertures utilisées soit accessible.

9. Contenu du mode opératoire

Branchements

- Mettre du glycérol sous la capsule afin de le lubrifier.
- Positionner correctement le fermenteur de façon à pouvoir prélever sans difficulté (condenseur derrière et bouche d'ouverture devant avec la vis sur la droite).



	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	<i>Mariane Kniest</i>		
Fonction :	<i>Stagiaire</i>		
Visa :	MK		

- Brancher les tubes au condenseur.
- Brancher l'eau au système de chauffage et ouvrir le robinet d'eau.
- Mettre 2 filtres avec des pinces de mors de chaque côté (sur les plus hauts tubes) et en laisser un sans filtre avec pince de mors.
- Installer le tube pour le soude.
- Allumer ordinateur.



Etalonnage du matériel

- étalonnage balance :

- Régler le niveau à bulle avec les molettes derrière la balance.
- Ouverture du logiciel WCIUS : (celui du milieu à l'écran)
 - > Lancement de la cuve N°1 ou 2 (selon le fermenteur gauche ou droite respectivement), matériel, étalonnage en 2 points.
 - > Voie à étalonner : masse brute.
- Etalonne entre 0 et 100.
- Peser la masse la plus petite. (bouchon avec trous) -> Noter la valeur, vérifier que cela correspond à celle afficher par l'ordi.
- Peser la masse la plus grande. (pot 100g)

- étalonnage sonde pH :

- Sélectionner la voie à réguler sur la console : pH et couper régulation de la température.
- Sur le logiciel : sélectionner la voie à étalonner (pH).
- Relier la sonde au détecteur de pH. (connectique rouge).
- Préparation du plan de travail :
 - > Prendre un porte sonde / régler suivant la hauteur de la sonde.
 - > Positionner un bécher avec un peu d'eau distillée.
- Commencer par la solution tampon à pH7 :
 - > Valeur à mettre à 7 avec la molette de la console.
 - > Nettoyer la sonde à l'eau osmosée, essuyer.
 - > Mettre dans solution tampon, attendre 5 min, rincer, essuyer.
- Faire la même chose avec solution tampon pH4.
- Remettre sonde dans KCl.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Mariane Kniest		
Fonction :	Stagiaire		
Visa :	MK		

- Préparation de la pompe injectrice de KOH

Coincer le tube dans le boîtier. (le faire entrer et sortir par le haut)
Insérer le tube dans le flacon de KOH posé sur la balance (sous benzène, mettre un parafilm autour afin d'éviter de faire rentrer l'air).

Faire fonctionner la pompe afin de faire remonter la soude jusqu'au bout du tube afin que la première insertion soit précise.

Noter la masse indiquée par la balance qui permettra de calculer la masse de soude insérée.

Insertion sonde pH et ensemencement

- Rincer la sonde pH à : l'eau distillée, éthanol puis eau osmosée stérile.
- Insérer la sonde dans le fermenteur sous bec benzène.
- Mettre en fonctionnement l'agitation, la température, le pH, le volume de base sur la console.
- Lancer l'acquisition du logiciel.
 - > Noter l'heure du lancement de l'acquisition.
- Ensemencer le volume nécessaire de culture sous benzène.
 - > Noter l'heure d'ensemencement.

Récolte du fermenteur / arrêt enregistrement

- Noter la masse sur la balance.
- Arrêter l'acquisition : Fichier, Arrêter.
- Arrêter la température et le pH sur la console.
- Fermer robinet d'eau.
- Retirer le tube de la soude de la pompe avec des gants, et l'insérer dans un bécher d'eau afin de laisser la soude s'échapper.
- Enlever la connectique pH en rouge, le capteur de température, les tuyaux d'eau.
- Si récolte : (nécessite au moins 2 personnes)
 - > Se positionner en dessous le fermenteur avec le bec benzène.
 - > Prendre les pots de centrifugation.
 - > Dévisser la pince de Mors et remplir le pot.
 - > Enlever l'aluminium autour du bouchon afin de refermer sous la flamme.

Nettoyage du fermenteur

- Enlever la sonde pH, la rincer à l'eau du robinet, éthanol et eau distillée -> mettre dans pepsine (**pas plus d'1h**) et remettre dans KCl.
- Enlever les tubes et vis.
- Nettoyer toutes les vis et bouchons à l'eau du robinet, savon et eau osmosée.
- Nettoyer tous les tubes à l'eau osmosée.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	<i>Mariane Kniest</i>		
Fonction :	<i>Stagiaire</i>		
Visa :	MK		


- Nettoyer la cuve (bassine de la halle) : à l'eau du robinet, savon et eau osmosée.
- Tout déposer sur du papier afin de les faire sécher.

Rangement du fermenteur et préparation au prochain autoclave

- Remettre les vis sur le fermenteur.
- Remettre les tubes avec filtres sur les deux ouvertures.
- Avant tout autre autoclave pour réutilisation :
 - > Mettre glycérol sous la capsule.
 - > Boucher toutes les ouvertures : mettre deux filtres (entouré chacun de deux pinces de mors avec au bout du coton et de l'alu) et laisser toujours une ouverture (condensateur : filtre orange sans pinces de mors)
 - > Mettre du coton dans du papier gas pour protéger les sondes températures et recouvrir d'alu.
 - > Mettre de l'alu autour de l'arbre d'agitation.
 - > Faire l'autoclave du tube avec pic d'ajout de KOH avec les deux extrémités sous coton et alu.
- Autoclave à vide : 120°, 20 min
- Autoclave plein : 110°, 20 min

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	<i>Mariane Kniest</i>		
Fonction :	<i>Stagiaire</i>		
Visa :	MK		

ANNEXE VII : Protocole d'utilisation du bioréacteur Sartorius Biostat A plus

	Mode opératoire	Réf :
Unité 0782 UMR Génie et Microbiologie des procédés alimentaires	Fonctionnement du fermenteur 5L (préparation, utilisation et nettoyage)	Version 1 date : 23/09/2014 page 1/5

1. Objet et domaine d'application

Préparation, utilisation et nettoyage du fermenteur 5L

2. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Sans objet

3. Historique des modifications

Version	Date	Nature de la modification
1	23/09/14	-

4. Hygiène et sécurité

La manipulation d'hydroxyde de potassium (KOH) fortement concentré nécessite de porter des gants adaptés, des lunettes de protection, une blouse et des chaussures fermées. Jeter tout déchet de soude dans un bidon réservé à cet usage.

5. Principe de la méthode

Le fermenteur permettant le réglage de paramètres au cours de la fermentation, l'étalonnage des instruments est donc primordial afin d'être sûr de suivre correctement le procédé. Il est donc nécessaire de respecter les étapes d'étalonnage, d'utilisation et de nettoyage. Le fermenteur aura été préalablement autoclavé à vide puis rempli afin d'éviter la contamination de la souche bactérienne.

6. Matériels nécessaires

Pour l'étalonnage :

- Balance
- Masses (petite et grosse)
- Solutions tampons (pH 7 et 4)
- Porte sonde
- Pompe + vis

Pour l'ensemencement :

- Pipette stérile
- Pipette boy

Pour l'utilisation : (récolte)

- béciers
- pots de centrifugation

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	<i>Mariane Kniest</i>		
Fonction :	<i>Stagiaire</i>		
Visa :	<i>MK</i>		

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

Hydroxyde de potassium ()

8. Contraintes de la méthode

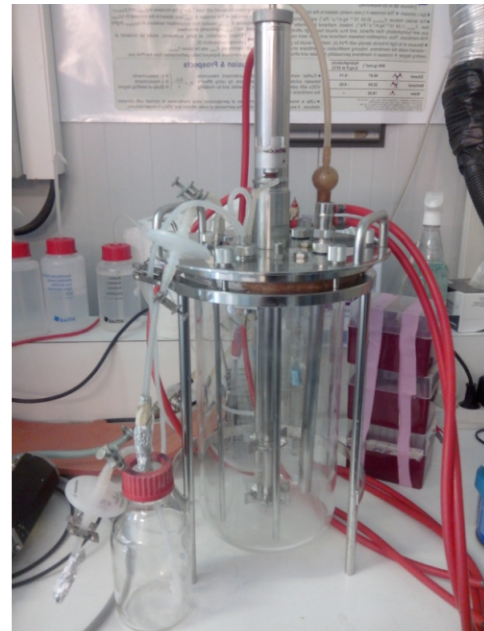
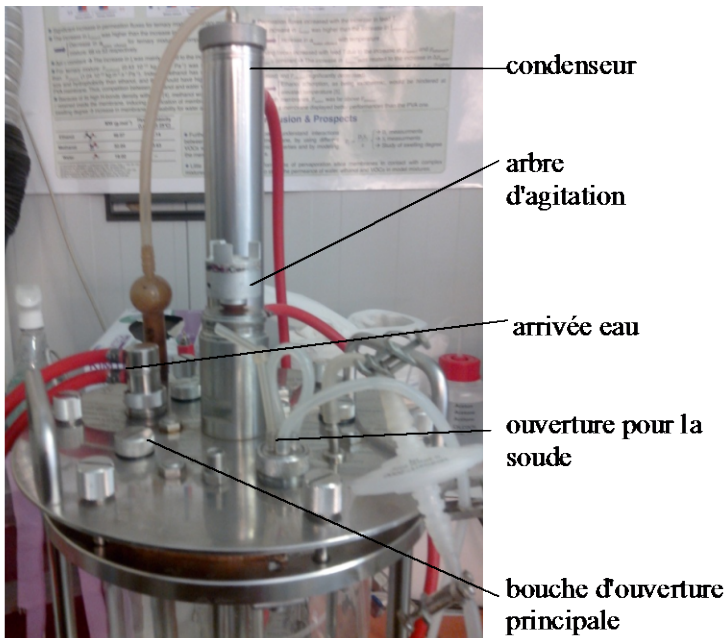
La principale contrainte du fermenteur est de rester stérile. Pour cela l'utilisation d'un bec benzène est de rigueur, il faudra donc positionner le fermenteur de telle façon que les ouvertures utilisées soit accessible.

9. Contenu du mode opératoire

Branchements (fermenteur et ordinateur)

- Fermenteur

Positionner correctement le fermenteur de façon à pouvoir prélever sans difficulté (condenseur derrière et bouche d'ouverture devant).

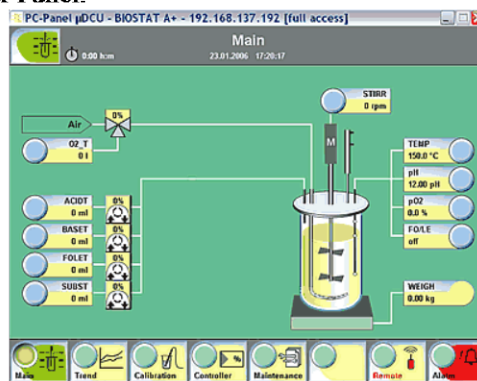


	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	<i>Mariane Kniest</i>		
Fonction :	<i>Sagiaire</i>		
Visa :	<i>MK</i>		

- Brancher les tubes au condenseur. (2 rouges)
- Brancher l'eau au système de chauffage et ouvrir le robinet d'eau. (2 rouges)
- Placer le manteau thermique autour du fermenteur.
- Remplir d'eau l'emplacement de la sonde température.
- Allumer le bloc contrôle fermenteur.

- Ordinateur portable

- Brancher l'alimentation + le câble ethernet.
- Allumer le PC.
- Lancer le logiciel PC Panel microCU/
- Cliquer sur Master Panel.



Etalonnage du matériel

- étalonnage sonde pH:

Sélectionner la voie à réguler sur la console : pH et couper régulation de la température.

Sur le logiciel : sélectionner la voie à étalonner (pH).

Relier la sonde au détecteur de pH. (connectique rouge).

Préparation du plan de travail :

- > Prendre un porte sonde / régler suivant la hauteur de la sonde.
- > Positionner un bécher avec un peu d'eau distillée.

Commencer par la solution tampon à pH7 :

- > Valeur à mettre à 7 sur le logiciel.
- > Nettoyer la sonde à l'eau osmosée, essuyer.
- > Mettre dans solution tampon, attendre 5 min, rincer, essuyer.

Faire la même chose avec solution tampon pH4.

Remettre sonde dans KCl.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Mariane Kniest		
Fonction :	Stagiaire		
Visa :	MK		

- Mettre les valeurs consignes de température, pH et agitation

Insertion sonde pH et ensemencement

- Actionner l'agitation et la température.
- Installation du tube de KOH

Le positionner dans la console jaune. (tourner dans sens des aiguilles d'une montre)

Le transférer dans la bouteille sous benzène.

Donner une consigne au logiciel de pH 8 afin de faire remonter la base dans le tuyau et attendre la remontée.

Préparer un pH plus bas et mettre OFF, cliquer sur OK lorsque la soude est en haut du tuyau.

- Rincer la sonde pH à : l'eau distillée, éthanol puis eau osmosée stérile.
- Insérer la sonde dans le fermenteur sous bec benzène.
- Lancer le logiciel protocol service



Start batch : donner le nom de votre projet.

Voir, Run, Plotting.

Sélectionner le projet.

Sélectionner les variables à enregistrer.

! !!!Afin de voir l'enregistrement : aller dans run\plotting, sélectionner le fichier puis les voies à visualiser, cliquer sur refresh (!)

Noter l'heure du lancement de l'acquisition.

- Lancer le pH à la valeur voulue dans le logiciel microCU.
- Noter le volume mort.
- Ensemencer le volume nécessaire de culture sous benzène.
Noter l'heure d'ensemencement.
Noter la valeur du pH affiché.

Récolte du fermenteur / arrêt enregistrement

- Arrêter l'acquisition du logiciel protocol service : Stop Batch

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Mariane Kniest		
Fonction :	Stagiaire		
Visa :	MK		

- Arrêter la température et l'agitation sur la console. (laisser le pH)
- Fermer robinet d'eau.
- Retirer le tube de la soude de la pompe avec des gants, et l'insérer dans un bécher d'eau afin de laisser la soude s'échapper.
- Enlever la connectique pH, le capteur de température, les tuyaux d'eau.
- Si récolte : (nécessite au moins 2 personnes)
 - Se positionner en dessous le fermenteur avec le bec benzène.
 - Prendre les pots de centrifugation.
 - Dévisser la pince de Mors et remplir le pot.
 - Enlever l'aluminium autour du bouchon afin de refermer sous la flamme.

Nettoyage du fermenteur

- Enlever la sonde pH, la rincer à l'eau du robinet, éthanol et eau distillée -> mettre dans pepsine (**pas plus d'1h**) et remettre dans KCl.
- Enlever les tubes et vis.
- Nettoyer toutes les vis et bouchons à l'eau du robinet, savon et eau osmosée.
- Nettoyer tous les tubes à l'eau osmosée.
- Nettoyer la cuve (bassine de la halle) : à l'eau du robinet, savon et eau osmosée. (**attention fragile**)
- Tout déposer sur du papier afin de les faire sécher.

Rangement du fermenteur et préparation au prochain autoclave

- Remettre les vis sur le fermenteur.
- Remettre les tubes avec filtres sur les deux ouvertures.
- Avant tout autre autoclave pour réutilisation :
 - Mettre glycérol sous la capsule.
 - Boucher toutes les ouvertures : mettre deux filtres (entouré chacun de deux pinces de mors avec au bout du coton et de l'alu) et laisser toujours une ouverture (condensateur : filtre orange sans pinces de mors)
 - Mettre du coton dans du papier gas pour protéger les sondes températures et recouvrir d'alu.
 - Mettre de l'alu autour de l'arbre d'agitation.
 - Relier la bouteille au fermenteur et mettre deux pinces.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	<i>Mariane Kniest</i>		
Fonction :	<i>Stagiaire</i>		
Visa :	<i>MK</i>		

*« Que conclure à la fin de tous mes longs propos ? C'est que les préjugés
sont la raison des sots »*

(François-Marie Arouet, dit Voltaire, Poème sur la Loi Naturelle, 1756)