



**HAL**  
open science

# Cinétique et modélisation de la production de pénicilline acylase par *Escherichia coli* recombinée sur milieu complexe

Chantal Cayuela

## ► To cite this version:

Chantal Cayuela. Cinétique et modélisation de la production de pénicilline acylase par *Escherichia coli* recombinée sur milieu complexe. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1990. Français. NNT : 1990INPL087N . tel-01751003

**HAL Id: tel-01751003**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751003v1>**

Submitted on 29 Mar 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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

1360089012

**INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires  
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique

**THESE**

présentée  
en vue d'obtenir le diplôme de  
**DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

par

**Chantal CAYUELA**  
Ingénieur ENSAIA

---

**CINETIQUE ET MODELISATION  
DE LA PRODUCTION DE PENICILLINE ACYLASE  
PAR *Escherichia coli* RECOMBINEE SUR MILIEU COMPLEXE**

---

Soutenue publiquement le 6 Novembre 1990 devant la Commission d'Examen

**JURY :**

Président : M. J-M. ENGASSER

Rapporteurs : M<sup>me</sup> C. BRANLANT  
M. J-L. SIMON

Examineurs : MM. J. BOUDRANT  
J-B. GROS

Service Commun de la Documentation  
INPL  
Nancy-Brabois



*A ma mère,  
A ma famille ...*



... *J'ai conjuré le sort  
J'ai recherché l'oubli  
J'ai refusé la mort  
J'ai rejeté l'ennui  
Et j'ai fermé les poings  
Pour m'ordonner de croire  
Que la vie était belle  
Fascinant le hasard ...*

*Barbara (Soleil Noir)*





## A V A N T - P R O P O S

*Je tiens à remercier Monsieur Daniel Tondeur, directeur du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique de Nancy, de m'avoir accueillie dans son laboratoire.*

*Ce travail a été réalisé dans le groupe GPBA sous la direction de Monsieur Jean-Marc Engasser, Professeur à l'E.N.S.A.I.A. (Nancy). Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour l'intérêt qu'il a toujours porté à ce travail ainsi que pour ses judicieux conseils.*

*Je tiens également à remercier Madame Christiane Branlant, Directeur de Recherche (CNRS) au Laboratoire d'Enzymologie et de Génie Génétique (Université Nancy I), pour la qualité de son accueil et sa précieuse collaboration.*

*Je remercie Monsieur Joseph Boudrant, Directeur de Recherche (CNRS) au LSGC pour toute l'aide et les conseils éclairés qu'il m'a apportés.*

*Je remercie Messieurs Jean-Luc Simon, Ingénieur dans le Département Biotechnologie (Rhône-Poulenc), et Jean-Bernard Gros, Professeur à l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand), d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse.*

*Un travail de recherche étant avant tout un formidable travail d'équipe, je tiens à présenter et à remercier :*

*A la technique : Mme Dominique Storck, Marie-Thérèse, Evelyne, Bernard.*

*A la faculté des sciences : Nathalie, Hassane, Sylvie, Jean-Paul, Evelyne, Jacqueline, Annie.*

*Au thé quotidien : Jocelyne, Louise, Anne, Mohamed, Aung, Freire, Michel, Bruno.*

*Au soutien moral : Catherine, Isabelle, Christophe, Laila, Caroline, Rona.*

*Au soutien des thésards : Nassim, Emmanuel, Dominique.*

*Et au piano : Stéphane.*

*"merci de vous"*



# SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION	p 1
PARTIE A : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	p 6
I - Microorganismes recombinés : utilisation et construction	p 8
II - Présentation de la pénicilline acylase	p 29
III - Aspect microbiologique	p 42
IV - Modélisation	p 54
PARTIE B : MATERIEL ET METHODES	p 73
I - Présentation de la souche et du vecteur	p 76
II - Réactifs	p 78
III - Stérilisation	p 79
IV - Appareils	p 80
V - Conduite des fermentations	p 82
VI - Méthodes d'analyse	p 86
VII - Exploitation des données expérimentales	p 98
PARTIE C : ETUDES PRELIMINAIRES DES CONDITIONS DE CULTURE POUR LA PRODUCTION DE PENICILLINE ACYLASE ET COMPARAISON DE LA SOUCHE HOTE ET DE LA SOUCHE RECOMBINEE	p 101
I - Mise au point des conditions de culture pour la production de pénicilline acylase	p 104
II - Comparaison de la souche hôte et de la souche recombinée	p 128
PARTIE D : ETUDE DES CINETIQUES ET DES PERFORMANCES DES CULTURES EN REACTEURS DISCONTINU, SEMI-CONTINU ET CONTINU	p 138
I - Etude des cinétiques et des performances en culture discontinue	p 145
II - Etude des cinétiques et des performances en culture semi-continue	p 179
III - Etude des cinétiques et des performances en culture continue	p 200
IV - Comparaison des cinétiques et des performances de la souche G271 dans les trois modes de culture	p 218
PARTIE E : MODELISATION	p225
I - Elaboration du modèle	p 229
II - Identification des paramètres du modèle	p 244
III - Application du modèle : optimisation des conditions d'alimentation pour une fermentation semi-continue	p 299
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	p 312
ABREVIATIONS	p 317
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p 320



## INTRODUCTION

Les cellules vivantes sont des réacteurs chimiques d'une grande complexité : une cellule contient plus de mille protéines différentes, participant aux réactions intracellulaires. La physiologie d'une cellule est déterminée par son matériel génétique (ADN), et une modification de l'ADN altère les capacités métaboliques de la cellule. Les mutations (modifications de l'ADN) sont provoquées aléatoirement lorsque la cellule est soumise à un environnement "stressant". Les mutants qui ont une spécificité métabolique plus importante sont très employés pour les fermentations industrielles. Durant ces quinze dernières années, la manipulation de l'ADN au niveau moléculaire a progressé (réarrangement de séquence d'ADN) permettant d'utiliser la technologie de l'ADN recombiné.

Cette technologie est utilisée pour produire en grande quantité des protéines recombinantes synthétisées naturellement ou non par l'organisme hôte. Il existe actuellement sur le marché quelques produits issus de cette technologie (insuline, hormone de croissance, vaccin...). L'utilisation de cette technologie se heurte à de nombreux problèmes législatifs.

Pour construire un microorganisme recombiné il faut choisir un hôte et un vecteur. Le vecteur doit permettre de surproduire la protéine hétérologue. Le vecteur est choisi en fonction du promoteur transcriptionnel, de son nombre d'exemplaires et de sa stabilité dans la cellule. Un système hôte idéal doit exprimer correctement le gène cloné, réaliser les modifications post-traductionnelles éventuellement nécessaires, être peu exigeant en éléments nutritifs et se développer rapidement. Trois systèmes sont actuellement utilisés : la bactérie *Escherichia coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules de mammifères. Le choix du système hôte est guidé par les caractéristiques de la protéine hétérologue.

Les principaux inconvénients de la technologie de l'ADN recombiné sont d'une part l'instabilité du vecteur et d'autre part la qualité parfois imparfaite de la protéine produite. Les problèmes rencontrés sont actuellement résolus au cas par cas. Une connaissance plus approfondie du comportement des microorganismes recombinés permettra de dégager une stratégie générale pour l'exploitation de cette technologie.

La modélisation des cultures est un outil très employé permettant entre autres de structurer les connaissances acquises sur le comportement d'un microorganisme. De plus, les modèles mathématiques sont aussi employés pour le contrôle et l'optimisation des procédés fermentaires. Il

existe dans la littérature de nombreux modèles applicables aux microorganismes recombinés. La production de protéines recombinantes est toujours réalisée sur des milieux complexes, et dans ces conditions, le comportement des microorganismes est mal connu. Les modèles sont élaborés en simplifiant les conditions de culture, un milieu complexe est généralement assimilé à un milieu synthétique. Il est donc intéressant d'essayer de construire un modèle applicable aux cultures sur milieux complexes.

L'élaboration d'un modèle mathématique se décompose en plusieurs étapes. La première consiste à établir les lois cinétiques à partir des phénomènes clefs déterminant la croissance, la production d'un métabolite et la consommation des substrats. De nombreux paramètres cinétiques sont employés dans les expressions mathématiques des lois cinétiques, aussi l'identification des paramètres constitue la deuxième étape. Enfin, le modèle est validé en comparant les cinétiques simulées et expérimentales. L'étape d'identification des paramètres bien que très importante ne s'appuie généralement pas sur une méthodologie bien définie. Les autres étapes ont, elles, été systématisées, ce qui a permis d'élaborer des logiciels d'aide à la modélisation.

Le travail que nous avons effectué s'inscrit dans cette optique et le système hôte vecteur utilisé est une souche d'*E. coli* recombinée produisant de la pénicilline acylase (PA). Cette enzyme est industriellement utilisée pour la production d'acide 6-aminopénicillanique. Ce composé est un intermédiaire clef utilisé dans la synthèse d'antibiotiques semi-synthétiques dont l'utilisation est en plein essor. La pénicilline acylase est une enzyme d'un grand intérêt industriel justifiant pour sa production la mise en œuvre de microorganismes recombinés.

Les objectifs de notre travail sont multiples. Nous étudierons les interactions entre la cellule hôte et le vecteur. Nous analyserons le comportement du microorganisme recombiné cultivé sur milieu complexe. Nous emploierons 3 différents modes de culture : discontinu, semi-continu et continu, de manière à déterminer les phénomènes clefs qui nous permettront de définir les lois de croissance, de production de la PA et de consommation des substrats. Nous établirons ensuite un modèle applicable à la culture sur milieu complexe d'un microorganisme recombiné. Au cours de cette étude, nous développerons une méthodologie pour identifier les paramètres cinétiques du modèle.

La première partie de notre travail sera consacrée tout d'abord au choix des conditions de cultures favorables à la production de PA, lesquelles seront conservées pour la suite de l'étude. Puis, nous étudierons l'influence du plasmide sur le comportement de la souche hôte.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude cinétique de la souche en fermentations discontinue, semi-continue et continue. Nous comparerons d'une part les performances de la souche en fonction du mode de culture et d'autre part, nous analyserons le comportement de la souche sur un milieu complexe.

Dans la dernière partie, nous proposerons un modèle applicable à la fermentation, en milieu complexe, de la souche *E. coli* recombinée pour la production de PA. Dans cette partie, nous développerons une méthode visant à rationaliser l'estimation des paramètres du modèle.





*PARTIE A*

---

*ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

---



## PARTIE A : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I - Microorganismes recombinés : utilisation et construction</b>	p 8
<b>I.1. - <u>Historique et aspect industriel</u></b>	p 8
<i>I.1.1. - Historique</i>	p 8
<i>I.1.2. - Aspect industriel</i>	p 8
<b>I.2. - <u>Systèmes hôtes-vecteurs</u></b>	p 12
<i>I.2.1. - Systèmes hôtes</i>	p 12
<i>I.2.2. - Systèmes vecteurs</i>	p 16
<i>I.2.3. - Couples hôte-vecteur</i>	p 18
I.2.3.1. - Modes d'expression	p 18
I.2.3.2. - Contrôle du nombre de copies de plasmides par cellule	p 21
I.2.3.3. - Instabilité du vecteur	p 21
I.2.3.4. - Relations entre la cellule hôte et son vecteur	p 24
<b>I.3. - <u>Conclusion</u></b>	p 27
<b>II - Présentation de la pénicilline acylase</b>	p 29
<b>II.1. - <u>Présentation de la pénicilline acylase</u></b>	p 29
<i>II.1.1. - Microorganismes producteurs</i>	p 29
<i>II.1.2. - Activité enzymatique</i>	p 31
<i>II.1.3. - Synthèse de la pénicilline acylase</i>	p 31
II.1.3.1. - Pénicilline acylase : le gène	p 31
II.1.3.2. - Régulation de la synthèse de la pénicilline acylase	p 33
<b>II.2. - <u>Production de la pénicilline acylase</u></b>	p 36
<i>II.2.1. - Production de la pénicilline acylase par E. coli</i>	p 36
<i>II.2.2. - Production de la pénicilline acylase par E. coli recombinée</i>	p 39

<b>III - Aspect microbiologique</b>	p 42
III.1. - <u>Présentation de la souche</u>	p 42
III.2. - <u>Principaux paramètres de la croissance</u>	p 42
III.2.1. - <i>Source de carbone et d'énergie</i>	p 42
III.2.2. - <i>Source d'azote</i>	p 43
III.2.3. - <i>pH</i>	p 45
III.2.4. - <i>Aération</i>	p 47
III.2.5. - <i>Température</i>	p 47
III.3. - <u>Stratégies utilisées pour la conduite des fermentations de <i>E. coli</i></u>	p 48
III.3.1. - <i>Stratégies utilisées pour la conduite des fermentations de <i>E.coli</i> non recombinée</i>	p 48
III.3.2. - <i>Stratégies pour la conduite des fermentations de <i>E. coli</i> recombinée</i>	p 51
III.3.3. - <i>Discussion</i>	p 52
<b>IV - Modélisation</b>	p 54
IV.1. - <u>Modèles pour <i>E. coli</i></u>	p 55
IV. 1.1.- <i>Modèles non structurés</i>	p 55
IV. 1.2.- <i>Modèles cybernétiques</i>	p 58
IV. 1.3.- <i>Modèles structurés</i>	p 59
IV. 1.3.1.- <i>Modèles à compartiments</i>	p 59
IV. 1.3.2.- <i>Modèles physiologiques</i>	p 61
IV.2. - <u>Modèles pour <i>E. coli</i> recombinée</u>	p 63
IV. 2.1. - <i>Modèles non structurés</i>	
IV. 2.2. - <i>Modèles structurés</i>	p 65
IV. 2.2.1. - <i>Modèles à compartiments</i>	p 69
IV. 2.2.2. - <i>Modèles physiologiques</i>	p 69
IV.3. - <u>Discussion</u>	p 72

## PARTIE A : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I - Microorganismes recombinés : utilisation et construction

#### I.1. - Historique et aspect industriel

##### *I.1.1. - Historique*

Si depuis les années 70 la littérature scientifique s'enrichit des progrès réalisés en biologie moléculaire (**Tab. A 1**), elle ne traite que depuis 1985 de ses retombées et de ses applications au génie biochimique.

Pour modifier les potentialités d'une souche, il existe deux possibilités : la mutation et la recombinaison. Il a fallu attendre que certains progrès soient réalisés en biologie moléculaire (**Tab. A 1**) pour utiliser la recombinaison, alors que la mutation était déjà employée depuis longtemps. La recombinaison est un procédé qui permet de produire une nouvelle combinaison de gènes à partir de gènes présents dans des individus différents. De cette façon, nous pouvons soit améliorer les potentialités d'un microorganisme, c'est-à-dire augmenter sa capacité de production, soit modifier ses potentialités, c'est-à-dire lui faire produire une protéine qui lui est étrangère.

Alors qu'il y a environ 200 sociétés en biotechnologie qui cherchent à produire des protéines humaines à but thérapeutique, seules quelques unes de ces molécules sont recombinantes (cf § suivant). Pourtant les avantages de produire de telles protéines dans des procaryotes (bactéries surtout) paraissent évidents : le milieu de culture est relativement simple et peu coûteux et le temps de génération des bactéries est beaucoup plus court ce qui permet de produire des protéines très difficiles voire impossibles à obtenir par d'autres moyens.

##### *I.1.2. - Aspect industriel*

Bien qu'il y ait de nombreuses recherches effectuées sur des protéines différentes, peu sont actuellement sur le marché (**Tab. A 2**) :



**18ème siècle** – Croisements et études statistiques des variations sur animaux et végétaux.

**1865** – Mendel formule ses lois de l'hérédité qui constituent la base de la génétique « classique ».

**1869** – Miescher découvre les acides nucléiques dans les noyaux cellulaires des leucocytes.

**1875** – Hertwig étudie le mécanisme de la division cellulaire et démontre son rôle dans la fécondation.

**1883** – Roux et Weisman étudient les chromosomes comme « porteurs des tendances héréditaires ».

**1900** – Correns, Tschermak et de Vries vérifient les lois de l'hérédité de Mendel.

**1902/1904** – Sutton et Boverie : la théorie chromosomique de l'hérédité justifie les lois de Mendel.

**1944** – Avery, MacLeod et McCarty démontrent que l'acide désoxyribonucléique est porteur de l'information génétique.

**1953** – Watson et Crick découvrent le modèle en double hélice de l'A.D.N.

**1960** – Jacob et Monod : projet de modèle pour des fragments spécifiques d'A.D.N. (gènes) ; ils découvrent les mécanismes d'induction et de répression.

**1961** – Nirenberg et Ochoa décryptent la traduction de l'information génétique en protéines.

**1971** – Arber, Smith et Nathans découvrent d'importants instruments du génie génétique : les enzymes de restriction.

**1972** – Berg parvient à greffer un gène bactérien à un virus.

**1972** – Khorana : première synthèse d'un gène complet.

**1973** – Boyer et Cohen découvrent le rôle possible de vecteurs génétiques des plasmides bactériens.

**1975/1977** – Sanger et Barrell ainsi que Maxam et Gilbert mettent au point des méthodes de séquençage rapide d'A.D.N.

**1978** – Goodman, Rutter, Gilbert e.a. réussissent la synthèse de l'insuline de rats dans des bactéries.

**A partir de 1979** – Bishop, Weinberg, Wigler, Barbacid et autres : nouvelles découvertes dans la génétique des tumeurs.

**1981** – Caruthers et Ogilvie développent des procédés pour la synthèse automatisée de gènes.

**A partir de 1982** – Palmiter, Brinster e.a. mettent au point des méthodes pour la transmission de gènes dans l'organisme animal à l'aide de rétrovirus.

**A partir de 1984** – Application croissante des méthodes du génie génétique dans les domaines de la biologie et de la médecine. Nouvelles découvertes concernant les mécanismes de régulation des cellules, la structure des récepteurs, les modèles d'antigènes.

**Tableau A 1 : Historique de la génétique expérimentale (GAREIS, 1989).**

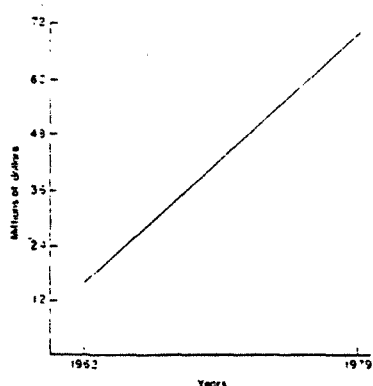
*Typical impurities in protein pharmaceuticals, their detection and target levels*

Impurity	Category	Detection methods	Target levels <sup>a</sup>
Endotoxin	Undefined	Rabbit pyrogen, LAL	Dependent on dose, duration and route of administration <sup>54</sup>
Host cell and media proteins	Undefined	SDS-PAGE, immunoassay	Parts-per-million <sup>12,13</sup>
Monoclonal antibodies and defined production proteins	Defined	SDS-PAGE, immunoassay	Parts-per-million <sup>26,38,48</sup>
DNA	Undefined	Hybridization assays, antibody or binding protein sandwich assays	< 10–100 pg per dose <sup>20,50</sup>
Infectious agents	Undefined	Reverse transcriptase assay, cell culture cytopathic effects (CPE), electron microscopy	Eliminated or inactivated <sup>10,15,18,37</sup>
Product variants	Defined		
Deamidation products		Isoelectric focusing	
Oxidation products		HPLC	
Amino acid substitutions		HPLC-tryptic mapping	Dependent on the product complexity <sup>b</sup>
Aggregated forms		GPC	
Proteolytic products		SDS-PAGE, HPLC	
Highly conserved or homologous host cell species proteins		Monoclonal antibody-based immunoassays	

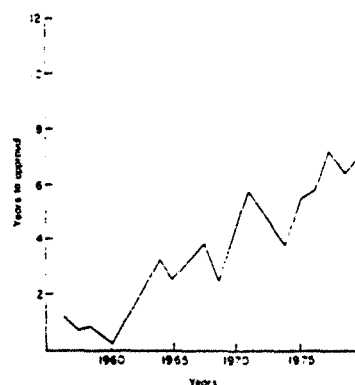
<sup>a</sup>The values presented represent the range of established levels or values which have been published for particular rDNA pharmaceuticals. The references discuss these levels and related issues.

<sup>b</sup>The target levels for these variants must be examined on a case by case basis for each product. Generally variants greater than 0.5% should be characterized<sup>11,14,25</sup>.

**Tableau A 3 :** Impuretés des protéines d'intérêt pharmaceutique, leur détection et les doses limites (ANICETTI et coll., 1989).



**Figure A 1 :** Augmentation du coût de développement d'une nouvelle molécule (avant sa commercialisation) entre les années 1962 et 1979 (PRIMROSE, 1986).



**Figure A 2 :** Augmentation de la période de développement d'une nouvelle molécule entre les années 1955 et 1980 (PRIMROSE, 1986).



Produits	Hôtes	Sociétés
insuline	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	E. Lilly - Bertin - Hoechst Novo
Hgh	<i>E. coli</i> cellules CHO	Genentech/Kabi - Sanofi-Eli Lilly Serono
tpA	cellules CHO	Genentech
vaccin contre la rage	virus de la vaccine	(Transgène) Inst. Pasteur
chymosine	<i>E. coli</i> <i>Kluveromyces lactis</i> <i>Aspergillus niger</i>	Pfizer Gist-Brocades Genencor
thréonine	<i>E. coli</i>	Eurolysine
antigène du vaccin contre l'hépatite	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> cellules CHO	Merck SmithKline Beecham Pasteur-Mérieux
pénicilline acylase	<i>E. coli</i>	Boehringer
$\alpha$ -amylase	<i>Bacillus subtilis</i>	Enzyme Biosystems

Tableau A 2 : Protéines hétérologues commercialisées.  
(ARBIGE et PITCHER 1989 et DODET 1990)

Les problèmes rencontrés, avec l'utilisation des microorganismes recombinés sont essentiellement le contrôle de l'expression et de la stabilité du plasmide (cf. § I.2.3.) ainsi que la qualité du produit fini. Il faut en effet prouver que la composition et la structure de la protéine obtenue est correcte et aussi, qu'il n'y ait pas d'impuretés pouvant provenir du milieu ou du produit lui-même. ANICETTI et coll. (1989) établissent une classification des impuretés (Tab. A 3) et énumèrent les techniques utilisées pour étudier la qualité de la protéine. Ils soulignent le fait qu'il n'y a pas un protocole établi applicable à toutes les protéines. Actuellement chaque cas est résolu au coup par coup. Aussi la période qui précède la mise sur le marché d'une nouvelle molécule est de plus en plus coûteuse et de plus en plus longue (Fig. A 1 et A 2). En effet, le budget consacré à la recherche est négligeable par rapport au coût que représente la période qui précède la mise sur le marché et pendant laquelle de nombreux tests sont effectués :

- tester les produits utilisés pendant la fermentation (toxicité, pathogénicité, pyrogénicité, stérilité...),
- vérifier que la structure, l'activité biologique et immunologique sont identiques à la protéine naturelle,
- s'assurer qu'il n'y a pas de contaminants issus de la production (endotoxines, ADN oncogène...),
- s'assurer que le mode de production est reproductible c'est-à-dire que qualitativement le même produit est obtenu (avec les mêmes contaminants).

Mais avant d'arriver à la phase de production industrielle, il faut construire le système hôte/vecteur c'est-à-dire choisir un hôte et un vecteur.

## I.2. - Systèmes hôtes-vecteurs

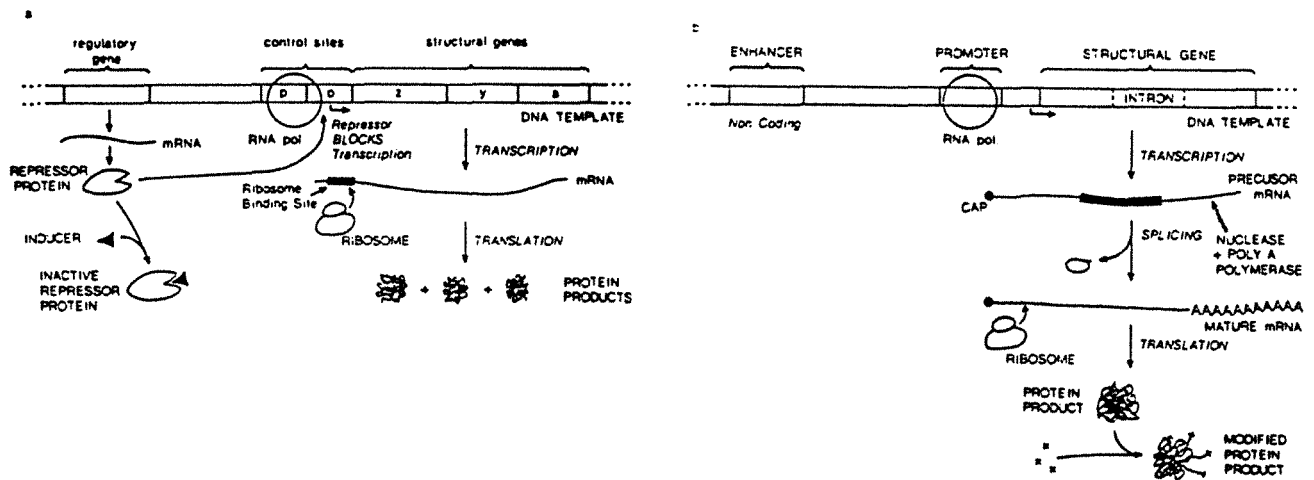
### I.2.1. - *Systèmes hôtes*

Il existe de nombreux systèmes hôtes (Tab. A 4), qui vont des bactéries aux cellules d'eucaryotes.

	HOTES	AVANTAGES	INCONVENIENTS
bactéries	<i>E. coli</i>	- beaucoup d'informations sur physiologie et biologie moléculaire - utilisation de nombreux systèmes d'expression	- pas de sécrétion - protéines mal glycosylées - protéines insolubles
	<i>Bacillus</i>	- bonne sécrétion - pas pathogène - utilisé industriellement	- protéases - problèmes de transformations post-translacionnelles
levures & champignons	<i>S. cerevisiae</i>	- beaucoup d'informations sur la physiologie et la biologie moléculaire - utilisations industrielles - microorganisme sain - sécrétion - glycosylation	- faible taux d'expression (de 5 à 10 plasmides/cellule) - cellules difficiles à casser - glycosylation imparfaite
	<i>Streptomyces</i>	- forte densité cellulaire - utilisé industriellement - bonne sécrétion	- moins bonne connaissance
	Champignons filamenteux	- bonne sécrétion - bonne glycosylation - pas pathogène	- variabilité de la production tout dépend de l'insertion - protéases - moins de connaissance sur l'expression
cellules eucaryotes	Cellules animales	- bonne glycosylation	- croissance lente - milieu coûteux - pb. de culture en grande quantité
	Cellules végétales	- protéines actives	- cellules fragiles, mise en œuvre délicate - croissance lente - milieu coûteux
	cellules d'insectes	- bonne sécrétion - maturation correcte - milieu aprotéiques	- cellules fragiles - glycosylation parfois imparfaite

Tableau A 4 : Les différents organismes hôtes, leurs avantages et leurs inconvénients

*E. coli* a été le premier hôte utilisé car sa physiologie et sa génétique sont très bien connues d'une part, et d'autre part, une grande variété de systèmes d'expression peut être utilisée. Cependant l'utilisation de cellules procaryotes et de cet hôte en particulier ne va pas sans poser de problèmes. La figure A 3 met en évidence les différences qui existent entre l'expression d'un gène chez un procaryote et un eucaryote.



**Figure A 3 :** Mécanisme d'expression d'un gène chez un procaryote (a) et chez un eucaryote (b) (WALKER et GINGOLD, 1988).  
 RNA pol : ARN polymérase ADN dépendante  
 P : promoteur, O : opérateur, ➔ : site d'initiation de la transcription

Pour exprimer un gène d'eucaryote chez un procaryote il faut contourner un certain nombre de problèmes. Pour obtenir un ADN sans introns, nous pouvons synthétiser soit un ADN complémentaire à partir d'un ARNm et de la transcriptase reverse soit un ADN à partir de la composition en acides aminés de la protéine. Dans ce dernier cas il faut faire attention au choix des codons par rapport à l'hôte. Les séquences promotrices entre les cellules animales ou végétales et les bactéries sont différentes. Pour les bactéries, il faut les séquences TTGACA (séquence -35) et TATAAT (boîte de Pribnow à -10). Les promoteurs souvent utilisés chez les bactéries sont le promoteur lactose (lac), tryptophane (trp), une composition des deux (tac) ou le promoteur  $P_L$  du phage  $\lambda$ . Chez les eucaryotes, il n'y a pas de site de fixation du ribosome sur l'ARNm (séquence Shine Dalgarno), il faut donc intégrer dans le gène à cloner une telle séquence entre -3 et -11, complémentaire à l'extrémité 3' de la molécule 16S de l'ARNm. Chez les eucaryotes, il y a utilisation de codons spécifiques et de plus, il y a des modifications post traductionnelles qui sont

indispensables pour obtenir une protéine active. Ces problèmes sont communs à tous les hôtes procaryotes. Chez *E. coli* plus spécifiquement, nous rencontrons des problèmes liés à la sécrétion et à la qualité de la protéine (glycosylation imparfaite, inclusions, pyrogénicité).

En effet cette bactérie ne secrète pas ou peu les protéines qu'elle synthétise. Or, la sécrétion est recherchée pour plusieurs raisons :

- évite l'accumulation de protéines insolubles,
- évite que les protéases intracellulaires détruisent la protéine,
- permet de glycosyler les protéines,
- évite de lyser les cellules pour récupérer le produit,
- facilite la purification,
- évite l'accumulation de la protéine qui peut dans certains cas être toxique.

Il existe cependant des techniques qui peuvent être utilisées pour contourner le problème de la sécrétion (Tab. A 5).

Moyens	Commentaires
Cellules qui ont une membrane affaiblie : la protéine peut fuir dans le milieu	croissance lente, cellules fragiles.
fusion avec la protéine membranaire ompf	taille de la protéine est limitée ex : ompf- $\beta$ endorphine.
protéines hybrides	utilisation par exemple de la pénicillinase pour sécréter l'hGh (THOMSON, 1988) : 60 à 70 % de la protéine est extracellulaire.
xylanase ( THOMSON, 1988) et amylase (ALEXANDER et coll., 1989) de <i>Bacillus</i> sont sécrétées	il ne s'agit pas de fuite mais le mécanisme est inexpliqué.
gène E sous le contrôle du P <sub>L</sub> du phage $\lambda$	quand la température est augmentée de 30 à 42°C le répresseur cI du phage $\lambda$ est inactivé, les cellules sont lysées et la protéine est ainsi libérée dans le milieu (DABORA et coll., 1989)

Tableau A 5 : Moyens utilisés pour rendre une *E. coli* "sécrétrice"

La glycosylation peut être améliorée par la sécrétion mais de toute façon, elle demeure insuffisante pour certaines protéines qui exigent des transformations postraductionnelles qui ne peuvent pas être réalisées chez les procaryotes.

La production de protéines hétérologues chez *E. coli* comme chez d'autres hôtes, est souvent limitée par la formation d'inclusions cytoplasmiques. La protéine ne peut être ensuite obtenue qu'en utilisant des produits dénaturants qui sont coûteux, délicats à mettre en œuvre et qui vont compliquer l'étape de purification. De plus, la protéine après solubilisation est très diluée, il faut lui faire subir une étape de concentration, pouvant entraîner une précipitation de la protéine. SCHEIN (1989) récapitule les principales causes possibles qui seraient responsables de la formation de ces agrégats :

- (a) une concentration cytoplasmique localement très élevée,
- (b) du fait de la non compartimentation des cellules, les protéines sont produites dans un environnement réducteur qui perturbe la formation des chaînes disulfures déterminant la structure finale de la protéine,
- (c) un déficit en enzymes intervenant dans les transformations post-traductionnelles,
- (d) un déficit en foldases pendant la production,
- (e) une instabilité de la structure tertiaire des protéines natives.

Pour cet auteur la sécrétion serait la seule façon d'éviter la formation de ces agrégats.

Actuellement, deux tests existent pour mettre en évidence le caractère pyrogène des protéines (ANICETTI et coll., 1989) : le Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) et le USP sur le lapin. L'élimination de ces substances est très délicate à réaliser. De plus certaines protéines sont elles-mêmes pyrogènes et il est donc difficile de procéder à de tels tests.

Revenons à l'utilisation de protéines hybrides. C'est un sujet qui actuellement fait l'objet de nombreuses investigations dans la mesure où leur utilisation permet de pallier certains problèmes que nous venons d'énumérer :

- elles facilitent l'identification d'un microorganisme producteur (screening de souches) dans la mesure où des protéines facilement détectables sont utilisées (phosphatase alcaline,  $\beta$  galactosidase),
- elles permettent la sécrétion de certaines protéines (ex : liée à la pénicillinase, l'hGh est sécrétée, THOMSON, 1988),
- elles permettent de stabiliser des polypeptides,
- elles facilitent la purification (utilisation d'une protéine qui a une forte affinité avec un ligand).



Il faut faire attention à choisir correctement la liaison de façon à pouvoir facilement recouvrir la protéine souhaitée sans l'endommager.

Malgré ces différents inconvénients, *E. coli* reste encore actuellement, l'hôte le plus couramment utilisé pour produire des protéines hétérologues. Nous abordons maintenant le problème du choix du vecteur.

### 1.2.2. - Systèmes vecteurs

Parmi les systèmes vecteurs (Tab. A 6) disponibles, le plasmide qui peut être introduit chez de nombreux hôtes et qui est facilement manipulé est actuellement très largement utilisé.

<i>V e c t e u r s</i>	<i>C a r a c t é r i s t i q u e s</i>
- plasmide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ADN extrachromosomique présent chez les bactéries</li> <li>- molécule circulaire de petite taille</li> <li>- n'est pas vital pour la cellule (résistance ou survie dans certaines conditions)</li> <li>- répllication peut être relaxée : plasmide multicopie</li> <li>- gène inséré ne doit pas être trop gros sinon, des problèmes de transformation et de stabilité apparaissent</li> </ul>
- phage $\lambda$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pendant le cycle lysogène, l'ADN phagique s'intègre dans le chromosome bactérien</li> </ul>
- cosmide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- plasmide + phage (site correspondant à la formation des capsides phagiques)</li> <li>- il infecte les cellules comme un phage puis il se multiplie dans l'hôte comme un plasmide de grande taille</li> </ul>

Tableau A 6 : Les vecteurs

Les vecteurs les plus couramment utilisés sont le pBR322 et ses dérivés.

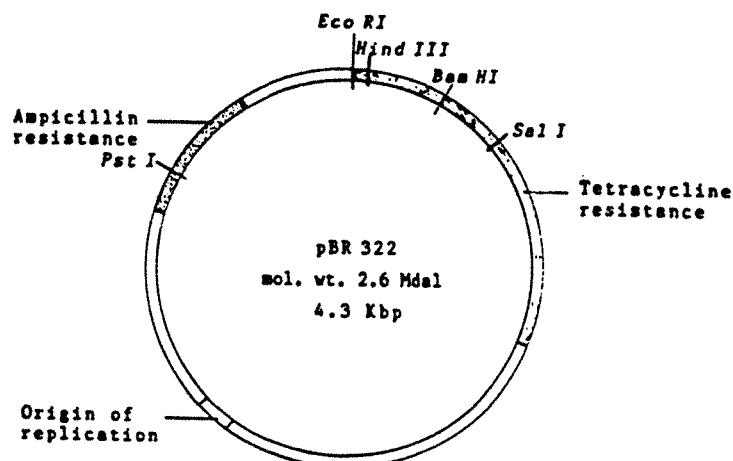
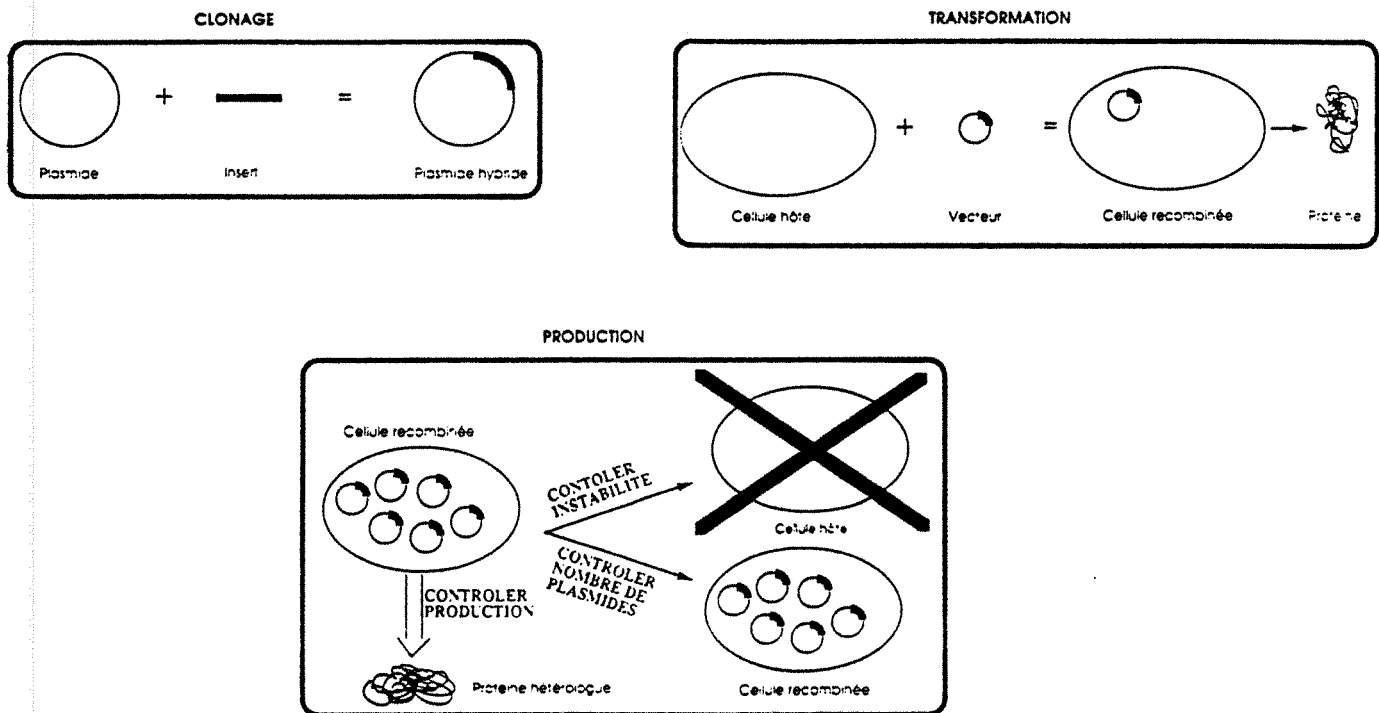


Figure A 4 : Plasmide pBR322 (WALKER et GINGOLD, 1988).



**Fig. A5** : Mise en œuvre d'un microorganisme recombiné



C'est un plasmide de petite taille (2,8 MD), multicopie (80 plasmides par cellule, GERDES 1988) contenant les gènes de résistance à la tétracycline et l'ampicilline (Fig. A 4). Une partie de ce plasmide provient du plasmide colE1 et cependant leur comportement est différent. La réplication du pBR322 n'est pas sous le contrôle direct du chromosome (WALKER et GINGOLD 1988). JONES et coll. (1980) et WOUTERS et coll. (1980) ont mis en évidence qu'en chemostat, en limitation de glucose ou de phosphate, les cellules sauvages n'apparaissent qu'après une diminution du nombre de copies de plasmides par cellule ( $N_p$ ). WOUTERS et coll. (1980) précisent que le taux de croissance et la température ont une influence sur l'apparition des cellules sauvages. En continu, lorsque le taux de dilution (D) est compris entre  $0,1 \text{ h}^{-1}$  et  $0,3 \text{ h}^{-1}$ , les cellules sauvages sont détectées respectivement après 13 et 83 générations. A un taux de dilution de  $0,5 \text{ h}^{-1}$ , il faut attendre 242 générations pour voir apparaître des cellules sans plasmide. Pour ces auteurs, les phénomènes de limitation en nutriments sont moins importants pour des taux de dilution élevés et donc, la compétition entre cellules recombinées et sauvages est moindre. Pour un taux de dilution de  $0,3 \text{ h}^{-1}$ , les cellules sauvages apparaissent immédiatement à  $42^\circ\text{C}$ , alors qu'à  $40^\circ\text{C}$  il faut attendre 10 générations, à  $37^\circ\text{C}$  83 générations et à  $30^\circ\text{C}$  134 générations (PRIMROSE et coll., 1984). La stabilité de ce plasmide est liée à la vitesse de croissance ainsi qu'à la température. Nous reviendrons plus loin sur le problème de la stabilité.

Après avoir choisi un hôte et un vecteur, nous pouvons construire un microorganisme recombiné et étudier son comportement.

### *1.2.3. Couples hôte-vecteur*

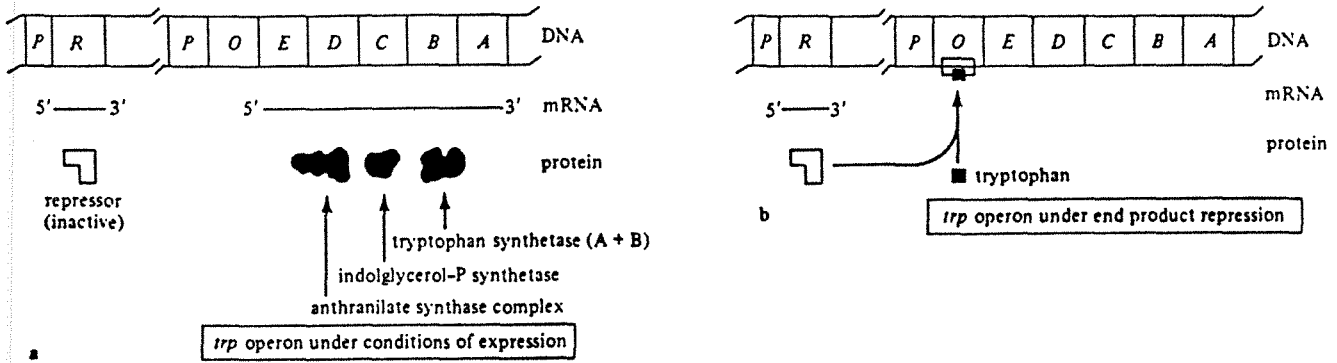
La construction d'un couple hôte-vecteur se fait en trois étapes (Fig. A 5) : le clonage du gène codant pour la protéine souhaitée, la transformation de la souche hôte par le vecteur d'expression et finalement la production de la protéine par le système hôte.

Ayant construit un couple hôte-vecteur, trois principaux facteurs vont être étudiés :

- la régulation de l'expression
- le contrôle du nombre de copies de plasmides par cellule ( $N_p$ )
- l'instabilité du plasmide.

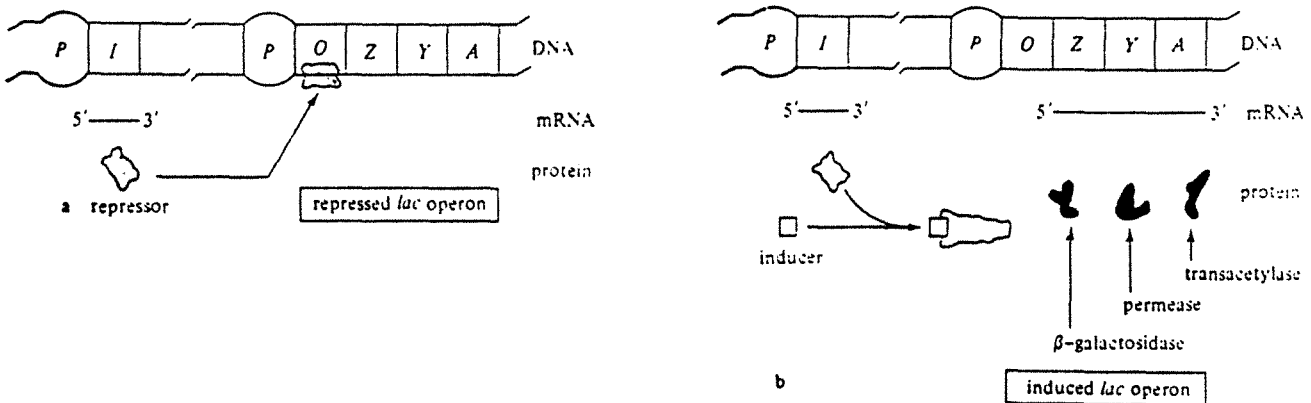
#### **1.2.3.1. - Modes d'expression**

Il existe deux types d'expressions constitutive et contrôlée dont les avantages et les inconvénients sont reportés dans le **tableau A7**.



**Figure A 6 :** Mécanisme d'inhibition de l'opéron tryptophane par le produit final (GOTTSCHALK, 1979).

a : si le tryptophane ne s'accumule pas, le répresseur est sous forme inactive et les protéines correspondant aux gènes de structure (A-B-C-D-E) sont synthétisées.  
 b : si le tryptophane est accumulé, le répresseur est sous forme active et la synthèse des protéines est réprimée.



**Figure A 7 :** Induction de la synthèse des enzymes du catabolisme du lactose (GOTTSCHALK, 1979).

a : Le produit du gène I est un répresseur qui se fixe sur la région O de l'opéron lactose, et empêche la traduction de cet opéron.  
 b : L'inducteur (l'allolactose) se lie au répresseur qui perd son affinité pour la région O , l'ARNm et ensuite les 3 protéines sont synthétisées.  
 P : promoteur, O : opérateur

EXPRESSION	AVANTAGES	INCONVENIENTS
CONSTITUTIVE	- simple à mettre en œuvre (pas d'ajout, pas de changement de T ...)	> interférence croissance/production > interférence production/stabilité
CONTROLEE	- dissocier croissance et production - diminuer l'instabilité	> problème de régulation du promoteur quand il y a beaucoup de plasmides > mise en œuvre plus délicate (surtout pour l'extrapolation)

Tableau A7 : Comparaison entre l'expression constitutive et contrôlée.

Les différents promoteurs inductibles sont :

- fonctionnement du promoteur tryptophane (trp) : en présence de tryptophane il y a répression de l'expression (Fig. A 6),
- fonctionnement du promoteur lactose (lac) : en absence de lactose il y a répression de l'expression (Fig. A 7).
- le promoteur tac qui est construit à partir des deux précédents est régulé par le lactose
- fonctionnement du promoteur  $P_R$  du bactériophage  $\lambda$  : lorsque la température atteint 42°C le répresseur thermosensible cI 857 est inactivé, le plasmide est alors répliqué et transcrit.

Cependant la régulation ne se fait pas toujours très bien. Par exemple CAULCOTT et coll. (1985) ont constaté qu'il y avait synthèse de Met-prochymosine par *E. coli* HB 101 en présence de tryptophane. Il y a 40 à 60 plasmides par cellule or le répresseur est synthétisé par le chromosome, de ce fait sa concentration est trop faible par rapport au nombre de gènes à réguler. Certains auteurs ont pu contourner ce problème en utilisant en même temps le promoteur  $P_R$  du phage  $\lambda$ . A 30°C, le nombre de copies de plasmides par cellule est faible, le contrôle par le tryptophane se fait correctement. Ensuite la température est augmentée, le nombre de copies de plasmides par cellule augmente fortement et de ce fait le contrôle n'a plus lieu : il y a synthèse de Met-prochymosine.

Actuellement, les recherches s'orientent davantage vers les systèmes inductibles. Cependant les protéines hétérologues commercialisées sont encore essentiellement produites à partir de promoteurs constitutifs.



### I.2.3.2. - Contrôle du nombre de copies de plasmides par cellule

Ce nombre de copies de plasmides par cellule recombinée dépend en premier lieu de l'origine génétique du plasmide (JONES et MELLING, 1984) mais aussi de la physiologie de la souche hôte ainsi que des conditions de cultures (ENDSLEY, 1986).

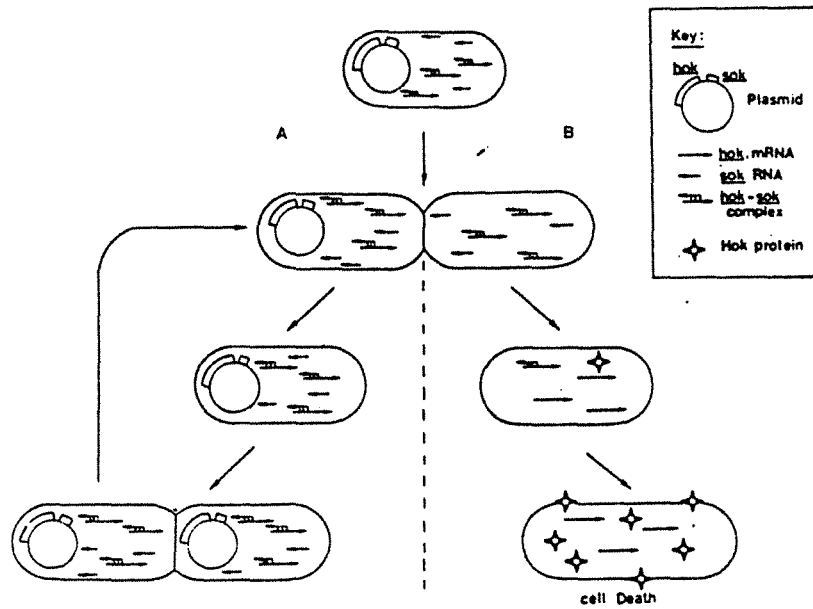
STUEBER et BUJARD (1982) montrent que la production de la protéine désirée est d'autant plus forte que le nombre de copies de plasmides par cellule est élevé. DENNIS et coll. (1985) et SAYADI et coll. (1989) s'opposent à cette théorie car d'après leurs résultats, plus le nombre de copies de plasmides par cellule est élevé plus l'efficacité de l'expression du gène est faible. Ceci serait dû à une compétition d'expression et de réplication entre le plasmide et le chromosome. PERETTI et BAILEY (1987) abondent dans ce sens, en montrant qu'une augmentation du nombre de copies de plasmides par cellule entraîne une diminution du taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ). Si ce nombre de copies de plasmides est trop élevé la cellule ne supporte pas le fardeau métabolique trop important qui en découle et meurt. ENGBERG et NORDSTROM (1975), SAYADI et coll. (1989) et SEO et BAILEY (1985) ont montré que le nombre de copies de plasmides diminuait avec une augmentation du taux de croissance alors que SIEGEL et RYU (1985) n'ont relevé aucune influence. KOIZUMI et coll. (1985) travaillent avec *B. stearothermophilus* transformé par un plasmide runaway (la réplication est induite par une augmentation à 42°C de la température de culture). Dans ces conditions, ils ont montré qu'à 50°C le contenu plasmidique était deux fois plus élevé qu'à 44°C et qu'à cette température le taux de croissance n'avait pas d'influence sur le nombre de copies de plasmides. Alors qu'à 50°C et à 47,5°C le nombre de copies de plasmides augmentait avec le taux de croissance.

Le contrôle du nombre de copies de plasmides est complexe dans la mesure où il dépend de nombreux paramètres. Ce contrôle est cependant important car il permet d'optimiser la production. Le nombre de copies de plasmides a une influence sur la compétitivité de la souche recombinée par rapport à la souche sauvage et sur la stabilité du contenu plasmidique. La stabilité du contenu plasmidique est étudiée dans la partie suivante.

### I.2.3.3. - Instabilité du vecteur

Ce facteur prend une grande importance lors de l'extrapolation d'un procédé de fermentation. Nous distinguons deux types d'instabilités :

- l'instabilité de structure (insertion, délétion du gène cloné) ; c'est donc un changement de structure du plasmide.
- l'instabilité de répartition (répartition des plasmides entre les cellules), c'est la perte



**Figure A 8 :** Modèle moléculaire décrivant l'action du gène *parB* dans la répartition du contenu plasmidique au cours de la division cellulaire (GERDES, 1988).

complète du plasmide due à une mauvaise répartition des plasmides dans les cellules filles au cours de la division cellulaire.

Nous nous attarderons sur le deuxième type d'instabilité car c'est la plus importante ; elle aboutit à l'apparition de cellules sauvages qui, libérées de leur fardeau, vont prendre le dessus par rapport aux cellules recombinées.

L'instabilité de répartition est liée à la génétique de l'hôte, aux conditions de croissance (JONES et MELLING, 1984) et aux conséquences de l'expression du gène cloné (IMANAKA et AIBA, 1981 ; LEE et coll., 1985 ; KADAM et coll., 1987 ; CAUNT et coll. 1988).

REINIKAIENEN et coll. (1989) expliquent que pour optimiser un procédé utilisant un microorganisme recombiné il faut avoir une bonne stabilité et un nombre de copies de plasmides élevé. Dans certains cas il en existe un nombre optimal car s'il est trop élevé l'instabilité augmente (AIBA et coll., 1982 ; IMMANAKA et AIBA, 1981). De ce fait les paramètres précédemment cités qui entraînent une modification du nombre de copies de plasmides auront indirectement une influence sur la stabilité.

Voyons maintenant quels sont les moyens utilisés afin de remédier au problème d'instabilité. Nous pouvons les classer en 3 catégories : les méthodes génétiques, sélectives et non sélectives.

#### ☞ Les méthodes génétiques

Il en existe trois principales :

##### > le locus *par* :

En 1980 MEACKOK et COHEN montrent qu'un fragment d'ADN (locus *par*) permet de régulariser la répartition des plasmides entre les cellules filles. En fait LEE et EDLIN (1985) ainsi que GERDES (1988) montrent qu'il n'en est rien ; le gène *par* mettrait en oeuvre un système comprenant deux protéines (hok-sok) qui entraînerait la mort des cellules ayant perdu le plasmide (Fig. A 8).

##### > les mutants auxotrophes :

Le plasmide permet de corriger l'auxotrophie. Ainsi les cellules recombinées sont capables de croître (MARQUET et coll., 1986). Cependant les cellules sauvages poussent parfois grâce aux cellules recombinées qui ne sont plus auxotrophes. L'utilisation de doubles mutants permet de contourner ce problème mais il faut alors utiliser des milieux définis souvent onéreux.





➤ sélection de mutants plus stables :

HELLING et coll. (1981) et ENDSLEY (1986) ont isolé des mutants plus stables.

#### ◇ Méthodes sélectives

➤ pression par addition d'un antibiotique :

Cette méthode a été très souvent étudiée et utilisée (NUDEL et coll., 1987). Cette technique est coûteuse (HOPKINS, 1987). En effet, lorsque l'antibiotique est dégradé, comme l'ampicilline, il faut l'ajouter au milieu pendant toute la durée de la fermentation. De plus les antibiotiques gênent la purification (NUDEL et coll., 1987) dans la mesure où ils sont difficiles à éliminer.

➤ production de toxine :

Les cellules recombinées produisent une toxine qui agit seulement sur les cellules ayant perdu le vecteur. LAUFFENBURGER (1987) montre qu'un tel système est utilisable.

#### ◇ Méthodes non sélectives

➤ CAULCOTT et RODES (1986) dissocient la phase de croissance de la phase de production en utilisant un système inductible. SIEGEL et RYU (1985) utilisent le même principe appliqué à un réacteur biétagé. Dans un premier étage les cellules se multiplient et dans le deuxième étage elles synthétisent la protéine. En effet durant la phase de croissance, le nombre de copies de plasmides par cellule est faible, la synthèse de la protéine est quasiment nulle. De ce fait, le taux de croissance des cellules recombinées est voisin de celui des cellules sauvages. Suit alors la phase de production où l'objectif est d'augmenter le contenu plasmidique et le taux de synthèse. A ce stade, le maintien d'un fort taux de croissance et de la stabilité du vecteur n'est plus recherché.

➤ NARSI et coll. (1987) retardent l'apparition des levures non recombinées en culture continue en faisant varier le taux de dilution. Ils montrent que ces variations permettraient de diminuer l'instabilité et la différence entre les taux de croissance des deux populations.

#### I.2.3.4. - Relations entre la cellule hôte et son vecteur

Le plasmide dans une cellule, utilise les mêmes systèmes enzymatiques et les mêmes mécanismes pour sa réplication et l'expression de ses gènes. De ce fait, il représente un fardeau pour la cellule. Les interactions cellules plasmides ont surtout été étudiées à partir de modèles mathématiques structurés construits pour *E. coli*.

SOUCHE + PLASMIDE	Np	M I L I E U X					
		M 9		L B		M9 C	
		$\mu_{max}$	%	$\mu_{max}$	%	$\mu_{max}$	%
<i>souche</i> HB 101	0	0,41	-	1,38	-	0,79	-
<i>plasmides</i> pDM247	12	0,38	7	1,27	8	0,77	3
pDM246	24	0,36	12	1,25	9	0,74	6
RSF1050	60	0,36	12	1,20	13	0,69	12
pDM248	120	0,32	22	1,13	18	0,66	16
pFH 118	408	0,28	32	1,06	23	0,65	18

**Tableau A 8 :** Influence du nombre de copies de plasmides et du milieu de culture sur le taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ) d'une souche de *E. coli* recombinée (SEO et BAILEY 1985).

% : pourcentage de diminution du  $\mu_{max}$  par rapport à la souche mère HB101

Taille du plasmide (Kb)	2,7	4,4	5,3	8,7
Taux de croissance maximum (h-1)	0,57	0,58	0,51	0,48
Rendement (g de biomasse/g de glucose)	0,518	0,435	0,412	0,450

**Tableau A 9 :** Influence de la taille du plasmide sur le taux de croissance maximum et le rendement de conversion du glucose en biomasse pour une souche de *E. coli* recombinée (RYAN et coll. 1989).

MILIEUX	taux de croissance maximum (h-1)	
	cellules recombinées	cellules sauvages
M 9	1,05	1,13
glucose limitant	0,93	1,05
Phosphate limitant	0,94	1,05
ammonium limitant	0,64	0,74
magnésium limitant	0,75	0,91

**Tableau A 10 :** Influence du nombre de copies de plasmides et du milieu de culture sur le rendement de conversion du glucose en biomasse pour une souche de *E. coli* recombinée (SEO et BAILEY 1985) (souche mère HB101).

La présence d'un plasmide se traduit par une diminution des taux de croissance maximum de la souche recombinée. RYAN et coll. (1989) et SEO et BAILEY (1985) ont mis en évidence que l'augmentation du contenu plasmidique ou de la taille du plasmide, entraînait une diminution du taux de croissance maximum de la cellule recombinée par rapport à la souche sauvage (Tab. A 8 et A 9). SAYADI et coll. (1989) et SEO et BAILEY (1985) ont montré que la diminution du taux de croissance maximum dans les cellules recombinées dépendait aussi des conditions de culture (Tab. A 10 et A 8). Ainsi, par exemple, en limitation de magnésium la présence du plasmide entraîne une diminution de 18 % du taux de croissance maximum alors qu'en limitation de glucose, elle n'est que de 7 %.

La présence du plasmide entraîne aussi des modifications de l'assimilation des substrats. MASON et BAILEY (1989) constatent que la répartition du glucose entre la glycolyse et la voie de pentoses phosphates est modifiée en faveur de cette dernière par la présence du plasmide. En effet, la cellule recombinée a une demande plus importante en intermédiaires et précurseurs (pentoses phosphates, NADPH, ...). Ces auteurs constatent que l'activité métabolique de ces deux voies est globalement plus faible chez une cellule recombinée, et attribuent ce phénomène à une diminution du transport du glucose dans la cellule. SEO et BAILEY (1985) avaient déjà formulé une telle hypothèse. Ces auteurs ont utilisé l' $\alpha$ -méthylglucoside qui est un inhibiteur de la croissance : celui-ci, comme le glucose, pénètre dans la cellule mais il n'est pas métabolisé. Ces auteurs montrent que les constantes d'inhibition de l' $\alpha$ -méthylglucoside et d'affinité du glucose augmentent avec le contenu plasmidique. L' $\alpha$ -méthylglucoside est moins inhibiteur ce qui signifie que l'augmentation du contenu plasmidique entraîne une diminution du transport de l' $\alpha$ -méthylglucoside et donc du glucose.

La présence du plasmide entraîne des dépenses énergétiques supplémentaires pour la cellule. DA SILVA et BAILEY (1986) ont montré que le rendement en ATP (cellules/mole d'ATP) des cellules recombinées est environ 1,7 fois plus élevé que celui des cellules sauvages. De même, les rendements en glucose et en oxygène sont eux aussi plus faibles pour les cellules recombinées. SEO et BAILEY (1985) ont montré qu'une augmentation du nombre de plasmides par cellule (Tab. A 11) ou de la taille du plasmide entraînait une diminution du rendement de conversion du glucose en biomasse.



	Np	Y <sub>X/GLC</sub>
HB101	0	0,35
pDM247	12	0,32
pDM246	24	0,31
RSF1050	60	0,30
PDM248	120	0,28
PFH118	408	0,25

**Tableau A 11** : Influence du contenu plasmidique sur le rendement de conversion du glucose en biomasse (Y<sub>X/GLC</sub>) (SEO et BAILEY, 1985).

DA SILVA et BAILEY (1986) ont mis en évidence que la synthèse d'une protéine hétérologue entraînait une plus grande augmentation des rendements que ne le fait la réplication du plasmide. PERETTI et BAILEY (1987) abondent dans cette direction ; ils constatent qu'une cellule recombinée synthétise l'ADN chromosomique plus vite qu'une cellule sauvage et que la compétition entre la réplication des deux types d'ADN n'est donc pas un élément important. Ils modélisent le comportement d'une bactérie recombinée de façon à déterminer quelle est l'étape limitante. Les sites promoteurs du plasmide sont traités comme des sites supplémentaires ayant une affinité particulière pour l'ARN polymérase. Par simulation, ils montrent que lorsque le nombre de copies de plasmides par cellule augmente, il y a dans un premier temps un manque de disponibilité des ribosomes puis dans un deuxième temps la concentration en ARN polymérase devient limitante.

PERETTI et coll. (1989) montrent expérimentalement qu'une augmentation du contenu plasmidique entraînerait une augmentation de l'efficacité spécifique de la traduction du gène. L'ARN polymérase ne serait donc pas l'étape limitante, une dégradation accrue des protéines serait selon ces auteurs responsable de ce phénomène.

A partir de ces études, nous pouvons conclure qu'il est important d'optimiser le nombre de copies de plasmides, l'efficacité de la transcription ainsi que les conditions de culture.

### I.3. - Conclusion

Durant les années 1983 à 1990 beaucoup de chercheurs se sont consacrés à l'étude de différents systèmes hôte/vecteur mais ils n'ont pas réussi à établir des règles générales qui pourraient guider le choix d'un système de production. DE FERNANDEZ et DHURJATI (1988) illustrent très bien cet état des choses. Ils étudient le comportement de bactéries recombinées construites en faisant des combinaisons entre deux hôtes différents (*Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*) et des plasmides dont le nombre de copies est variable. Ces couples hôte/vecteur ont une

HOTES	METABOLITES	COMMENTAIRES	REFERENCES
<i>E. coli</i>	ompA + hGH	hGH active dans le périplasme	HSIUNG et coll. (1986)
<i>E. coli</i>	pre-S(2) + alcaline phosphatase	antigène du virus de l'hépatite B	TACHIBANA et coll. (1986)
<i>E. coli</i>	insuline-like growth factor II	IGF-II a une activité qui ressemble à l'insuline	FURMAN et coll. (1987)
<i>E. coli</i>	proinsuline	cellules immobilisées (facilite la purification)	BIRBAUM et coll. (1988)
<i>E. coli</i>	peptides de la toxine de la diphtérie	comprendre mécanisme d'entrée et de toxicité chez les cellules eucaryotes (contre cancer)	GREENFIELD et coll. (1986)
<i>E. coli</i>	vaccin contre la bilharziose	essais positifs sur le rat	LECOCQ (1987)
<i>E. coli</i>	L-thréonine	alimentation pour les animaux	NUDEL et coll. (1987) BERTIER et BAYLE (1989)
<i>E. coli</i>	N-acetylneuraminate lyase	détermination de maladies inflammatoires	AISAKA et coll. (1987)
<i>E. coli</i>	hormone de croissance du thon	pour stimuler la croissance chez les poissons	SATO et coll. (1989)
<i>E. coli</i>	proteine A-Bactamase	cristalliser la $\beta$ lactamase	BANEYX et GEORGIU (1989)
<i>E. coli</i>	facteur d'inhibition de la leucémie (LIF)+glutathion S-transférase	contre la prolifération des cellules leucémiques le glutathion facilite la purification	GEARING et coll. (1989)
<i>E. coli</i>	récepteurs adrénergiques $\beta 1$ & $\beta 2$	pour tester des nouvelles drogues	MARULLO et coll. (1989)
<i>E. coli</i>	antigène de la malaria (RN1 et RT2)	vaccin contre la malaria	OKITA et coll. (1989)
bactéries lactiques	enzymes de la dégradation du lactose	mieux contrôler les procédés des productions laitières	VENEMA et KOK (1987)
<i>S. lividans</i>	inhibiteur de l'alpha amylase + la proinsuline (de singe)	<i>S. cerevisiae</i> et <i>E. coli</i> ne conviennent pas la sélection est facilitée	KOLLER et coll. (1989)
<i>S. lividans</i>	inhibiteur de la subtilisine + phéromone	mettre au point un vecteur de sécrétion chez les Streptomyces	TAGUCHI et coll. (1989)
<i>R. meliloti</i>	gène nif	amélioration de la fixation de l'azote	DAVIES (1988)
cellules d'insectes	human macrophage stimulating factor (M-CSF)	milieu moins coûteux que pour les cellules animales	MAIORELLA et coll. (1988)
cellules CHO	facteur VIII	contre l'hémophilie	MEULIEN et coll. (1988)

Tableau A 12 : Métabolites hétérologues actuellement étudiées

construction très voisine. Dans ces conditions, les auteurs ne parviennent pas à expliquer les comportements très différents de ces couples hôte/vecteur.

En fait le choix du vecteur et de l'hôte se fera en fonction de la protéine à synthétiser. Si elle est codée par un très grand gène, le phage  $\lambda$  sera de préférence choisi comme vecteur. Jusqu'à présent le choix des hôtes était restreint à *E. coli*, *S. cerevisiae* et *Bacillus*. Actuellement, si la protéine demande de nombreuses transformations post-traductionnelles, l'expression ne peut se faire chez un procaryote. Les hôtes utilisés seront les cellules animales, les cellules d'insectes ou les champignons.

D'autre part, certains procédés sont actuellement testés afin de les appliquer à la culture de microorganismes recombinés : cultures biétagées (SIEGEL et RYU, 1985), contrôle de l'alimentation afin de maintenir la culture dans des conditions compatibles avec une bonne production. LIN et coll. (1989) contrôlent l'alimentation d'une culture de *S. cerevisiae* de façon à maintenir une concentration en glucose de 0,15 g/l. En imposant un faible taux de croissance, la souche ne produit pas d'éthanol. Ainsi, ils parviennent à maximiser l'expression de l' $\alpha$ -amylase de souris par cette souche de *S. cerevisiae*. IJIMA et coll. (1987) utilisent la filtration pour diminuer la concentration en tryptophane dans le milieu de culture induisant ainsi la production de  $\beta$ -galactosidase. De cette façon ils obtiennent une forte concentration cellulaire (66 g/l) et une bonne production. D'autre part, l'utilisation de protéines hybrides est de plus en plus étudiée.

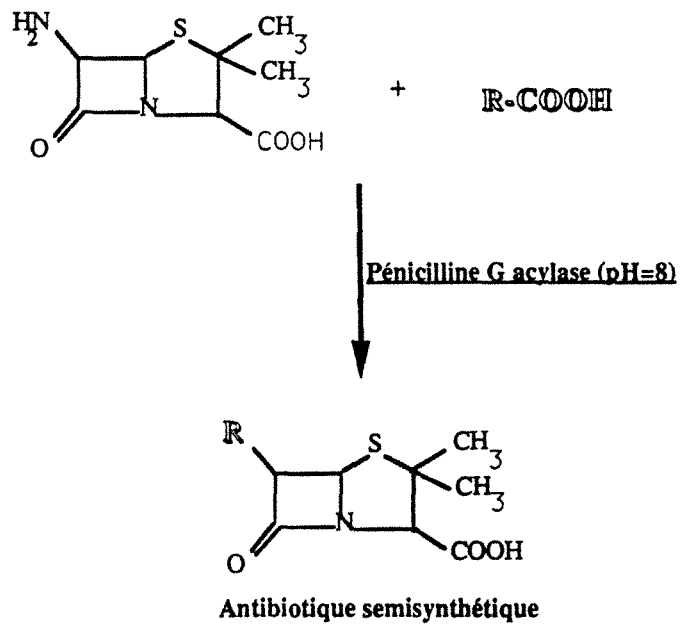
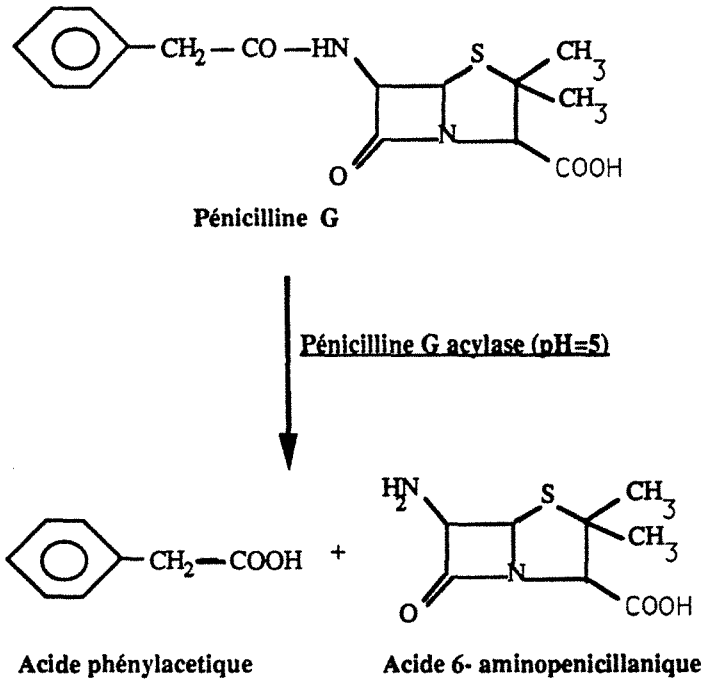
Les recherches continuent et de nombreux systèmes hôte/vecteur sont étudiés afin de produire des protéines très diverses. Le tableau A 12 donne une liste non exhaustive des protéines hétérologues qui font actuellement l'objet de recherche.

## II - Présentation et production de la pénicilline acylase

### II.1. - Présentation de la pénicilline acylase

#### II.1.1. - *Microorganismes producteurs*

C'est dans *Penicillium chrysogenum* que SAKAGUCHI et MURAO (1950) ont mis en évidence pour la première fois en 1950 la pénicilline acylase (PA). Parallèlement, l'activité de cette enzyme a été mise en évidence par différentes équipes de recherche, chez de nombreuses autres bactéries (ROBINSON et coll., 1960, CLARIDGE et coll., 1960, HUANG et coll., 1960 et KAUFMAN et BAUER, 1960).



**Figure A 9 : Mode d'action de la pénicilline acylase sur la pénicilline G**



La production de PA est très répandue chez les bactéries gram négatif et notamment chez les entérobactéries. Parmi ces microorganismes, nous distinguons certaines souches de : *Escherichia coli*, *Proteus rettgeri*, *Alcaligenes faecalis*, *Erwina aroides* et des espèces de *Pseudomonas*. Certains organismes gram positif comme certains *Micrococcus* et *Bacillus megaterium*, produisent cette enzyme. Chez ce dernier (CHIANG et BENNET, 1967) comme chez *Streptomyces lavendulae* (BATCHELOR et coll., 1961) l'enzyme est extracellulaire. D'autre part, de nombreux champignons ont la capacité de libérer de l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) à partir de différentes pénicillines : *Apergillus*, *Trichophyton*, *Cephalosporium*, *Emericellopsis*, *Fusarium* et *Botrytis*.

### II.1.2. - Activité enzymatique

En général, les acylases fongiques (pénicilline V acylase) hydrolysent plus vite la phenoxy méthylpénicilline (pénicilline V) que la benzylpénicilline (pénicilline G). La pénicilline acylase d'*E. coli* hydrolyse plus vite la pénicilline G (COLE, 1969 a). Elle est utilisée pour synthétiser de nombreux dérivés du 6-APA (COLE, 1969 b) ou bien pour hydrolyser la pénicilline G (Fig. A 9).

L'enzyme a été cristallisée pour la première fois en 1974 par KUTZBACH et RAUENBUSCH (1974). BOCK et coll. (1983) ont montré que l'enzyme est constituée de deux sous-unités dont les poids moléculaires sont respectivement 20 500 et 69 000 daltons. La petite sous-unité aurait un rôle dans la reconnaissance de la chaîne latérale fixée au 6-APA et donc interviendrait dans la fixation du substrat. La grande sous-unité aurait un rôle catalytique. En effet, l'enzyme se fixe sur le substrat  $\beta$ -lactame et forme un complexe michaelien non covalent ; une association plus étroite aboutit à une réaction d'hydrolyse avec la formation d'un acylenzyme au niveau du site actif faisant intervenir l'hydroxyl d'une sérine essentielle appartenant à la grande sous-unité (DAUMY et coll., 1985).

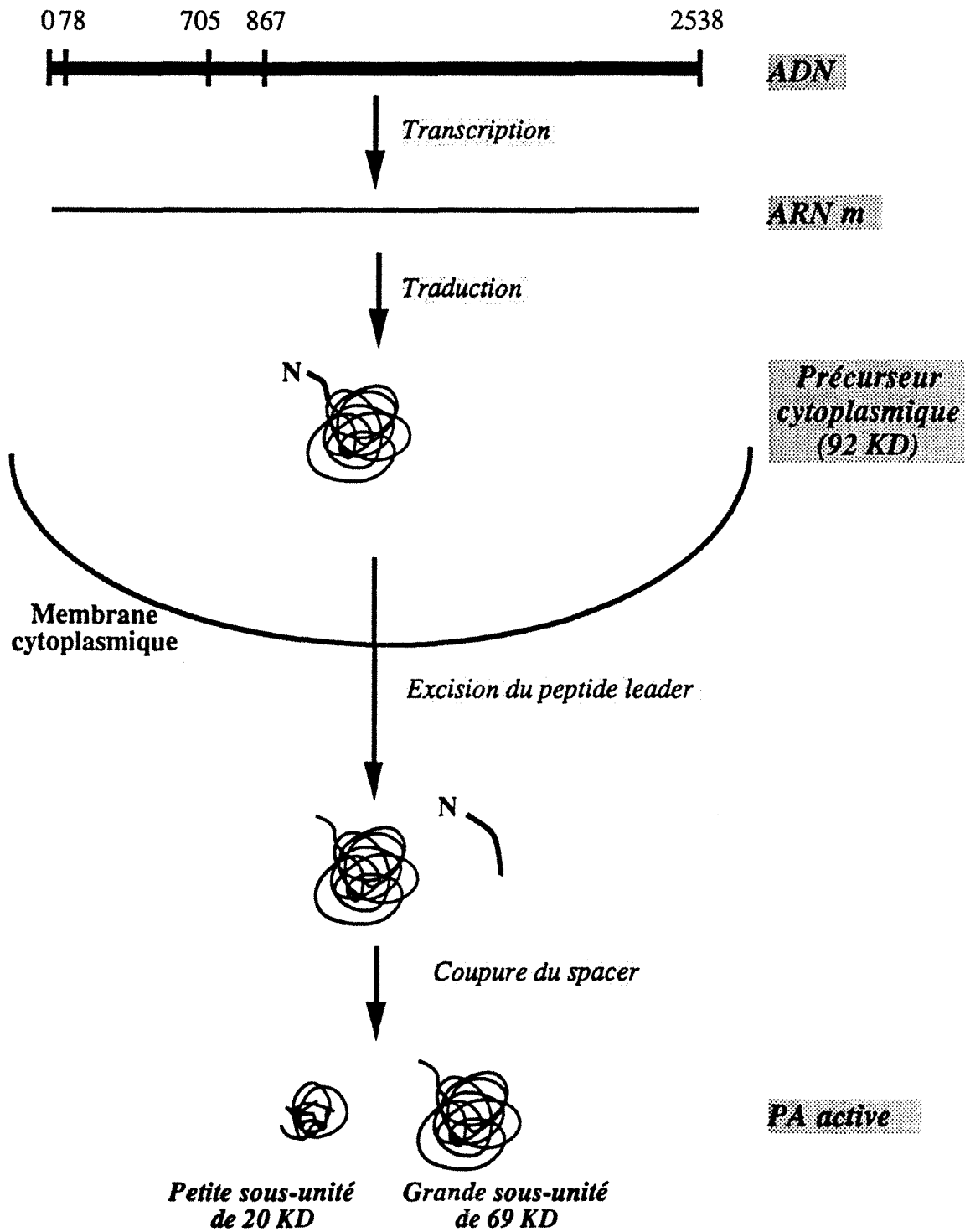


Le 6-APA inhibe la réaction en diminuant la vitesse maximale d'hydrolyse. C'est un inhibiteur non compétitif dont la constante d'inhibition est de 71 mM.

### II.1.3. - Synthèse de la pénicilline acylase

#### II.1.3.1. - Pénicilline acylase : le gène

BRUNS et coll. (1985) ont montré à partir d'expériences de délétion, que le gène



**Figure A 10** : Synthèse de la pénicilline acylase chez *E. coli*

comprend 2538 paires de bases et code pour une protéine de 846 acides aminés (92 kD) qui serait un précurseur cytoplasmique inactif de la PA. Lors de son transport vers le périclasme, il subit une étape de maturation qui consiste en une libération d'un peptide signal (26 acides aminés chez *E. coli*) et une protéolyse du peptide interne (spacer), libérant ainsi les deux sous-unités (Fig. A 10). Le peptide leader est riche en acides aminés basiques et hydrophobes.

### II.1.3.2. - Régulation de la synthèse de la pénicilline acylase

La synthèse de la pénicilline acylase étant principalement régulée par l'acide phénylacétique, le glucose, l'oxygène et la température, l'influence de chacun de ces paramètres est exposée dans le paragraphe suivant. De plus, l'addition de pénicilline G ou V n'a pas d'influence sur la production de PA alors que l'acide 6-aminopénicillanique (produit issu de l'hydrolyse de la pénicilline) réprime la synthèse de cette enzyme (SCHEWALE et SIVARAMAN 1989).

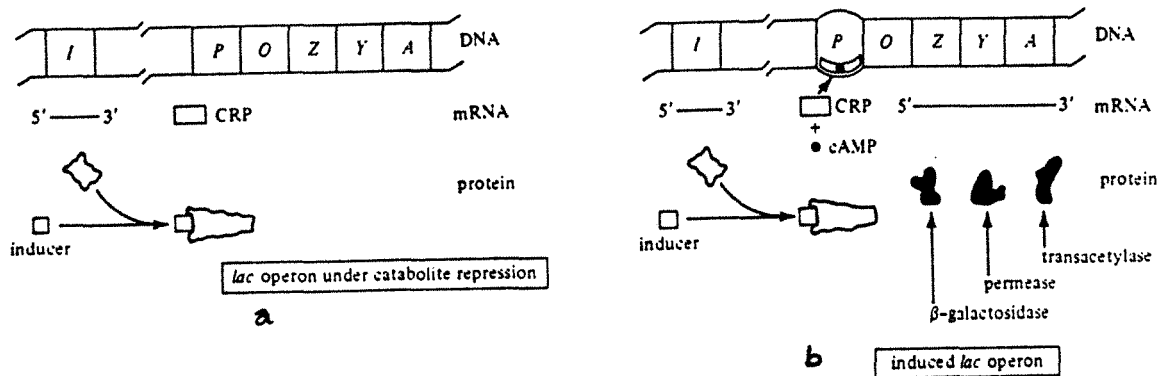
#### > L'acide phénylacétique (APA)

L'APA et ses sels induisent la production de la PA dans *E. coli* et aussi dans les autres bactéries sauf *Pseudomonas cruciviae*, *Bacterium faecalis alcaligenes* et *Proteus rettgeri* qui produisent l'enzyme constitutivement (KAUFMAN et BAUER, 1960). A partir du gène muté de *B. megaterium* exprimé chez *E. coli*, MEEVOOTISOM et SAUNDERS (1987) ont obtenu des souches qui ne sont plus induites par l'APA.

L'incorporation de 0,1 à 0,2 % d'APA a permis de multiplier par un facteur 8 à 10 la production de PA (KAUFMAN et BAUER, 1960). Mais à forte concentration il y a répression de l'enzyme (VOJTISEK et SLEZAK, 1975 b). L'induction de l'enzyme apparaît environ 30 minutes après l'addition d'APA. CHIANG et coll. (1967) recommandent d'ajouter l'APA après 4 à 6 h de croissance pour *E. coli* alors que WOJSKOWICZ (1981) prétend que plus l'APA est ajouté tôt meilleure est l'induction. GEBAUER et coll. (1987) obtiennent les meilleurs résultats en maintenant la concentration d'APA à 0.8 g/l. VOJTISEK et SLEZAK (1975 a et c) obtiennent un taux de synthèse plus élevé quand *E. coli* pousse sur APA comme seule source de carbone et d'énergie et d'autre part, ils ont montré que les dérivés de l'APA ont des pouvoirs inducteurs plus faibles.

#### > Le glucose

La synthèse de PA est soumise à la répression catabolique par le glucose, le fructose, le lactose, le maltose, le glycérol et partiellement par l'acétate (VOJTISEK et SLEZAK, 1975 a et c, GANG et SHAIKH, 1976). D'après GOLUB et BEL'KIND (1977), le glucose réprimerait la synthèse des composants actifs dans le transport de l'APA ce qui, perturbant la consommation de cet acide,



**Figure A 11 :** Exemple de répression catabolique : la synthèse des enzymes du catabolisme du lactose pour *E. coli* (GOTTSCHALK, 1979).  
 a : sans AMP cyclique (cAMP), lorsque le glucose est utilisé, la protéine CRP (récepteur du cAMP) n'est pas liée au promoteur, il n'y a pas d'ARN messager (mRNA).  
 b : le complexe CRP-cAMP se lie au promoteur (P), les gènes de structure Z, Y et A sont transcrits et les enzymes correspondantes sont synthétisées.

modifie la production de PA. La répression par le glucose de *E. coli* et *Kluyvera citrophila* est levée par l'ajout d'AMP<sub>C</sub> (adénosine monophosphate cyclique). GANG et SHAIKH (1976) suggèrent eux que la répression par le glucose serait due à une diminution de la concentration intracellulaire en AMP<sub>C</sub> (Fig. A 11). Cette dernière explication paraît plus vraisemblable que la précédente. En effet, jusqu'à ce jour, nous ne connaissons pas le mécanisme d'induction par l'APA, c'est à dire que nous ne savons pas si l'APA pénètre dans la cellule et va lui même induire la synthèse de PA. De plus, l'ajout d'AMP<sub>C</sub> permet d'obtenir une production d'enzyme comparable à celle obtenue sans inhibition et s'il n'y a pas d'APA, l'AMP<sub>C</sub> n'a pas d'influence sur la production. GANG et SHAIKH (1976) précisent que l'AMP<sub>C</sub> ne permet pas de stimuler la maturation de l'enzyme et pensent que l'AMP<sub>C</sub> participerait à la régulation au niveau de la transcription de la PA.

#### > L'oxygène

En général, une faible aération favorise la production de PA. Mais suivant les souches, les conditions optimales d'aération varient. Par exemple pour *E. coli*, COLE (1969 a), KAUFMAN et BAUER (1960) et KLEIN et WAGNER (1980) recommandent respectivement l'utilisation des taux d'aération très différents de 0,4 , 0,9 et 1 vvm (volume/volume/min.). VOJTISEK et SLEZAK (1975 b) démontrent qu'une forte concentration en oxygène inhibe complètement la synthèse de PA. GEBAUER et coll. (1987) montrent que pour leur souche d'*E. coli*, l'optimum de production est atteint pour une concentration en oxygène dissous de 10 % et qu'à 50 % il n'y a quasiment plus de synthèse.

Nous constatons que l'aération est un paramètre important à optimiser pour avoir une bonne synthèse de la PA. Cependant, les conditions optimales d'aération citées dans la littérature sont très variables.

#### > La température

La température optimale de croissance pour une *E. coli* est de 37°C, mais dans ces conditions il n'y a pas de production d'enzyme. Pour *Pseudomonas melanogenum* et *Kluyvera citrophila* la température optimum de production est 30°C, pour *Proteus rettgeri* elle est de 20°C. OH et coll. (1987), ont mis en évidence une accumulation du précurseur dans une souche de *E. coli* cultivée à 42°C. D'après ces auteurs la maturation est une étape sensible à la température. Pour SHENGLI et coll. (1989), l'étape thermosensible serait la transcription du gène. L'effet de la température sur la synthèse de la PA n'est donc pas clairement défini. La température est un paramètre qui a une grande influence sur la synthèse de PA. La température généralement préconisée pour les cultures de *E. coli* se situe entre 24°C et 26°C .

Après avoir étudié les facteurs importants qui interviennent dans la production de PA, nous allons maintenant aborder le chapitre de la production de PA.

## II.2. - Production de pénicilline acylase

Nous allons nous intéresser à la production de PA successivement par *E. coli* et par *E. coli* recombinée.

### II.2.1. - Production de pénicilline acylase par *E. coli*

Le 6-APA est un intermédiaire clef dans la production des antibiotiques synthétiques dont les principaux avantages sont :

- une grande solubilité,
- des nouveaux spectres d'action plus spécifiques.

Au début, cette synthèse se faisait chimiquement mais rapidement la synthèse enzymatique (enzyme immobilisée, BIHARI et BUCHHOLZ, 1983) s'est révélée être plus intéressante. Cette enzyme a très rapidement été commercialisée, 20 ans après sa découverte.

HARRISON et GIBSON (1984) ont fait une étude économique de la production de 6-APA. Ils ont entre autres montré que la PA représente 6,7 % du coût global de production du 6-APA et 30 % du coût des produits utilisés pour la transformation de la pénicilline G en 6-APA (Tab. A 13).

	Annual Cost	Product Cost (US \$ kg <sup>-1</sup> 6-APA)		Annual Cost	Product Cost (US \$ kg <sup>-1</sup> 6-APA)	
<b>I. Variable Costs</b>			<b>II. Fixed Costs</b>			
<b>A. Raw Materials</b>			<b>A. Labour</b>			
<b>1. FERMENTATION MEDIA</b>			<b>1. OPERATING LABOUR</b>			
Molasses	1 474 000	5.36		1 727 000	6.28	
Cornsteep liquor	27 500	0.10		404 250	1.47	
Potassium phenyl acetate	957 750	3.41		<b>3. OVERHEAD AND SUPERVISION</b>		
Potassium monohydrogen phosphate	195 250	0.71		1 067 000	3.88	
Potassium dehydrogen phosphate	233 750	0.85		<b>B. Maintenance Supplies</b>	753 500	2.74
Other media components	9 625	0.04		<b>C. Taxes and Insurance</b>	503 250	1.83
<b>2. PEN G RECOVERY AND CONVERSION TO 6-APA</b>				<b>D. Depreciation</b>	1 677 500	6.10
Potassium acetate	1 509 750	5.40		<b>Total Fixed Cost</b>	<b>6 132 500</b>	<b>22.30</b>
MIBK	332 750	1.21		<b>Total Operating Cost</b>	<b>14 455 375</b>	<b>52.57</b>
Penicillin acylase	973 500	3.54				
Filter aid	324 500	1.18				
Other raw materials	63 250	0.23				
<b>B. Utilities</b>						
<b>1. STEAM</b>	924 000	3.36				
<b>2. ELECTRICITY</b>	1 215 500	4.42				
<b>3. COOLING WATER</b>	101 750	0.37				
<b>Total Variable Cost</b>	<b>8 322 875</b>	<b>30.27</b>				

**Tableau A 13 : Coûts estimés (exprimés en dollar 1983) des différentes opérations du procédé de production de l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) (HARRISON et GIBSON, 1984).**

Cette étude met en évidence que le coût d'utilisation de la PA est important et que par conséquent l'optimisation du procédé de production du 6-APA doit se faire entre autres par une optimisation de la production de cette enzyme.

Nous avons rassemblé dans le **tableau A 14** les différentes industries qui s'intéressent à la production de cette enzyme. Cet intérêt pour la PA a toujours été et restera important en effet, la production de 6-APA augmente annuellement :

en 1985 - 4200 tonnes

en 1990 - 5200 tonnes

en 2000 - 7000 tonnes

Company	Enzyme source	Support
American Home Co.	<i>B. megaterium</i>	Intermolecular adduct with glutaraldehyde
Astra Alab AB	<i>E. coli</i>	Sepharose; Sephadex G-200
Bayer AG	<i>E. coli</i>	Acrylamide, N, N-methylenebis (acrylamide) and maleic anhydride Dextran Maleic anhydride; tetramethylene glycol; dimethacrylate; Methacrylic acid
Beecham Group	<i>E. coli</i>	DEAE-Cellulose; CM-Cellulose; AE-Cellulose and other cellulose derivatives; CM-Sephadex Amberlite IRC-50 and other weak cation and anion exchangers Ethylene maleic anhydride copolymers Nylon Amberlite XAD-7 Sucrose/epichlorohydrin copolymer
Boehringer Mannheim	<i>E. coli</i>	Polyacrylamide
Hindustan Antibiotics Ltd	<i>E. coli</i>	Cellulose
Hoechst A.G.	<i>Fusarium spp</i>	Intermolecular adduct with glutaraldehyde
Otsuka Pharmaceuticals Pfizer Inc.	<i>E. coli</i>	Acrylamide copolymer; Anion exchange Phenol-formaldehyde resin
	<i>B. circulans</i>	DEAE-Sephadex
	<i>P. reitgeri</i>	Glycidyl methacrylate; methylene bisacrylamide; diatomaceous earth Poly(hydroxyethyl-methacrylate)
Rohm Pharma	<i>E. coli</i>	Eupergit C
Shionogi & Co. Ltd	NA	Basic anion exchanger (Polyamine; styrene; divinyl benzene)
SNAM Proghetti	<i>E. coli</i>	Cellulose triacetate fibres AH-Sepharose/benzoquinone Nitrocellulose fibres Polyethylene imine
Squibb	<i>B. megaterium</i>	Bentonite
Tallin Polytech Inst. USSR	NA	Polyacrylamide gel entrapment
Toyo Jozo	<i>B. megaterium</i>	Derivatised polyacrylonitrile

\*: Not available

**Tableau A 14** : Les sociétés produisant la pénicilline acylase et les microorganismes producteurs utilisés (SHEWALE et SIVARAMAN, 1989).

Actuellement, la production de PA se fait sur des milieux organiques complexes avec un ajout d'APA comme inducteur et en contrôlant la température et l'aération. Nous avons vu précédemment comment ces facteurs interviennent dans la synthèse de cette enzyme. Pour obtenir une bonne production, *E. coli* doit être cultivée sur un milieu où les sources de carbone et d'azote sont bien équilibrées. En général, le milieu de culture contient de l'extrait de levure, de l'extrait de malt, de l'hydrolysate de soja, de la liqueur de corn steep, des hydrolysats de protéines ou un mélange d'acides aminés. D'après WOJSKOWICZ (1984) la peptone est plus appropriée que la tryptone pour la production de cette enzyme. L'addition de glutamate (0,5 %) permet d'augmenter la synthèse de l'enzyme dans un milieu contenant de l'extrait de levure alors que dans un milieu contenant de la peptone, il y a inhibition de la production. Chez *Bacterium faecalis alcaligenes*, la production de PA est stimulée par la peptone, l'hydrolysate de caséine, le tryptophane et l'acide anthranillique alors qu'elle est diminuée par la production des acides acétique et pyruvique.

L'addition de pénicilline V ou G ou des produits issus de leur dégradation n'a pas d'effet sur la production de la PA (URI et coll., 1964), en revanche le 6-APA réprime sa synthèse chez *E. coli* (WOJSKOWICZ, 1981).

SIKYTA et SLEZAK (1964) ont cultivé en continu *E. coli* ATCC 9637 à un taux de dilution de 0,5 h<sup>-1</sup>. Ces auteurs constatent que la productivité est 7 fois plus forte qu'en culture discontinue, mais que la concentration nécessaire en phénylacétate d'ammonium est 10 fois plus forte.

Pour GEBAUER et coll. (1987), la production de PA (à 27 °C et avec 0,8 g/l d'APA) par *E. coli* 11105 en réacteur parfaitement mélangé est légèrement supérieure qu'en réacteur colonne avec une boucle de recyclage, les conditions d'aération optimales sont respectivement pour chaque type de réacteur 10 % et 35 % en oxygène dissous.

Le tableau A 15 permet de récapituler les résultats obtenus dans la littérature. L'emploi de différentes unités enzymatiques rend malheureusement impossible toute comparaison des performances obtenues dans les travaux cités.



<i>souches</i>	<i>milieux</i>	<i>T (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>O<sub>2</sub></i>	<i>commentaires</i>
<i>E. coli</i> réprimée par glucose	- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 14 g/l - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 6 g/l - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 2 g/l - MgSO <sub>4</sub> : 2 g/l - APA : 0,5 g/l	28	non régulé	non régulé	- culture de 500 ml - sans glucose 500 U/l - glucose 100U/l - AMP <sub>C</sub> (2,5 mM) 800U/l - 1 unité = quantité d'enzyme qui produit 2,3 mmol 6-APA/h à 37°C
(GANG et SHAIKH, 1976)					
<i>E. coli</i> ATCC 11105 réprimée par le glucose	- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 4,2 g/l - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 3,4 g/l - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 0 - MgSO <sub>4</sub> : 0 - APA régulé à 0.8 g/l - extrait de viande : 4 g/l levure : 4 g/l - peptone de caséine : 4 g/l	26-27	6,7- 6,9	10 %	- 320U/l - 100U/g de biomasse - unités non définies
(GEBAUER et coll., 1987)					
<i>E. coli</i> ATCC 9637	- corn steep liquide : 9 g/l - peptone : 10 g/l - huile de soja : 1 g/l - APA 0,15 à 1,5 g/l	27-29	7,5	0,3 vvm	- 12,5 mg 6-APA/ml en 12h à 37°C
(SIKYTA et SLEZAK, 1964)					

**Tableau A 15 :** Production de pénicilline acylase : les microorganismes producteurs, les milieux et les conditions de culture.

L'amélioration de la production de la PA peut être faite en contrôlant le métabolisme et/ou en modifiant le génotype.

Après avoir vu quelques exemples d'amélioration de la production par le contrôle des paramètres de l'environnement voyons quelles ont été les modifications réalisées sur la souche.

### II.2.2. - Production de pénicilline acylase par *E. coli* recombinée

Il existe deux façons de modifier le génotype d'une souche : la mutation et la recombinaison. Ces deux techniques ne sont pas exclusives, une souche pouvant être à la fois mutée et recombinée.



Les ultra-violet (UV), le N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NNNG), l'éthylméthane sulfonate (EMS) sont les agents mutagènes les plus couramment utilisés pour isoler des mutants. Ces souches mutées sont sélectionnées d'après deux principaux critères qui sont :

- produire plus de PA
- ne plus subir la répression catabolique ni l'induction par l'APA.

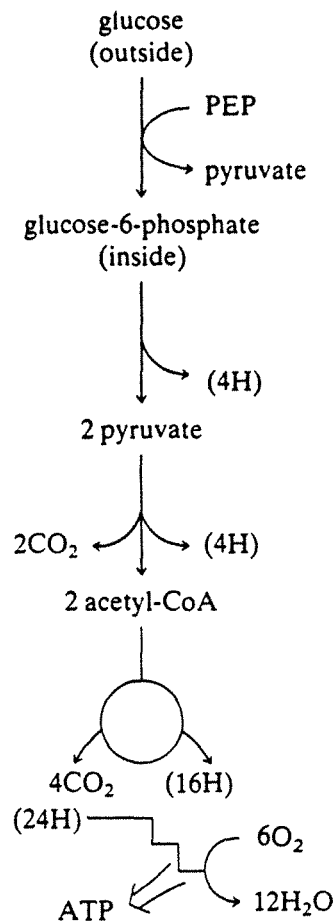
D'autre part, à partir des différentes souches, le gène de la PA a été cloné dans différents vecteurs afin d'obtenir des souches plus performantes. Les différentes souches sélectionnées et leurs performances comparées à celles des souches sauvages sont reportées dans le tableau A 16.

Parent strain	Mutated or recombinant strain	Mutagenic agent or vector	Fold increase in PA <sup>a</sup> production	Type of mutant/construct
<i>E. coli</i> 9637	<i>E. coli</i> Strain 5	Nutrient dependent	20.0	Constitutive
<i>E. coli</i> 9637	<i>E. coli</i> M-1	NA <sup>b</sup>	7.0	NA
<i>B. megaterium</i> ATCC 14945	<i>B. megaterium</i> KFCC 10029	UV	4.0	Constitutive
<i>E. coli</i> IFO 13500	<i>E. coli</i> AS2	MNNG <sup>c</sup>	2.2	Inducible
<i>E. coli</i> IFO 13500	<i>E. coli</i> AS2	MNNG	6.0	Inducible
<i>B. sphaericus</i>	<i>B. subtilis</i>	pOH 38	1.7	Constitutive
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> KFCC-84-3	NA	2.0	Constitutive
<i>K. citrophila</i> ATCC 21285	<i>E. coli</i>	NA	30.0	NA
<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	pPL608	1.2	NA
<i>E. coli</i> 194	<i>E. coli</i> pMLV7	pACYC 184	10.6	Constitutive
<i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>E. coli</i> 5K/pHM6	pBR322	4.6	Constitutive
<i>E. coli</i> 5K/pHM6	<i>E. coli</i>	UV	1.8	Constitutive
<i>P. rettgeri</i> ATCC 31052	<i>P. rettgeri</i> CYC1	Nutrient dependent spontaneous	150.0	Constitutive
<i>P. rettgeri</i> CYC1	<i>E. coli</i> JW358	pACYC 184	— <sup>d</sup>	Constitutive

<sup>a</sup>: Pen G acylase; <sup>b</sup>: Not available; <sup>c</sup>: N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine; <sup>d</sup>: Activity expressed in *E. coli* was similar to *P. rettgeri* CYC1 i.e. 150–200 fold more than the wild strain.

**Tableau A 16 :** Les souches obtenues par mutation ou recombinaison pour la production de pénicilline acylase (SHEWALE et SIVARAMAN, 1989).

Après avoir étudié la PA et sa production nous développons dans la partie suivante l'aspect microbiologique.



A. Transport of D-glucose into the cell by the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system.

B. Degradation of D-glucose-6-phosphate to pyruvate via the Embden-Meyerhof-Parnas pathway.

C. Oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-coenzyme A by pyruvate dehydrogenase.

D. Oxidation of the acetyl moiety of acetyl-coenzyme A to  $\text{CO}_2$  via the tricarboxylic acid cycle.

E. Oxidation of the reduced coenzymes formed in steps B to D in the respiratory chain.

**Figure A 12 :** Le catabolisme du glucose en aérobiose chez *E. coli* (GOTTSCHALK, 1979).

### III - Aspect microbiologique

Nous présenterons dans cette partie les caractéristiques de la souche que nous avons utilisée pour notre travail de thèse et plus précisément des paramètres agissant sur sa croissance.

#### III.1. - Présentation de la souche

*E. coli* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est une bactérie en forme de bâtonnet droit, gram négatif, anaérobie facultative et mésophile (température optimale autour de 37°C).

La souche d'*E. coli* fournie par la société Rhône-Poulenc, est issue de 2 mutagénèses successives à la nitrosoguanidine d'une souche qui elle-même provient de la souche ATCC 11105 (cf. matériels et méthodes). Cette souche provient elle-même de l'ATCC 9637.

DAVIS (1949) note que cette dernière a besoin de facteurs présents dans l'extrait de levure et de quasiment tous les acides aminés sauf l'alanine, l'hydroxyproline et l'acide aspartique.

#### III.2. - Principaux paramètres agissant sur la croissance

##### III.2.1. - *Source de carbone et d'énergie*

*E. coli* peut pousser sur de nombreux substrats avec ou sans oxygène. Un des substrats carbonés le plus couramment utilisé est le glucose. La figure A 12 schématise le catabolisme du glucose en aérobiose. Dans ces conditions, le glucose est oxydé en dioxyde de carbone, l'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons. La souche peut de cette façon produire l'adenosine triphosphate (ATP) dont elle a besoin pour synthétiser ses métabolites. Elle utilise la voie de la glycolyse, le cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques (TCA) et enfin la chaîne respiratoire (Fig. A 12). D'autre part *E. coli* utilise la voie de pentoses phosphates pour régénérer le NADPH et produire les pentoses phosphates. En présence d'une trop forte concentration en glucose, *E. coli* est soumise à l'effet Crabtree c'est-à-dire qu'étant en métabolisme respiratoire, le dioxyde de carbone produit est remplacé par des métabolites issus du métabolisme fermentaire (DOELLE, 1981). L'effet Crabtree est une répression des enzymes du cycle TCA conduisant à une production d'éthanol, d'acétate, de succinate, de lactate, d'acide formique et d'acétoïne.

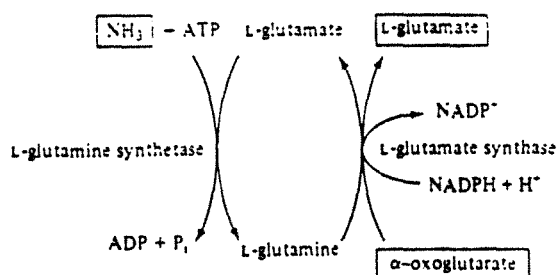
Lorsque *E. coli* est cultivée sur un milieu complexe, l'effet Crabtree est encore plus prononcé. Dans ces conditions, le cycle TCA a un rôle de biosynthèse moins important que sur milieu synthétique. En effet, la cellule possède assez d'énergie (ATP) : des quantités plus faibles de glucose entraînent une répression du cycle TCA (MORGAN, 1986). Il est important de ne pas

mettre *E. coli* dans ces conditions car la production d'acétate inhibe de la croissance (cf. § III.2.6). RINAS et coll. (1989) cultivent *E. coli* sur un milieu complexe Luria Broth (LB) contenant du glucose (le milieu LB est composé entre autres d'extrait de levure), et constatent que le glucose est le premier substrat consommé. Ensuite quelques acides aminés (aspartate, asparagine, thréonine et alanine) sont assimilés comme source de carbone. Durant cette première phase, le glutamate est accumulé pour n'être consommé qu'ultérieurement. La production de glutamate qui se fait à partir de l'oxydation incomplète du glucose (en présence d'ammonium) indique que le cycle TCA est réprimé (cf. paragraphe suivant). Nous sommes dans le cas précédemment cité ; la bactérie n'a pas à utiliser le cycle TCA pour synthétiser des molécules qui sont présentes dans le milieu.

### III.2.2. - Source d'azote

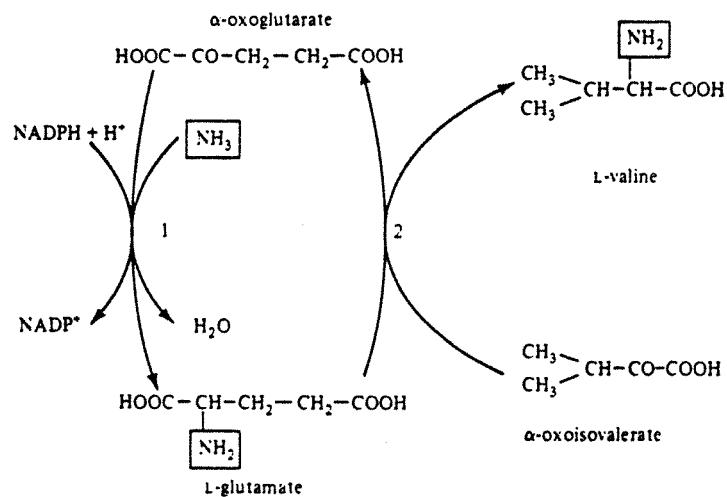
L'azote est un nutriment essentiel qui selon le microorganisme peut être assimilé sous forme d'azote organique, d'ammoniaque, de nitrate ou d'azote moléculaire. *E. coli* ne peut assimiler l'azote que sous formes organique et ammoniacale. La plupart des microorganismes peuvent utiliser l'ammoniaque, ou plutôt les ions ammonium. Ceux-ci incorporés sous forme de glutamate ou de glutamine sont utilisés comme précurseurs pour la synthèse de composés azotés pour la cellule. Chez les bactéries gram négatif, il existe deux voies d'assimilation de l'ammonium.

A faible concentration en ions ammonium (<1mM), une action combinée de la glutamine synthétase et glutamate synthase aboutit à la formation de glutamate à partir des ions ammonium et de l' $\alpha$ -oxoglutarate (intermédiaire du TCA). Cette réaction se fait grâce à la glutamine  $\alpha$ -amino-oxoglutarate transférase (Fig. A 13) (GOGAT).



**Figure A 13 :** Assimilation de l'ammoniaque par l'intermédiaire de la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) (GOTTSCALK, 1979).

En revanche, quand il n'y a pas de limitation, les ions ammonium sont assimilés grâce à la glutamate déshydrogénase qui catalyse la réaction d'amination de l' $\alpha$ -oxoglutarate en glutamate (GOTTSCHALK 1979). La figure A 14 schématise l'action de la glutamate deshydrogénase et la formation de L-valine à partir de l' $\alpha$ -oxoisovalerate (exemple de la réaction de transamination).



**Figure A 14 :** Assimilation de l'ammoniaque par l'intermédiaire de L-glutamate deshydrogénase (1) et le transfert du groupement amine au cours de la réaction de transamination (2) (GOTTSCHALK, 1979).

Le glutamate et la glutamine sont donc deux métabolites clefs dans la biosynthèse des acides aminés et leur disponibilité affecte le flux d'ions ammonium métabolisés en protéines.

SHU et SHULER (1989) ont aussi étudié les interactions entre la glutamine et les ions ammonium dans la mesure où ils sont substituables pour la synthèse de certains composés ; ces auteurs ont montré que le taux de croissance sur ammonium est plus fort que sur glutamine.

L'assimilation d'une source d'azote organique est plus compliquée que celle des ions ammonium car ce substrat peut servir de source d'azote bien sûr mais aussi de carbone. De plus, les enzymes qui permettent cette assimilation sont généralement contrôlées (induction, répression catabolique, HARDER et DIJKHUISEN, 1983). En effet, chez les bactéries gram négatif, un certain nombre d'enzymes impliqués dans le catabolisme de l'azote organique sont inductibles; l'amidase et histidase, enzymes permettant l'assimilation de l'arginine, l'allantoïne et la lysine. La répression catabolique de ces enzymes est observée quand en présence de l'inducteur, une source préférentielle de carbone ou d'azote est disponible. En absence d'ammoniaque, la répression catabolique est partiellement supprimée, ce qui permet d'utiliser l'azote organique à un taux

suffisant pour subvenir aux besoins azotés de la bactérie. Cette régulation par la disponibilité de la source d'azote est supposée être due à la glutamine synthétase qui est elle-même dérégulée quand il y a une limitation en azote (HARDER et DIJKHUISEN, 1983). Dans ces conditions, pour beaucoup de microorganismes il n'y a pas seulement qu'une dépression de la synthèse des enzymes impliquées dans l'assimilation de l'ammonium ou de l'azote organique mais il y a une dépression du système de transport des acides aminés (HARDER et DIJKHUISEN, 1983). D'autre part, MIZUTANI et coll. (1986) constatent qu'un flux trop fort d'acides aminés peut entraîner une limitation de la croissance.

Après avoir vu l'importance des différentes sources de carbone, d'azote et d'énergie, nous allons étudier l'influence des paramètres qui définissent l'environnement (le pH, l'aération, la température) sur la croissance.

### III.2.3. - pH

La cellule régule son pH interne de manière à ce qu'il reste constant. D'après CHING et coll. (1989) l'effet du pH sur la croissance est directement lié aux ions  $H^+$ . Nous savons que la force proton motrice permet de réguler la conservation de l'énergie par la synthèse de l'ATP et les transports transmembranaires (MITCHELL, 1973).

Or :

$$\Delta P = \Delta \psi - 2,3 \times \frac{R \times T}{F} \times (\Delta pH)$$

avec :

$\Delta P$  = force proton motrice

$\Delta \psi$  = potentiel membranaire

R = constante des gaz parfaits

T = température

F = faraday

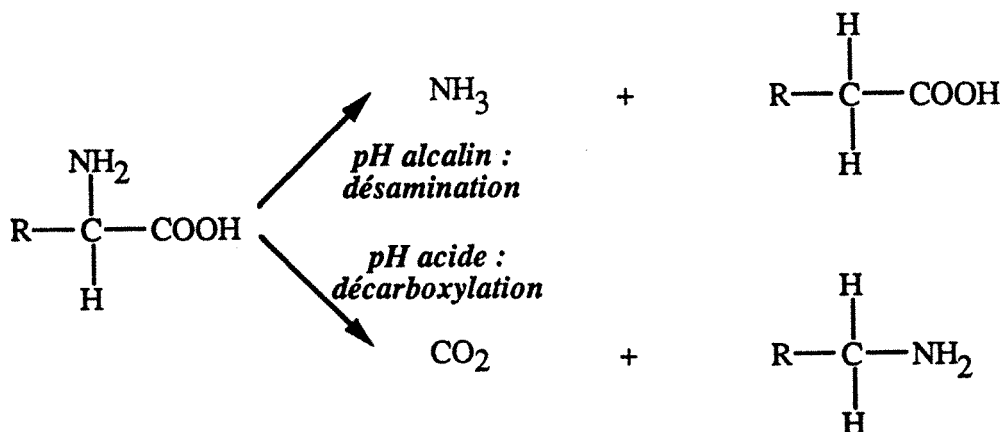
$\Delta pH$  = différence de pH entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule.

Le pH intracellulaire étant basique, une forte augmentation du pH extracellulaire annule le gradient de pH se qui va se traduire par une modification voire même un arrêt des transports transmembranaires et de la synthèse de l'ATP.

D'autre part, le pH peut intervenir dans le choix des voies métaboliques de la cellule, par

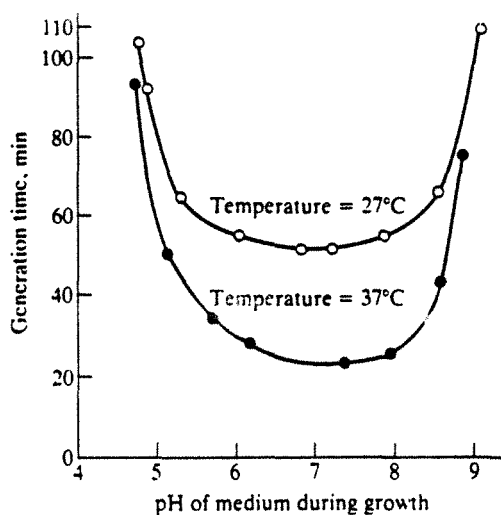


exemple, le pH du milieu de culture va déterminer la production des enzymes du catabolisme des acides aminés (Fig. A 15).



**Figure A 15** : Influence du pH sur la réaction de dégradation des acides aminés (SCRIBAN 1984).

D'autre part le pH a un effet sur la croissance par l'intermédiaire des acides organiques produits (CHING et coll., 1989). L'équilibre entre la forme dissociée et la forme libre d'un acide dépend de la valeur du pH et, d'après la littérature (WANG et WANG, 1984, MONOT et coll., 1984), la forme non dissociée de l'acide est plus inhibitrice. Le pKa de l'acide acétique est de 4.6 donc, lorsque le pH est supérieur au pKa, la forme dissociée est prédominante. De ce fait, la concentration inhibitrice en acide acétique est plus faible à pH 7 qu'en milieu acide (LANDWALL et HOLME, 1977 b). LALLAI et coll. (1988) sur culture mixte, ainsi que IVERSEN (1987) sur *Klebsiella pneumoniae* montrent que le pH a une influence directe sur le taux de croissance, la vitesse spécifique de consommation du substrat et le rendement. La figure A 16 montre l'influence du pH sur la croissance de *E. coli* son pH optimum se situe vers 7 pour 37°C et 27°C.



**Figure A 16** : Effet du pH sur le temps de génération de *E. coli* (à 27 °C et 37 °C) (BAILEY et OLLIS, 1986)

Un contrôle du pH permet donc de limiter la production d'acétate et de maintenir la force proton motrice. Le tableau A 17 met en évidence l'augmentation des rendements en ammonium et glucose lorsque le pH est régulé. En fait, chaque souche d'*E. coli* a un pH optimum qui est en général voisin de 7.

pH contrôlé	non	oui	oui	oui
Régulation du pH base acide	- -	NaOH HCl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> OH HCl
Biomasse produite (g poids sec / l)	0,39	2,8	2,8	1,55
$\mu$ max (h <sup>-1</sup> )	1,09	1,02	1,04	0,976
Y X/ammonium (g / g)	3,98	6,36	5,96	1,51
Y X/glucose (g / g)	0,19	0,333	0,331	0,244
pH final	4,3	6,8	6,8	6,8

Tableau A 17 : Effet du pH sur une fermentation d'*E. coli*  
(THOMPSON et coll., 1985)

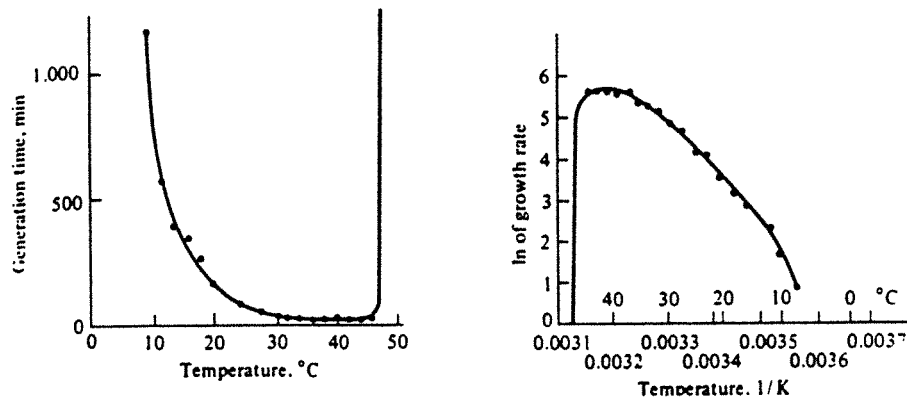
### III.2.4. - Aération

En culture aérée, l'oxygène sert d'accepteur terminal d'électrons. Pour *E. coli*, une limitation en oxygène (due à un mauvais transfert gaz-liquide) entraîne la transition d'un métabolisme respiratoire à un métabolisme fermentaire ce qui se traduit par la production de nombreux métabolites, éthanol et acides organiques, qui comme nous l'avons vu peuvent inhiber la croissance. Une trop forte aération peut aussi être toxique pour les cellules, c'est pourquoi l'oxygène pur n'est utilisé que pour l'aération de culture à forte densité cellulaire (CUTAYAR et POILLON, 1989). Pour une fermentation en aérobiose d'*E. coli*, une régulation à 40 % en O<sub>2</sub> dissous est couramment utilisée (PAN et coll., 1987) et permet d'éviter la production de l'acétate.

### III.2.5. - Température

La température affecte les différentes caractéristiques de la croissance microbienne, le taux de croissance (RATKOWSKY et coll., 1982 et 1983), les rendements (MAINZER et HEMPFLING, 1976), l'énergie de maintenance et le pool d'ATP. En effet, KAHRU et coll. (1987) montrent que l'augmentation du pool d'ATP est bien due à une augmentation de la

température et non pas du taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ). La température de croissance optimale pour *E. coli* est voisine de 37°C (Fig. A 17 a et b).



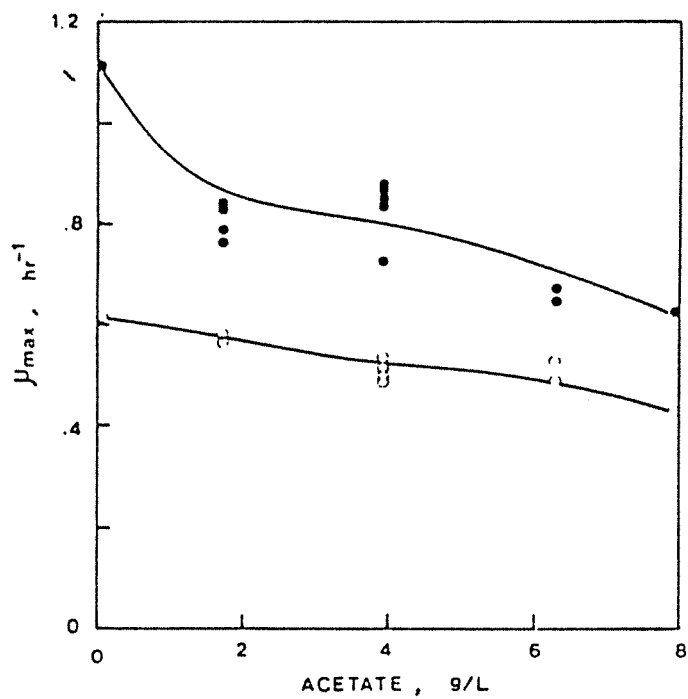
**Figure A 17 :** a - Evolution du temps de génération en fonction de la température (degré Celsius)  
 b - Evolution du logarithme du taux de croissance en fonction du rapport 1/température (degré Kelvin).  
 Le taux de croissance de *E. coli* augmente avec la température, mais si la température est trop élevée, les cellules meurent (BAILEY et OLLIS, 1986).

### III.3. - Stratégies utilisées pour la conduite des fermentations de *E. coli*

#### III.3.1. - *Stratégies utilisées pour la conduite des fermentations de E.coli non recombinée*

Ayant fait l'inventaire des paramètres qui ont une influence sur la croissance d'une *E. coli*, nous pouvons examiner les stratégies qui sont utilisées pour cultiver cette bactérie. Lorsque le microorganisme est utilisé pour produire une protéine intracellulaire, comme c'est le cas pour la majorité des protéines synthétisées chez *E. coli*, il est important de choisir un processus qui permet d'obtenir une forte concentration intracellulaire en produit et une forte densité cellulaire (RINAS et coll., 1989). En culture discontinue, il est difficile d'atteindre des fortes concentrations en biomasse car il faudrait pour cela ajouter dès le début de la fermentation des fortes concentrations en substrats susceptibles d'inhiber la croissance. La culture en semi-continu permet d'éviter ce type d'inhibition et ainsi d'atteindre rapidement des densités cellulaires élevées.

Le substrat généralement utilisé est le glucose. Mais en aérobiose, l'effet Crabtree entraîne la production de sous produits (ANDERSEN et VON MEYENBURG, 1980). Pour empêcher l'accumulation de ces métabolites qui se traduit par une chute du taux de croissance et des rendements, la stratégie choisie est celle du semi-continu (GLEISER et BAUER, 1981, MORI et coll., 1979). Pour NEIJSSSEL et TEMPEST (1979) il n'y a pas accumulation de ces produits si le glucose est limitant. Cependant, HOLMS et BENNETT (1971) et ANDERSEN et VON



**Figure A 18 :** Effet de l'acide acétique sur le taux de croissance de *E. coli* (en erlenmeyer) (PAN et coll., 1987).  
 ● croissance sur glucose et extrait de levures, ○ croissance sur glucose

MEYENBURG (1980), ont mis en évidence une production d'acétate dans des conditions de culture où le glucose est limitant. Lorsque le milieu de culture est complexe, et que le glucose est utilisé comme source de carbone complémentaire, il est nécessaire de réduire fortement le taux de croissance pour empêcher la formation de l'acétate (MEYER et coll., 1984, PAN et coll., 1987) (Fig. A 18). Il est donc important de contrôler l'alimentation en glucose (GLEISER et BAUER, 1981)

Différentes stratégies sont suivies pour alimenter le réacteur. BAUER et SHILOACH (1974) ont cultivé *E. coli* sur milieu semi-synthétique en contrôlant le pH avec de l'ammoniaque et en utilisant l'oxygène pur de façon à ne pas être limité par l'aération. Lorsque le glucose devient limitant, la concentration en oxygène dissous augmente et déclenche un ajout de glucose. Une concentration maximale en biomasse de 26 g/l est obtenue en fin de culture. Avec une version automatisée, utilisant une alimentation en saccharose permettant de maintenir la concentration en oxygène dissous supérieure à 15 % de la saturation, 42 g/l de biomasse sont produits (GLEISER et BAUER, 1981).

SHILOACH et BAUER (1975) ont réalisé des expériences dans des conditions similaires, mais l'alimentation en glucose est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque versée pour réguler le pH (15 g de glucose / g NH<sub>3</sub>). La concentration finale en biomasse atteinte est de 35 g/l. Le rapport choisi est constant alors qu'en fonction des conditions il est susceptible d'évoluer. Ces auteurs remarquent que seul le rendement de conversion du phosphate en biomasse augmente de 26 à 41,5 g/g lorsque la température de culture varie entre 19 et 34 °C. Ceci reflèterait d'après ces auteurs une augmentation de la concentration en ARN lorsque le taux de croissance augmente avec la température.

La même stratégie est utilisée plus tard par BAUER et ZIV (1976) pour cultiver 4 souches différentes de *E. coli*. Les taux de croissance maximum de ces souches varient entre 0,17 et 0,56 h<sup>-1</sup> et les concentrations finales en biomasse sont comprises entre 31 et 41 g/l. A partir de ces résultats, BAUER et WHITE (1976) utilisent la température pour contrôler le taux de croissance et donc indirectement la vitesse de consommation de l'oxygène. Une première phase de croissance exponentielle est obtenue à 35 °C avec une aération et une agitation maximales. Ensuite la température est diminuée pour maintenir une concentration en oxygène dissous à 10 % de la saturation, ainsi ils obtiennent 47 g/l de biomasse. Le problème de cette technique est que pour un fermenteur de 250 l la capacité de refroidissement est inférieure à la chaleur dégagée par la fermentation.

LANDWALL et HOLME (1977 a) cultivent *E. coli* en dialysant la culture et en utilisant un taux d'alimentation constant. Ils obtiennent ainsi 140 à 150 g/l de biomasse. Par rapport à une culture non dialysée, la concentration finale est multipliée par 3,5. Ce procédé permet d'éliminer les acides organiques qui d'après ces auteurs interfèrent avec le métabolisme cellulaire.

KOLE et coll. (1986) cultivent *E. coli* B en contrôlant l'alimentation de l'ammoniaque par l'intermédiaire d'une sonde à ammoniaque. Pour cette culture le pH est ajusté à 7 en utilisant de la soude. Le glucose est ajouté en fonction de la quantité d'ammoniaque versée (13 mole / mole  $\text{NH}_3$ ). Ce rapport a été calculé en fonction de la consommation de ces deux substrats pour différentes fermentations. Ce rapport est supérieur à celui préconisé par SHILOACH et BAUER (1975) car pour eux l'ammoniaque étant utilisé pour ajuster le pH, des plus grandes quantités sont versées dans le milieu.

MORI et coll. (1979) ont réalisé une culture semi-continue de *E. coli* B avec une alimentation en glucose intermittente, fonction de la concentration en oxygène dissous dans le réacteur. Le glucose est le seul nutriment limitant et il permet donc de contrôler la croissance. Dès que la concentration en oxygène dissous augmente, le glucose est ajouté. Ainsi, ces auteurs produisent 128 g/l de biomasse en 12 h. CUTAYAR et POILLON (1989) obtiennent les mêmes résultats en utilisant la même stratégie d'alimentation. Cependant leur milieu de culture est plus riche que le précédent. Il contient 350 g/l de glucose et 180 g/l d'extrait de levure. Ces auteurs considèrent que dès qu'un nutriment devient limitant la concentration en oxygène dissous augmente.

En conclusion, nous constatons que la stratégie suivie pour atteindre des fortes densités cellulaires consiste à restreindre le taux de croissance à des valeurs nettement inférieures au taux de croissance maximum afin d'éviter une limitation en oxygène et une production d'acétate.

### *III.3.2. - Stratégies utilisées pour les fermentations de E. coli recombinée*

La mise en œuvre de culture de *E. coli* recombinée fait appel à la même stratégie dans la mesure où les objectifs à atteindre sont identiques. Pour les microorganismes recombinés les milieux de culture sont souvent complexes. Or ces milieux permettent d'obtenir des taux de croissance plus élevés que les milieux synthétiques. Il faut donc contrôler d'autant plus strictement le taux de croissance de façon à éviter la production d'acétate qui inhibe la croissance. De plus, BROW et coll. (1985) ainsi que ZABRISKIE et ARCURI (1986), précisent qu'une accumulation d'acétate dans le milieu de culture diminue la production des protéines recombinées. Nous allons citer quelques exemples concernant la culture semi-continue de *E. coli* recombinée.

Différentes stratégies d'alimentation pour la culture de *E. coli* pour la production de l'insuline humaine sont comparées. La souche utilisée est auxotrophe pour le tryptophane et l'expression du gène de l'insuline est sous le contrôle du promoteur *trpE* (ZABRISKIE et ARCURI, 1986). Le contrôle se fait soit sur la température soit sur l'alimentation en glucose de façon à éviter une limitation en l'oxygène. Les mêmes performances (croissance et synthèse d'insuline) sont atteintes avec ces deux méthodes. Mais, les productions de biomasse et d'insuline sont meilleures lorsque l'induction est déclenchée après la croissance en supprimant le tryptophane du milieu de culture.

Pour une culture semi-continue de *E. coli* recombinée produisant de l'interféron humain  $\alpha$ , le taux de croissance est contrôlé par l'alimentation en glucose (ZABRISKIE et ARCURI, 1986). Une première phase de croissance est réalisée à 30 °C, l'alimentation en glucose est ajustée de façon à garder le taux de croissance entre 0,1 et 0,14 h<sup>-1</sup> et ainsi éviter la production d'acétate. Ainsi, 30 g/l de biomasse sont produits en 38,5 h. Ensuite la température est augmentée à 42 °C pour induire la réplication du plasmide et ainsi déclencher la synthèse de l'interféron. En fin de culture les concentrations en biomasse et en interféron sont respectivement de 65 g/l et 5,5 g/l, l'acétate n'est pas détecté.

La composition du milieu de culture est aussi très importante pour la production des protéines hétérologues. Ce sujet a été abordé pour les cultures de *E. coli*. TSAI et coll. (1987) changent la composition du milieu d'alimentation pendant la phase d'induction de *E. coli* recombinée produisant de l'IGF-1 (insuline like growth factor). La présence d'une concentration élevée en azote organique protège l'IGF-1 d'une dégradation par protéolyse. Ils obtiennent ainsi 30 mg d'IGF-1/g de biomasse alors qu'en gardant la même alimentation la production spécifique n'est que de 3 mg/g.

JUNG et coll. (1988) contrôlent l'alimentation en glucose de façon à éviter la production d'acétate et ils régulent la concentration en oxygène dissous à 40 % de la saturation en aérant avec de l'air enrichi. Ainsi ils obtiennent suivant les constructions réalisées dans *E. coli* B 55 ou 30 g/l de biomasse et 2,2 ou 2 g/l d'interleukine  $\beta$ .

### III.3.3. - Discussion

*E. coli* est un microorganisme dont la physiologie est relativement bien connue. Les principaux paramètres de la fermentation sont en général contrôlés de façon à garder un taux de croissance élevé mais sans produire d'acétate (contrôle du pH, de la température, de l'oxygène et du glucose). Bien sûr d'autres éléments (Na<sup>+</sup>, les métaux, le phosphate...) sont indispensables à

STRATEGIES	<i>E. coli</i> RECOMBINE	MILIEU	GAZ UTILISE	BIOMASSE (g/l)	PRODUCTIVITE (g/l.h)	REFERENCES
ajout de glucose quand COD augmente	-	C	oxygène	26	2,3	BAUER et SHILOACH (1974)
contrôler COD en variant l'alimentation en sucre	-	C	oxygène	42	4,7	GLEISER et BAUER (1981)
ajout de glucose proportionnellement à NH <sub>3</sub> utilisé pour réguler le pH	-	C	oxygène	35	3,9	SHILOACH et BAUER (1975)
ajout de glucose proportionnellement à NH <sub>3</sub> utilisé pour réguler le pH et baisser la température pour maintenir une COD > 10%	-	C	oxygène	47	3,6	BAUER et WHITE (1976)
maintenir la source de C constante sans créer de limitation en O <sub>2</sub>	-	S	air	43	0,8	ZABRISKIE et ARCURI (1976)
ajouts de sources de C et N (extrait de levure) contrôlés par la COD (>40%)	-	C	air/oxygène	110	9,1	CUTAYAR et POILLON (1989)
culture dialysée, glucose limitant et COD (>20%)	-	C	air/oxygène	130	8,7	LANDWALL et HOLME (1977)
ajouter la source de C pour limiter le taux de croissance pour ne pas produire d'acétate	+	C	air	65	1,3	ZABRISKIE et ARCURI (1976)
ajouter la source de C pour limiter le taux de croissance	+	C	air	80	6,2	ZABRISKIE et ARCURI (1976)
source de C limite la croissance, COD >40%	+	C	air/oxygène	50	2,1	JUNG et coll. (1988)
glucose < 1 g/l, le débit est proportionnel à X et COD >50%	+	C	oxygène	14	1,2	TSAI et coll. (1987)

COD : concentration en O<sub>2</sub> dissous +: cellule recombinée

C : milieu complexe  
S : milieu synthétique  
X : biomasse

**Tableau A 18** : Cultures semi-continues de *E. coli* : stratégies utilisées et performances obtenues



la croissance mais ils ne sont en général pas contrôlés. De nombreuses stratégies en cultures semi-continues ont été développées afin d'optimiser la culture d'*E. coli*. Le **tableau A 18** permet de récapituler les stratégies utilisées pour les fermentations semi-continues et les performances obtenues. Les objectifs sont : le contrôle du taux de croissance, l'obtention d'une forte densité cellulaire et pour les microorganismes recombinés, une production de protéines aussi élevée que possible.

Les productivités et les concentrations en biomasse atteintes font d'*E. coli* un hôte très attrayant. Cependant, les cultures réalisées avec une souche de *E. coli* recombinée sont moins performantes (**Tab. A 18**). Les mêmes stratégies sont employées pour ces deux types de microorganismes, toutefois pour les bactéries recombinées, il faut tenir compte de plusieurs contraintes :

- maintenir des conditions de culture favorables à une bonne stabilité du plasmide afin d'éviter l'apparition de cellules non recombinées,
- compenser le handicap représenté par le vecteur pour la cellule hôte, se traduisant essentiellement par une diminution du taux de croissance,
- imposer au moment opportun des conditions de culture favorables à la synthèse de la protéine désirée même si elles ne sont pas compatibles avec une bonne croissance.

#### **IV - Modélisation**

La modélisation de procédés biologiques peut être utilisée pour l'interprétation des résultats expérimentaux, l'optimisation, l'extrapolation et l'automatisation.

En général, seuls quelques composants limitants sont considérés comme étant actifs sur le système, et les phénomènes d'inhibition par un substrat (par exemple le glucose) ou un produit (par exemple l'acétate) sont couramment utilisés pour modéliser la croissance bactérienne. Pour les autres paramètres déterminant l'environnement, leurs effets sont souvent négligés pour les cas de fonctionnements rencontrés et certains d'entre eux sont souvent régulés (pH, température et oxygène). Généralement, la modélisation se fait sur milieux synthétiques où les bilans matières peuvent être faits. Sur milieux complexes, la modélisation est plus compliquée car les substrats ne sont pas tous identifiés.

Il existe différents types de modèles qu'il est possible de classer suivant les hypothèses sur lesquelles ils reposent (**Fig. A 19**).

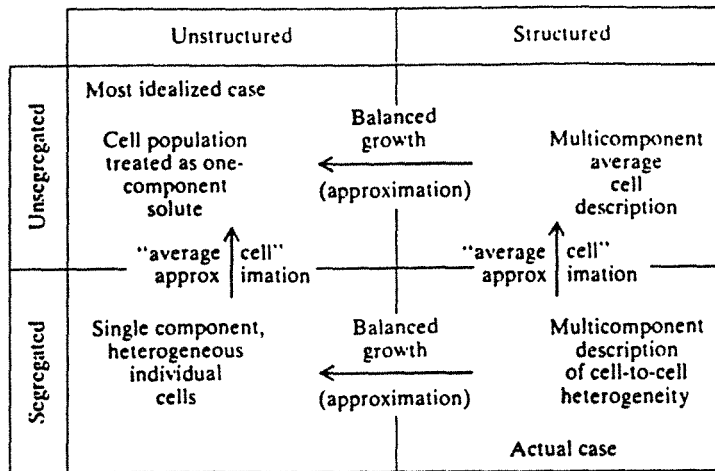


Figure A 19 : Différentes représentations d'une population cellulaire (BAILEY et OLLIS, 1986).

Lorsque la cellule est représentée comme un seul composant, le modèle est dit non structuré sinon il est structuré. Le modèle non structuré ne tient pas compte du fait que la cellule est une somme de différents composés. Elle est considérée comme si toutes ses activités de synthèses étaient coordonnées de telle façon que la composition de la cellule soit en équilibre ; elle n'est pas affectée par la prolifération des cellules (BAILEY et OLLIS, 1986). D'autre part, si les cellules sont considérées comme ayant toutes un même comportement "moyen", le modèle est dit non séparé ("unsegregated"). C'est-à-dire que l'hétérogénéité n'affecte pas les cinétiques du procédé. Si le modèle décrit le comportement de cellules, c'est-à-dire qu'il prend en compte le caractère hétérogène de la culture, il est dit séparé ("segregated"). Dans notre présentation nous ne différencierons que les modèles structurés et les non structurés.

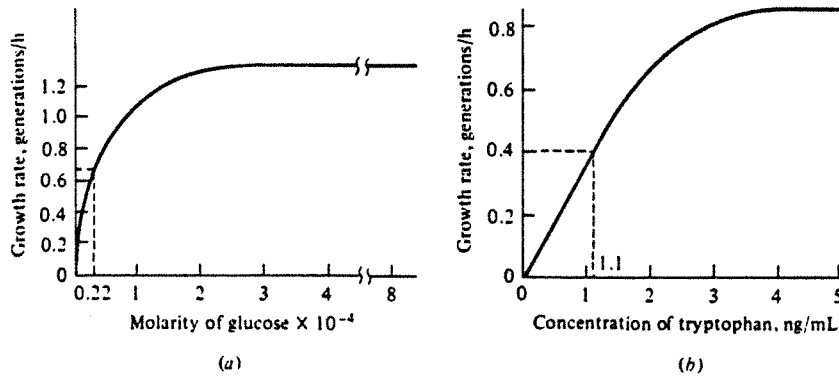
Nous allons présenter dans cette partie les différents types de modèles qui existent actuellement pour la culture de *E. coli* recombinée ou non. Nous décrivons pour commencer les modèles structurés et non structurés pour *E. coli*. Ensuite, nous nous intéresserons à la modélisation de *E. coli* recombinée (la classification des modèles est identique à la précédente).

#### IV.1.- Modèles pour *E. coli*

##### IV.1.1.- Modèles non structurés

Les modèles non structurés sont généralement plus simples et ont été les premiers modèles utilisés. Dans les modèles non structurés, la cellule est considérée comme un composant unique, et les relations entre la composition du milieu extérieur et la cellule sont pris en compte.

Si la concentration en un nutriment essentiel pour la croissance varie tandis que les concentrations des autres composants du milieu demeurent constantes, alors, généralement le taux de croissance évolue dans le temps suivant une loi hyperbolique (Fig. A 20).



**Figure A 20 :** Evolution du taux de croissance de *E. coli* en condition de limitation (a) par le glucose et (b) par le tryptophane (mutant auxotrophe pour le tryptophane) (BAILEY et OLLIS, 1986).

MONOD (1950) a proposé une relation entre le taux de croissance et la concentration du substrat essentiel. L'équation de MONOD est la suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_S + [S]}$$

avec :

- S représente la concentration du composant essentiel S dans le milieu de culture.
- $\mu_{\max}$  est la vitesse spécifique maximum de croissance, qui est atteinte lorsque la concentration en S est très supérieure à  $K_S$ .
- $K_S$  est la constante d'affinité de la bactérie pour le substrat S. Lorsque la concentration en S est égale à  $K_S$ , le taux de croissance est égal à la moitié du taux de croissance maximum ( $\mu = \mu_{\max} / 2$ ).

La valeur de  $K_S$  pour *E. coli* déterminée pour des cultures réalisées en limitation de glucose et de tryptophane sont égales respectivement à  $0,22 \cdot 10^{-4}$  mole/l et 1,1 ng/ml (Fig. A 20).

Cette équation est très simple mais elle ne peut théoriquement être utilisée qu'en condition de limitation par un substrat. La vitesse de consommation du substrat S ( $r_s$  en g/l.h) est exprimée en fonction du taux de croissance de la bactérie.

$$r_S = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot [X]$$

avec :

- $Y_{X/S}$  est le rendement de conversion du substrat S en biomasse (exprimé en g de X/ g de S)
- $[X]$  est la concentration en biomasse dans le fermenteur.

Lorsque la croissance est limitée par deux substrats il est théoriquement possible d'utiliser l'équation de Monod de la façon suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[S_1]}{K_{S_1} + [S_1]} \cdot \frac{[S_2]}{K_{S_2} + [S_2]}$$

avec :

- $S_1$  et  $S_2$  représentent les deux substrats limitant la croissance.
- $K_{S_1}$  et  $K_{S_2}$  sont les constantes d'affinité de  $S_1$  et  $S_2$  respectivement.

LEE et coll. (1984) ont développé un modèle pour simuler la croissance de *E. coli* en limitation de glucose et d'ammonium. Ils ont testé 3 formules différentes pour exprimer le taux de croissance de la bactérie :

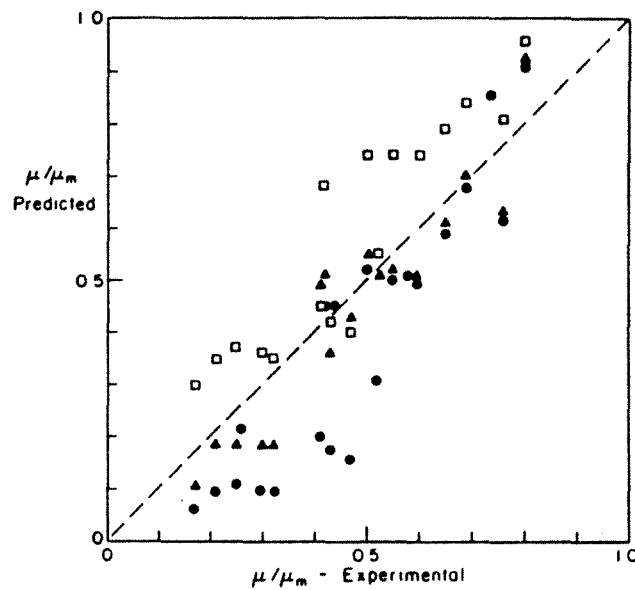
$$\begin{aligned} \mu &= [\mu(S_1) \cdot \mu(S_2)] && \text{équation n°1} \\ \mu &= 1/2 \cdot [\mu(S_1) + \mu(S_2)] && \text{équation n°2} \\ \mu &= \mu(S_1) \text{ ou } \mu = \mu(S_2) && \text{équation n°3} \end{aligned}$$

avec :

- $\mu(S_i)$  signifie que le substrat  $S_i$  est limitant et donc que le taux de croissance dépend de la concentration en  $S_i$ .
- $S_1$  et  $S_2$  représentent respectivement le glucose et les ions ammonium.

Pour le glucose l'équation de MONOD permet de décrire la relation entre le taux de croissance et la concentration en glucose. Pour les ions ammonium, les auteurs utilisent une équation plus compliquée qui tient compte des différents modes d'assimilation des ions ammonium (les équations sont détaillées dans l'article LEE et coll., 1984). Le système est limité par les ions ammonium pour un taux de croissance supérieure à  $0,4 \text{ h}^{-1}$  et par le glucose lorsque le taux de croissance de la souche est inférieure à  $0,3 \text{ h}^{-1}$ . Entre ces deux valeurs, le taux de croissance est limité par les deux substrats. La confrontation des résultats expérimentaux et des valeurs théoriques fournies par le modèle met en évidence que la 3ème équation proposée permet d'obtenir les

meilleurs résultats (Fig. A 21). C'est-à-dire que la croissance est limitée successivement par chacun des substrats.



**Figure A 21 :** Comparaison entre les valeurs théoriques et réelles du rapport  $\mu/\mu_{\max}$  (taux de croissance / taux de croissance maximum) (LEE et coll., 1984).  
 ● : équation 1 (cf texte), □ : équation 2 (cf texte), ▲ : équation 3 (cf texte)

Lorsqu'il y a plusieurs substrats limitants, nous constatons que la loi de MONOD n'est rapidement plus applicable.

#### VI.1.2.- Modèles cybernétiques :

Ce type de modèle se situe à la limite entre les modèles non structurés que nous venons de voir et les modèles structurés. Les modèles cybernétiques ont été développés par RAMKRISHNA en 1983 pour la modélisation des microorganismes cultivés sur des milieux complexes prenant en compte toutes les sources de carbone et d'azote.

La cellule est considérée comme un tout qui régule son activité en exerçant un contrôle sur le taux de synthèse et l'activité des enzymes, mais en aucun cas, ce type de modèle ne prend en compte les mécanismes de régulation.

Sur milieu minimal, généralement, seul un nutriment limite la croissance et ce sera toujours le même quelles que soient les conditions de croissance. Dans un milieu complexe, le microorganisme évolue dans des conditions où les nutriments vont devenir tour à tour limitants.



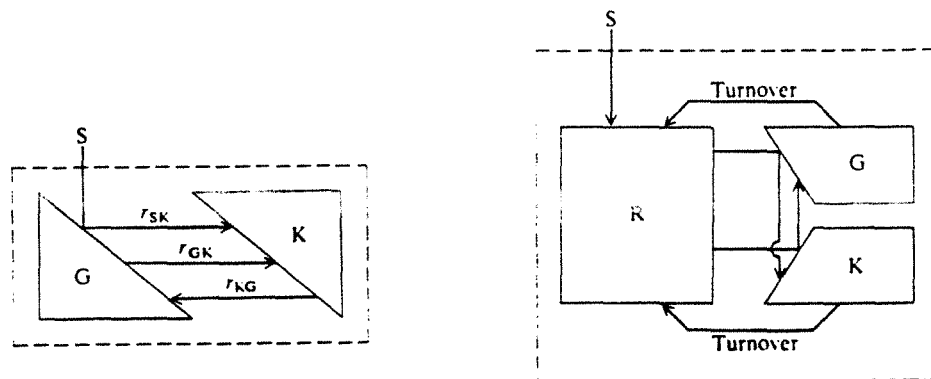
Dans un premier temps, TURNER et coll. (1989 et 1988) se sont limités à modéliser des fermentations où les nutriments étaient substituables les uns aux autres. PAVLOU et FREDRICKSON (1989) ont étendu l'application du modèle cybernétique aux cas où les substrats ne sont plus tous substituables, ce qui est le cas en milieu complexe. Ces auteurs considèrent qu'un microorganisme poussera toujours aussi rapidement que possible. Sur milieu minimal il n'y a pas d'alternative car la croissance est limitée par un seul substrat, en revanche sur milieu complexe de multiples combinaisons nutritionnelles existent dans la mesure où plusieurs nutriments peuvent être utilisés pour le même besoin. Cette étude est très intéressante, bien qu'elle ne soit encore que théorique, car c'est la seule qui cherche à prendre en compte tous les composants d'un milieu complexe. Cependant, les auteurs précisent que pour les cellules végétales et animales, l'hypothèse principale du modèle (le microorganisme cherche à pousser le plus vite possible) n'est pas applicable car ces cellules ont d'autres fonctions à remplir et d'autre part, elles n'ont pas autant que les levures et les bactéries la possibilité de s'adapter aux changements de substrats.

#### IV.1.3. - Modèles structurés

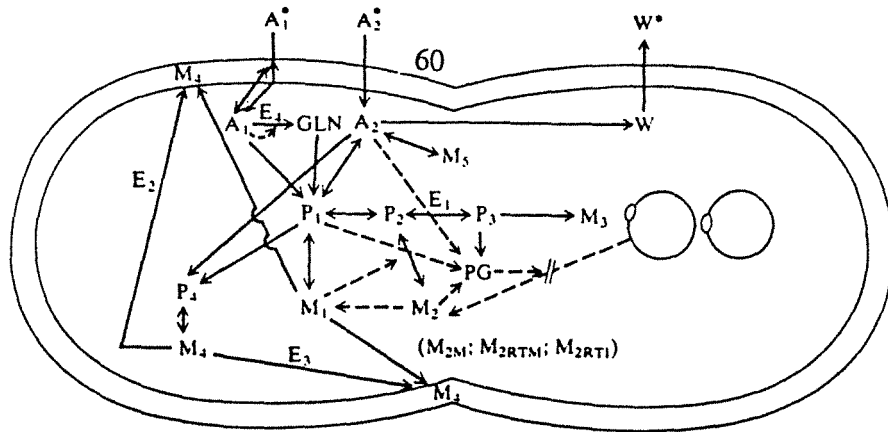
Les modèles non structurés ne prennent pas en compte la qualité de la phase biologique. Si la composition de la population microbienne change et entraîne des modifications dans les cinétiques, il faut utiliser des modèles structurés. Nous allons présenter maintenant quelques modèles structurés.

##### IV.1.3.1 - Modèles à compartiments

Ces modèles sont des extensions des modèles non structurés : la biomasse est divisée en quelques composants. HARDER et ROELS (1982) proposent un modèle à deux compartiments (Fig. A 22).

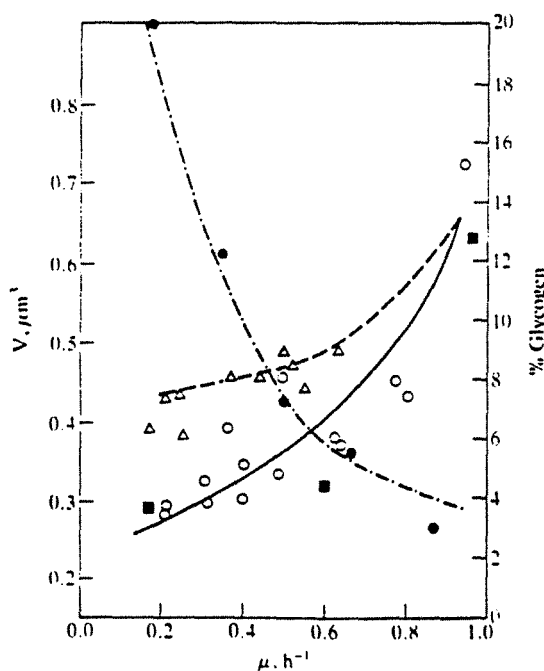


**Figure A 22 :** Représentation schématique du modèle à deux et trois compartiments de HARDER et ROELS (1982).



- $A_1^*$  = ammonium ion  
 $A_2^*$  = glucose (and associated compounds in the cell)  
 $W^*$  = waste products ( $CO_2$ ,  $H_2O$ , and acetate) formed from energy metabolism during aerobic growth  
 $P_1$  = amino acids  
 $P_2$  = ribonucleotides  
 $P_3$  = deoxyribonucleotides  
 $P_4$  = cell envelope precursors  
 $M_1$  = protein (both cytoplasmic and envelope)  
 $M_{2RTI}$  = immature "stable" RNA  
 $M_{2RTM}$  = mature "stable" RNA (rRNA and tRNA—assume 85% rRNA throughout)  
 $M_{2M}$  = messenger RNA  
 $M_3$  = DNA  
 $M_4$  = nonprotein part of cell envelope (assume 16.7% peptidoglycan, 47.6% lipid, and 35.7% polysaccharide)  
 $M_5$  = glycogen  
 $PG$  = ppGpp  
 $E_1$  = enzymes in the conversion of  $P_2$  to  $P_3$   
 $E_2, E_3$  = molecules involved in directing cross-wall formation and cell envelope synthesis  
 $GLN$  = glutamine  
 $E_4$  = glutamine synthetase
- the material is present in the external environment

**Figure A 23 :** Représentation schématique du modèle structuré de la croissance de *E. coli* B/r A (SHULER et coll., 1979).



**Figure A 24 :** Comparaison entre les valeurs expérimentales (figurés) et les valeurs théoriques (courbes —, ---, - · - · -) fournies par le modèle de SHULER et coll. (1979).  
—,  $\square$  ou  $\square$  : volume cellulaire (glucose limitant)  
---,  $\Delta$  : volume cellulaire (ammonium limitant)  
- · - · - ,  $\bullet$  : pourcentage de glycogène dans la cellule (ammonium limitant)



Le composant G représente les enzymes qui catalysent la conversion du substrat S en composant K. La vitesse de transformation dépend de la quantité du composant G. La relation entre les composants K et G (par polymérisation et dépolymérisation) permet d'introduire un terme de maintenance. Ce premier modèle a été amélioré en ajoutant un 3ème compartiment et en précisant les entités regroupées dans chaque compartiment. Le compartiment K représente les ARN, les compartiments G et R regroupent respectivement les protéines et la biomasse. Le turnover des composants K et G participe à la maintenance.

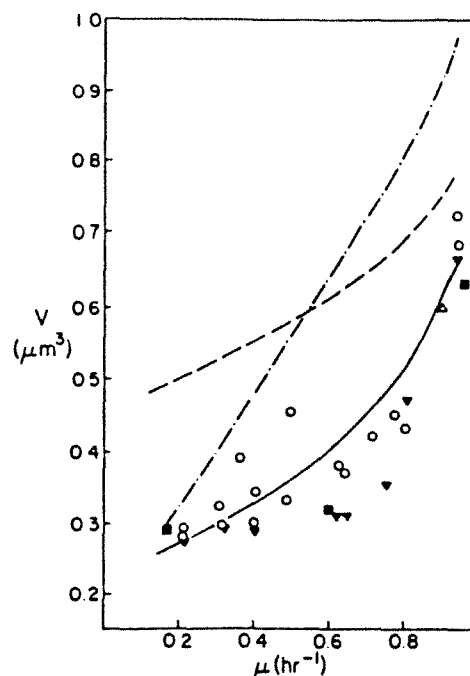
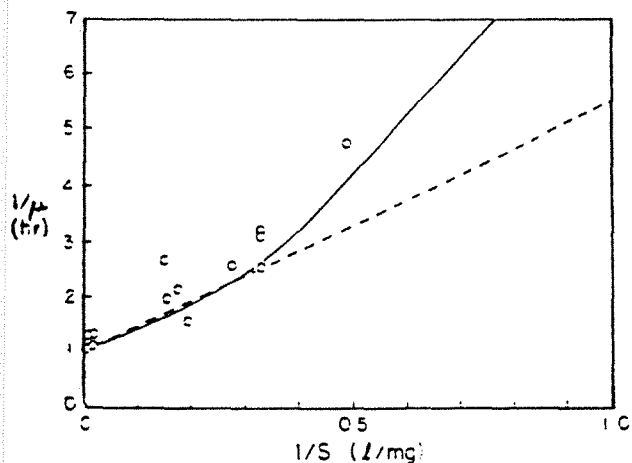
Ces modèles sont d'un point de vue mathématique relativement simples. Nous verrons plus loin une application de ce type de modèle aux bactéries recombinées. Cependant, ce type de modèle ne permet pas de rendre compte des voies métaboliques d'une cellule ni des contrôles qui s'exercent. Il faut pour cela rentrer plus précisément dans le métabolisme intracellulaire, c'est ce que les modèles dits physiologiques tentent de réaliser.

#### IV.1.3.2. - Modèles physiologiques

Le modèle structuré le plus utilisé pour *E. coli* est celui de SHULER et coll. (1979). La **figure A 23** schématise les différents pools de métabolites et de biopolymères qui sont inclus dans le modèle ainsi que les réactions qui se déroulent dans *E. coli* B/rA (lignes pleines). Les lignes en pointillés représentent les flux d'informations qui interfèrent sur les cinétiques des réactions. Ce modèle permet de simuler la croissance (la multiplication et le décès de la biomasse sont pris en compte) ainsi que la concentration en cellules vivantes. Ce modèle tient compte de la forme des cellules en fonction du taux de croissance, il simule l'initiation de la synthèse de l'ADN et les interactions entre les principaux métabolites (le modèle est détaillé dans l'article de SHULER et coll. 1979). Ainsi il permet de modéliser la forme et la taille des cellules, la composition macromoléculaire de la cellule et la croissance. La **figure A 24** montre que le taux de croissance, le contenu intracellulaire en glycogène et la taille des cellules calculés par le modèle sont en accord avec les résultats expérimentaux.

DOMACH et coll. (1984) ont complété ce modèle en ajoutant des données sur la synthèse de l'ARN et son contrôle ainsi que le contrôle de l'initiation de la réplication du chromosome. La confrontation entre les résultats expérimentaux et les valeurs théoriques fournies par ces deux modèles (**Fig. A 25 a et b**) met en évidence les améliorations apportées au modèle de SHULER.

SHU et SHULER (1989) ont aussi modifié le modèle original de *E. coli* afin de prévoir la réponse d'une cellule cultivée avec du glucose comme source de carbone et de la glutamine comme source d'azote. Ils ajoutent au modèle les différentes voies d'assimilation et de transformation de la glutamine. La glutamine est un acide aminé très important car il interagit avec le glutamate et les



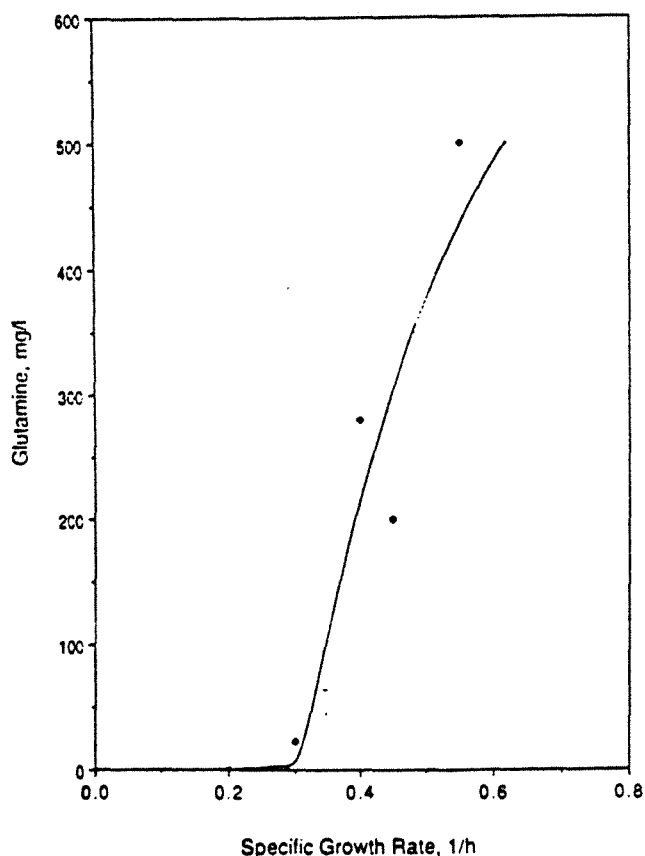
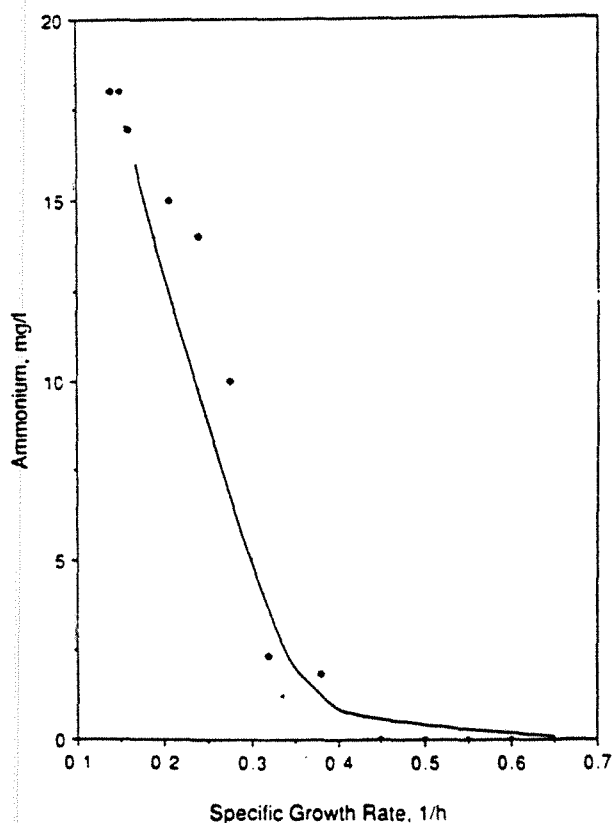
**Figure A 25 :** Application du modèle de DOMACH et coll. (1984) à la croissance de *E. coli* B/r A.

a - Variation du taux de croissance ( $\mu$ ) avec la concentration en substrat (S).

— : modèle de DOMACH et coll. (1984), - - - : modèle de MONOD,  $\circ$  : valeurs expérimentales.

b - Variation du volume intracellulaire en fonction du taux de croissance.

figurés : valeurs expérimentales, — : modèle de DOMACH et coll. (1984), - - - : modèle de SHULER et coll. (1979).



**Figure A 26 :** Comparaison entre les valeurs expérimentales et théoriques des concentrations résiduelles en ammonium (a) et en glutamine (b) en fonction du taux de croissance de *E. coli* cultivée en limitation de glucose et en excès de glutamine (SHU et SHULER, 1989).

◆ : valeurs expérimentales, — : prédiction du modèle.

transaminases et aussi parce qu'il peut être utilisé comme source de carbone par l'intermédiaire du cycle de Krebs. Les transaminases utilisent le glutamate comme réactif et lorsque la concentration en glucose est élevée, il agit comme un inhibiteur : le glutamate n'est plus assimilé comme source de carbone. Le modèle simule correctement les concentrations en glutamine en fonction du taux de croissance (Fig. A 26 a et b).

PERETTI et BAILEY (1986) complètent le modèle de SHULER en intégrant l'équilibre entre les différents sites de fixation de l'ARN-polymérase sur l'ADN. Il existe trois sites de fixation de l'ARN-polymérase :

- fixation spécifique du core de l'enzyme,
- fixation de l'holoenzyme sur le promoteur et
- fixation de l'holoenzyme sur des sites non promoteurs.

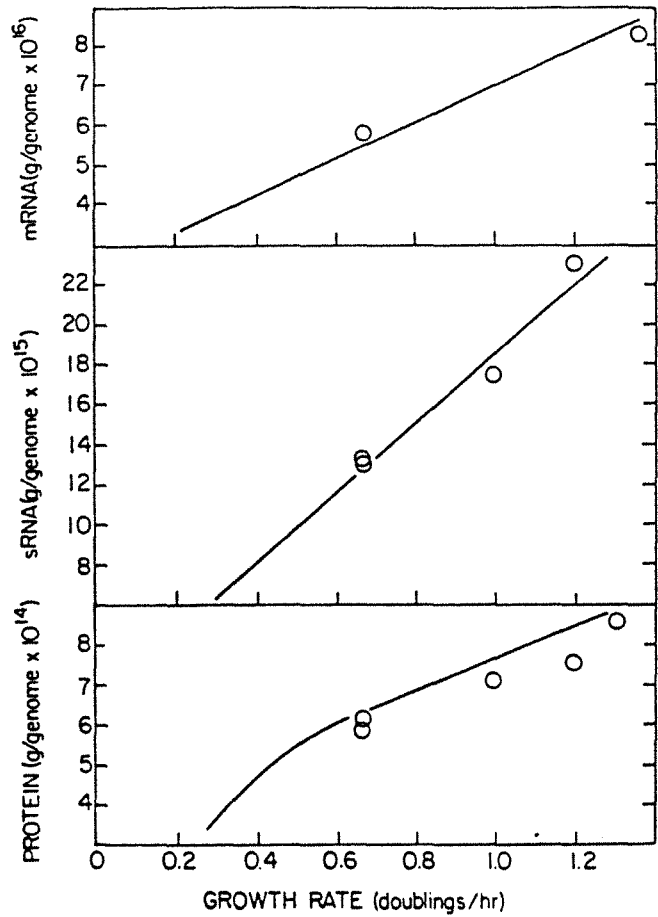
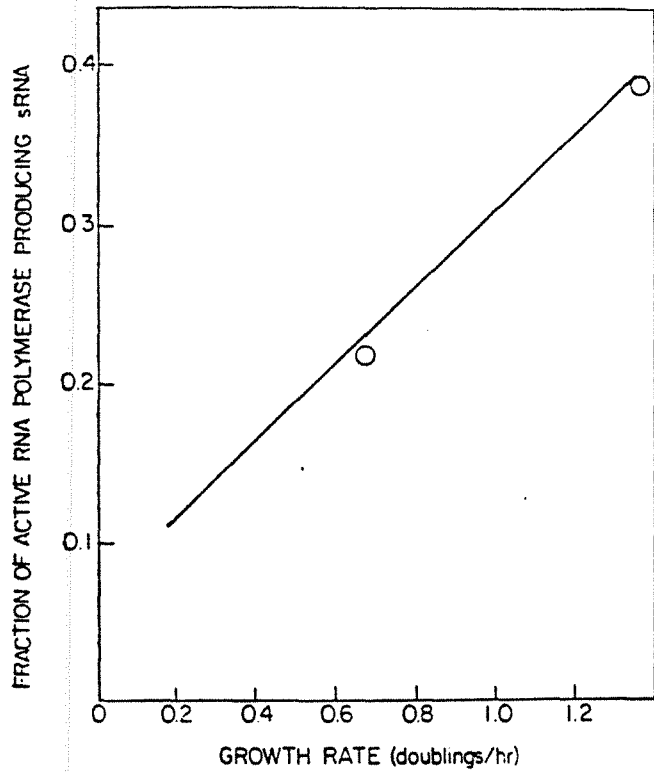
Le modèle possède les mêmes capacités de simulation que le modèle original et de plus il simule la fraction active de l'ARN-polymérase (Fig. A 27 a), la quantité de protéines intracellulaires, d'ARNm et d'ARNs (la fraction de ribosomes est directement proportionnelle à la quantité d'ARNs) (Fig. A 27 b).

PALSSON et JOSHI (1987) ont élaboré à partir du modèle de SHULER et coll. (1979) un modèle qui s'apparente à un modèle à compartiments. Ils ont simplifié le modèle original en regroupant les composants de façon à obtenir finalement 3 pools différents (Fig. A 28). Ce modèle ainsi simplifié est aussi performant que le modèle original (Fig. A 29, JOSHI et PALSSON, 1988). Ce modèle n'a pas été regroupé avec les modèles à compartiments car il est directement issu d'un modèle physiologique.

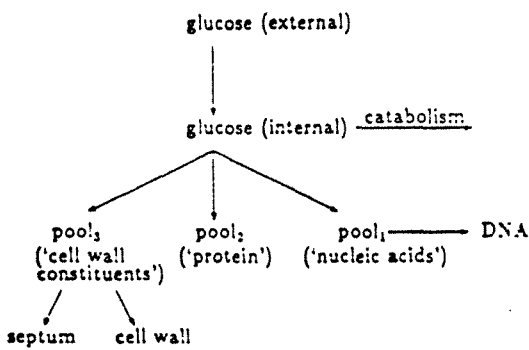
Les modèles physiologiques contiennent une masse importante d'informations sur *E. coli* et de ce fait sont très spécifiques à ce microorganisme. La confrontation des résultats expérimentaux et théoriques permet de confirmer ou non des hypothèses concernant le fonctionnement et la régulation de certaines voies métaboliques. Ces modèles sont des modèles de connaissance qui ne peuvent pas être utilisés dans le contrôle de procédés de fermentation. Mais ces types de modèles très sophistiqués peuvent être simplifiés pour aboutir à des modèles dont l'utilisation est beaucoup plus conviviale.

#### IV.2. - Modèles pour *E. coli* recombinée

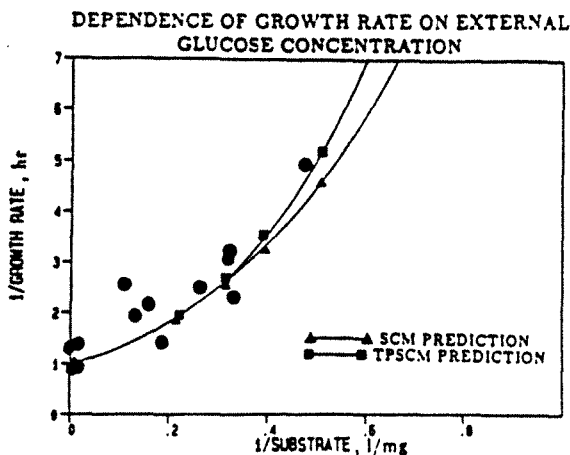
Ces modèles sont classés de la même façon que précédemment en modèles non structurés et structurés. Ces modèles sont aussi utilisés pour contrôler et optimiser les procédés de fermentation (modèles non structurés) mais aussi pour tester des hypothèses sur le comportement du couple hôte/vecteur, et notamment l'influence du plasmide sur le métabolisme de l'hôte ainsi que la



**Figure A 27 :** Application du modèle de PERETTI et BAILEY (1986) : prédiction de la fraction active de l'ARN polymérase (a), des concentrations intracellulaires en protéines, ARNs et ARNm (b).  
 ○ : valeurs expérimentales , — : valeurs théoriques.



**Figure A 28 :** Représentation schématique du modèle JOSHI et PALSSON (1988).



**Figure A 29 :** Comparaison entre les prédictions du modèle de SHULER et coll. (1979) et celui de JOSHI et PALSSON (1988) : valeurs théoriques et expérimentales de l'évolution du taux de croissance ( $\mu$ ) avec la concentration en substrat (S).  
 ● : valeurs expérimentales, ▲ ---- ▲ : prédictions du modèle de SHULER et coll. (1979), ■ ---- ■ : prédictions du modèle de JOSHI et PALSSON (1988)

stabilité du vecteur au cours de la culture (modèles structurés).

#### IV.2.1. - Modèles non structurés

OLLIS et CHANG (1982) ont construit un modèle pour décrire la croissance d'une souche de *E. coli* contenant un plasmide instable (en réacteur discontinu). Pour modéliser l'apparition des cellules sauvages ils utilisent le paramètre  $p$  qui représente pour une cellule la probabilité de perdre le phénotype conféré par le plasmide en une génération. La croissance des cellules recombinées ( $X^+$ ) et non recombinées ( $X^-$ ) est exprimée par une équation de MONOD modifiée par le facteur de probabilité :

$$\frac{dX^+}{dt} = \mu_m^+ \cdot X^+ \cdot \frac{S}{K + S} \cdot (1 - p)$$

$$\frac{dX^-}{dt} = \left( \mu_m^- \cdot X^- \cdot \frac{S}{K + S} \right) + \left( \mu_m^+ \cdot X^+ \cdot \frac{S}{K + S} \cdot p \right)$$

avec :

- $\mu_m^+$  et  $\mu_m^-$  sont les vitesses spécifiques maximum de croissance pour respectivement  $X^+$  et  $X^-$ .
- $K$  est la constante d'affinité pour le substrat  $S$  (les deux populations ont le même  $K$ ).

La production du produit  $P$  suit une loi de LUEDEKING-PIRET (1959) :

$$\frac{dP}{dt} = A \cdot X^+ + B \cdot \frac{dX^+}{dt}$$

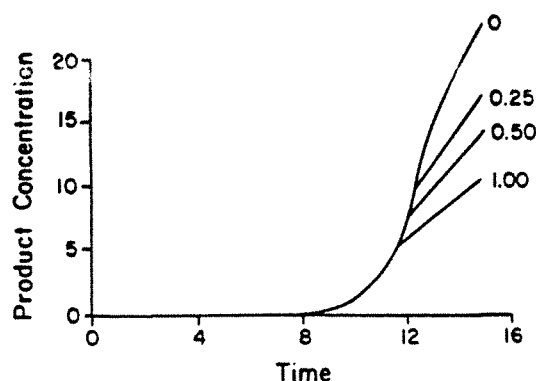
où  $A$  et  $B$  sont deux constantes.

La consommation du substrat  $S$  est proportionnelle à la croissance des cellules  $X^+$  et  $X^-$ .

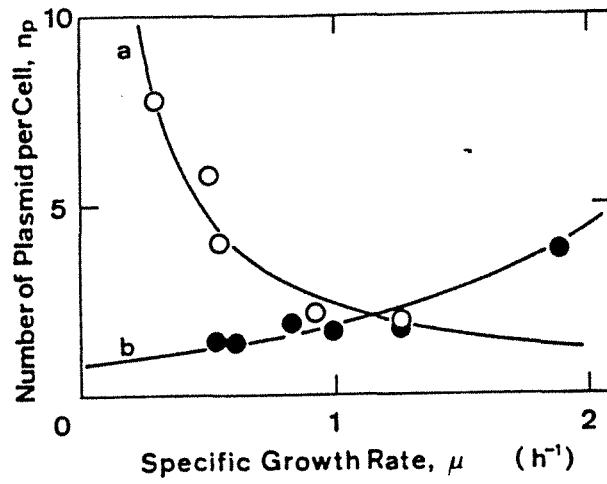
$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \cdot \left( \frac{dX^+}{dt} + \frac{dX^-}{dt} \right)$$

où  $Y$  est le rendement de conversion du substrat  $S$  en biomasse (les deux populations ont le même rendement).

Les simulations obtenues sont représentées sur la **figure A 30**, où  $X_0$  est le rapport  $X^- / X^+$  au moment de l'inoculation.



**Figure A 30 :** Influence de l'inoculation ( $X_0$ ) sur la formation du produit d'après le modèle de OLLIS et CHANG (1982).



**Figure A 31 :** Comparaisons entre les valeurs expérimentales (● et ○) et les prédictions du modèle (courbes en trait plein) de KOIZUMI et AIBA (1986) : évolution du nombre de copies de plasmides par cellule ( $n_p$ ) en fonction du taux de croissance ( $\mu$ ).

● : plasmide R1, ○ : plasmide F- $lac^+$

courbe a :  $n_p = k_0/\mu$ , courbe b :  $n_p = [k_1(e^{k_2\mu} - e^{k_3\mu})]/\mu$  et  $k_0, k_1, k_2$  et  $k_3$  : constantes

Ces résultats sont en accord avec la plupart des observations : un inoculum contenant une majorité de cellules recombinées permet d'obtenir une meilleure production du produit désiré.

KOIZUMI et AIBA (1986) ont construit un modèle afin de rendre compte de l'évolution globale du nombre de copies de plasmides par cellule, en fonction du taux de croissance de la cellule. Ils considèrent que la réplication du plasmide apparaît au hasard, soit encore qu'un plasmide peut se répliquer quel que soit le temps qui le sépare de sa précédente division. Le temps nécessaire est très inférieur au temps de doublement de la population.

Ces auteurs écrivent :

$$m_p^{i+1} - E(N_p) = \frac{1}{2} \cdot [m_p^i - E(N_p)]$$

avec :

- $m_p^i$  est le contenu plasmidique d'une cellule à la  $i^{\text{ème}}$  génération.
- $E(N_p)$  représente le nombre de réplifications attendues au cours d'une génération (entre  $i$  et  $i+1$ ).

Donc  $[m_p^{i+1} - E(N_p)]$  suit une loi géométrique de raison  $1/2$ . Lorsque le nombre de générations augmente,  $m_p$  tend vers  $E(N_p)$ , soit au bout d'un temps  $t$  fini, le nombre de copies de plasmides dans une cellule naissante tend vers le nombre de réplifications effectuées pendant une génération de la cellule hôte. Finalement ils obtiennent une relation entre le taux de croissance ( $\mu$ ) et le nombre de copies de plasmides par cellules ( $n_p$ ) :

$$n_p = \frac{\lambda}{\mu}$$

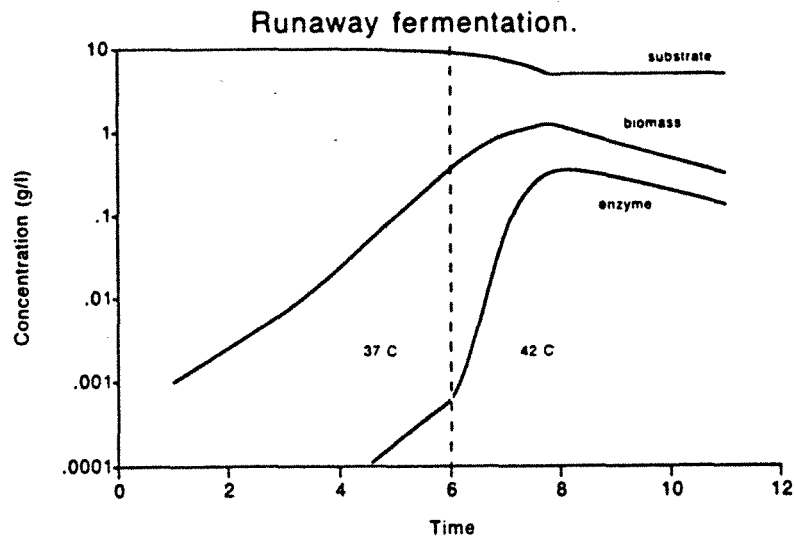
En utilisant différentes expressions pour  $\lambda$ , ce modèle permet d'envisager les différentes relations existant entre  $\mu$  et  $n_p$ .

Si  $\lambda$  est une constante alors  $n_p$  augmente lorsque  $\mu$  diminue.

Si  $\lambda$  est proportionnel à  $\mu$  alors  $n_p$  et  $\mu$  sont indépendants.

Si  $\lambda = f(\mu)$  alors  $n_p$  varie en fonction de  $\mu$ .

Par exemple pour *E. coli* contenant le plasmide  $\text{K1}$  ou  $F\text{-lac}^+$  les auteurs proposent comme fonction :  $\lambda = k_1 (e^{k_2\mu} - e^{k_3\mu})$  où  $k_1$ ,  $k_2$  et  $k_3$  sont des constantes ( $k_2 > k_3 > 0$ ). Dans ce cas,  $n_p$  augmente en même temps que  $\mu$ , les résultats théoriques sont en accord avec les données expérimentales (Fig. A 31). La fonction qui permet d'exprimer  $\lambda$  n'a pas de signification biologique.



**Figure A 32 :** Simulation par le modèle de NIELSEN et coll. (1989) d'une fermentation en culture discontinue de *E. coli* contenant un plasmide runaway : évolution des concentrations résiduelles en substrats (glucose limitant), biomasse et en produit (induction par la température à la 6ème heure de culture).



Les modèles non structurés sont simples à mettre en œuvre, et permettent de simuler des fermentations pour lesquelles les relations entre le vecteur et la cellule hôte ne sont pas primordiales (même rendement, même constante d'affinité ...). Les modèles structurés tentent d'expliquer ces liens biologiques.

#### IV.2.2. - Modèles structurés

Comme nous l'avons fait précédemment pour la modélisation de *E. coli*, nous commencerons la revue des modèles structurés par les modèles à compartiments.

##### IV.2.2.1. - Modèles à compartiments

NIELSEN et coll. (1989) ont élaboré un modèle à compartiments capable de décrire le comportement d'une souche de *E. coli* recombinée et notamment de la variation du nombre de copies de plasmides par cellule (plasmide runaway pOU140).

La cellule est divisée en 4 compartiments. Le compartiment K représente les ribosomes et tous les petits métabolites de la cellule. Le compartiment G regroupe le génome et les protéines associées à la croissance de la cellule. Le plasmide et les protéines associées à sa réplication et à son expression constituent le compartiment P. Les produits plasmidiques sont représentés par le compartiment E. Ce modèle n'a pas encore été confronté aux résultats expérimentaux mais il permet de simuler les phénomènes rencontrés chez une souche de *E. coli* recombinée. Par exemple, l'induction de la réplication du plasmide par une élévation de la température à 42°C entraîne une forte augmentation de la synthèse de l'enzyme (Fig. A 32). Mais après 1,5 h à 42°C, le nombre de copies de plasmides étant trop élevé, la cellule meurt (Fig. A 32). La diminution de la concentration en enzyme est due à sa dégradation (Fig. A 32).

Ce modèle permet de comprendre quelques interactions entre la cellule et le vecteur mais pour avoir plus de précision, il faut modéliser les réactions du métabolisme cellulaire, c'est-à-dire faire appel aux modèles physiologiques.

##### IV.2.2.2. - Modèles physiologiques

La compréhension des mécanismes de réplication, de transcription et de traduction des plasmides a permis d'élaborer des modèles structurés physiologiques qui tiennent même compte des facteurs cinétiques des processus génétiques.

$$\frac{d[\text{mRNA}]_R}{dt} = k_m [G] - k_{-m} [\text{mRNA}]_R - \mu [\text{mRNA}]_R$$

Initiator

$$\frac{d[\text{mRNA}]_I}{dt} = k_m \eta (1 - f) [G] - k_{-m} [\text{mRNA}]_I - \mu [\text{mRNA}]_I$$

Product

$$\frac{d[\text{mRNA}]_P}{dt} = k_m [G] - k_{-m} [\text{mRNA}]_P - \mu [\text{mRNA}]_P$$

Transcription efficiency

$$\eta = \frac{1 + d[R]}{1 + a[R] + b[R]^2 + c[R]^3}$$

Translation

Repressor

$$\frac{d[R]}{dt} = k_p [\text{mRNA}]_R - k_{-p} [R] - \mu [R]$$

Initiator

$$\frac{d[I]}{dt} = k_p [\text{mRNA}]_I - k_{-p} [I] - \mu [I]$$

Product

$$\frac{d[P]}{dt} = k_p [\text{mRNA}]_P - k_{-p} [P] - \mu [P]$$

Plasmid replication

Origin activation

$$\frac{d\theta}{dt} = k_m (1 - f) (1 - \theta) - \mu \theta$$

Replication complex formation

$$[\text{REP}] = \frac{\theta}{VN} \frac{e[I]}{1 + e[I]}$$

$$G(t) = G_0 + m$$

$$[G] = \frac{G}{VN}$$

Cell growth effects

Cell volume

$$\frac{dV}{dt} = \mu V$$

Tableau A 19 : Résumé des équations du modèle de LEE et BAILEY (1984).

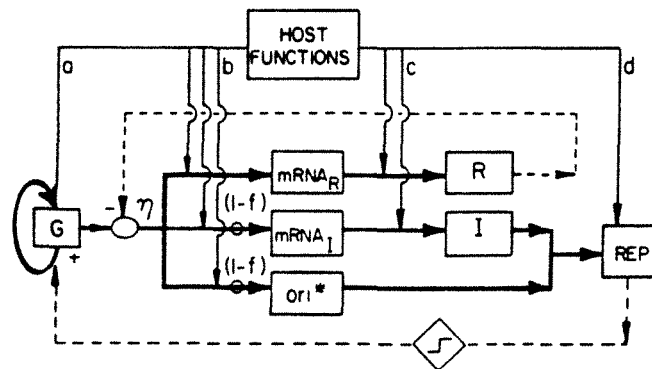


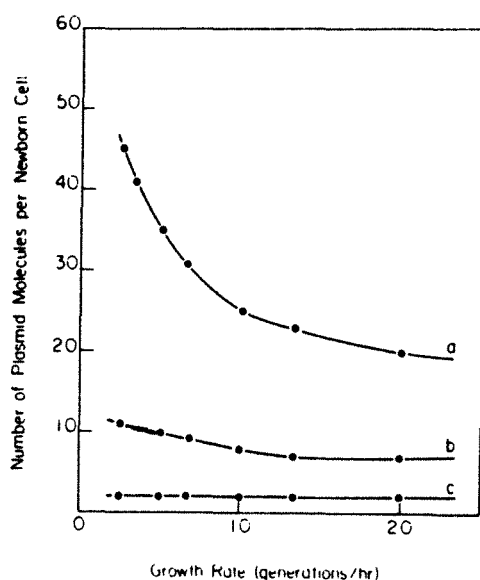
Figure A 33 : Représentation schématique de la replication du plasmide  $\lambda dV$  (LEE et BAILEY, 1984).

Les lignes pleines et épaisses représentent les informations provenant du plasmide. Les lignes pleines et fines représentent les informations provenant de la cellule hôte. Les lignes en pointillés schématisent les actions régulatrices des répresseurs (R) et de initiateurs (I).

Lignes a, b, c symbolisent respectivement la replication, la transcription et la traduction, la ligne d représente l'influence de la replication des protéines de la cellule hôte sur la formation du complexe d'initiation (REP).

$\eta$  : rendement de transcription,  $ori^*$  : origine de replication active G : nombre de plasmides par cellule

LEE et BAILEY (1984) proposent un modèle de croissance d'une souche de *E. coli* contenant le plasmide  $\lambda$ dV. Ce modèle est schématisé par la **figure A 33** et les équations sont rassemblées dans le **tableau A 19**. Ces équations décrivent la transcription du gène, la traduction de la protéine, la réplication du plasmide et le volume de la cellule. Des simulations sont réalisées pour décrire l'influence du taux de croissance sur l'accumulation de la protéine désirée. La **figure A 34** met en évidence une diminution du nombre de copies de plasmides lorsque le taux de croissance augmente (*E. coli* contenant le plasmide R1 *drd-19* produisant la  $\beta$ -lactamase).

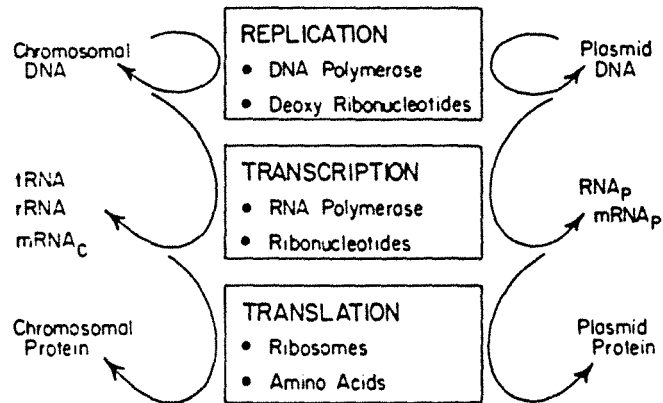


**Figure A 34 :** Influence du taux de croissance sur le nombre de copies de plasmides par cellule (LEE et BAILEY, 1984).  
 Pour les courbes a, b et c la constante de liaison du répresseur de la transcription du plasmide vaut respectivement  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  et  $2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ .

Ce modèle simule une diminution de la dépendance entre ces deux variables lorsque la constante de liaison du répresseur de la transcription du plasmide augmente (**Fig. 34**).

PERETTI et BAILEY (1987) reprennent le modèle qu'ils ont eux-mêmes adapté de celui de SHULER et coll. (1979) (PERETTI et BAILEY, 1986). Ils introduisent dans ce modèle la compétition entre le chromosome et le plasmide vis-à-vis des enzymes nécessaires à la réplication, la transcription et la traduction de l'ADN (**Fig. A 35**). Une fois qu'elle est initiée, la réplication du plasmide requiert le même arsenal enzymatique que la réplication de l'ADN chromosomique. Grâce à ce modèle que nous ne détaillons pas ici, les auteurs montrent que l'étape limitante dans l'expression des protéines hétérologues est la transcription et plus précisément la disponibilité de

l'ARN-polymérase. Ce modèle est une bonne illustration de l'utilité d'un modèle physiologique.



**Figure A 35 :** Représentation schématique de la compétition entre le chromosome et le plasmide vis-à-vis de la "machinerie" enzymatique de la cellule hôte.

#### IV.3. - Discussion

Nous constatons qu'il existe deux grandes tendances pour la modélisation. D'une part nous avons les modèles structurés, souvent complexes, fastidieux à appliquer et dont le rôle est de mieux comprendre le comportement d'un microorganisme. D'autre part, des modèles non structurés ont été élaborés, généralement plus simples et faciles à mettre en œuvre. Ce type de modèle peut être appliqué au contrôle et à l'optimisation des procédés de fermentation. Actuellement la stratégie est de reprendre des modèles physiologiques complexes qui permettent de comprendre et modéliser le nombre de copies de plasmides ainsi que les relations entre la cellule et le vecteur. Ayant acquis les informations importantes, il est alors possible de simplifier le modèle en ne conservant que les phénomènes essentiels.

Cependant, nous constatons qu'il n'existe pas dans la littérature de modèle non structuré de la croissance de *E. coli* cultivée sur un milieu complexe. Or de tels milieux sont généralement utilisés industriellement et qui plus est pour les microorganismes recombinés. Il est évident que les modèles structurés ne s'adressent qu'à des cultures sur milieux synthétiques. Seuls les modèles cybernétiques envisagent de modéliser le comportement des microorganismes sur un milieu complexe en considérant tous les substrats c'est-à-dire en n'assimilant pas ce type de milieu à un milieu synthétique.

*PARTIE B*

---

*MATERIEL ET METHODES*

---



**PARTIE B : MATERIEL ET METHODES**

<b>I - Présentation de la souche et du vecteur</b>	p 76
<b>I.1. - <u>Présentation de la souche</u></b>	p 76
<b>I.2. - <u>Présentation du vecteur</u></b>	p 77
<b>II - Réactifs</b>	p 78
<b>II.1. - <u>Milieu de préculture</u></b>	p 78
<b>II.2. - <u>Milieu de l'inoculum</u></b>	p 78
<b>II.3. - <u>Milieu de production</u></b>	p 78
<b>II.4. - <u>Milieus d'alimentation</u></b>	p 79
<b>II.5. - <u>Milieus gélosés</u></b>	p 79
<b>III - Stérilisation</b>	p 79
<b>IV - Appareils</b>	p 80
<b>V - Conduite des fermentations</b>	p 82
<b>V.1. - <u>Conservation des souches</u></b>	p 82
<b>V.2. - <u>Préculture</u></b>	p 82
<b>V.3. - <u>Inoculum</u></b>	p 82
<b>V.4. - <u>Culture</u></b>	p 82
<b>V.4.1. - <i>Descriptif des fermenteurs</i></b>	p 84
<b>V.4.2. - <i>Protocole des fermentations en discontinu</i></b>	p 84
<b>V.4.3. - <i>Protocole des fermentations en semi-continu</i></b>	p 84

<i>V.4.4. - Protocole des fermentations en continu</i>	p 84
<b>VI - Méthodes d'analyse</b>	p 86
<b>VI.1. - <u>Evaluation de la biomasse</u></b>	p 86
<b>VI.2. - <u>Analyse du milieu de culture</u></b>	p 86
<i>VI.2.1. - Dosage du glucose</i>	p 86
<i>VI.2.2. - Dosage des acides organiques et de l'éthanol</i>	p 87
<i>VI.2.3. - Dosage de l'acide phénylacétique</i>	p 88
<i>VI.2.4. - Dosage des ions ammonium</i>	p 88
<i>VI.2.5. - Dosage de la peptone</i>	p 89
<b>VI.3. - <u>Dosage enzymatique de la pénicilline acylase</u></b>	p 90
<b>VI.4. - <u>Stabilité du plasmide</u></b>	p 93
<i>VI.4.1. - Dénombrement des cellules recombinées</i>	p 93
<i>VI.4.2. - Evaluation de la probabilité de perte d'un plasmide     et de l'avantage de croissance des cellules sauvages</i>	p 94
<b>VI.5. - <u>Gels de protéines</u></b>	p 96
<b>VII - Exploitation des données expérimentales</b>	p 98
<b>VII.1. - <u>Définition des paramètres cinétiques</u></b>	p 98
<b>VII.2. - <u>Evaluation des paramètres cinétiques</u></b>	p 99
<i>VII.2.1. - En fermentation discontinue</i>	p 99
<i>VII.2.2. - En fermentation semi-continue</i>	p 99
<i>VII.2.3. - En fermentation continue</i>	p 100
<b>VII.3. - <u>Modélisation</u></b>	p 100



## PARTIE B : MATERIELS ET METHODES

### I - Présentation de la souche et du vecteur

#### I.1. - Présentation de la souche

La souche nous a été fournie par la société Rhône-Poulenc. La figure B 1 montre comment les souches sur lesquelles nous travaillons ont été obtenues.

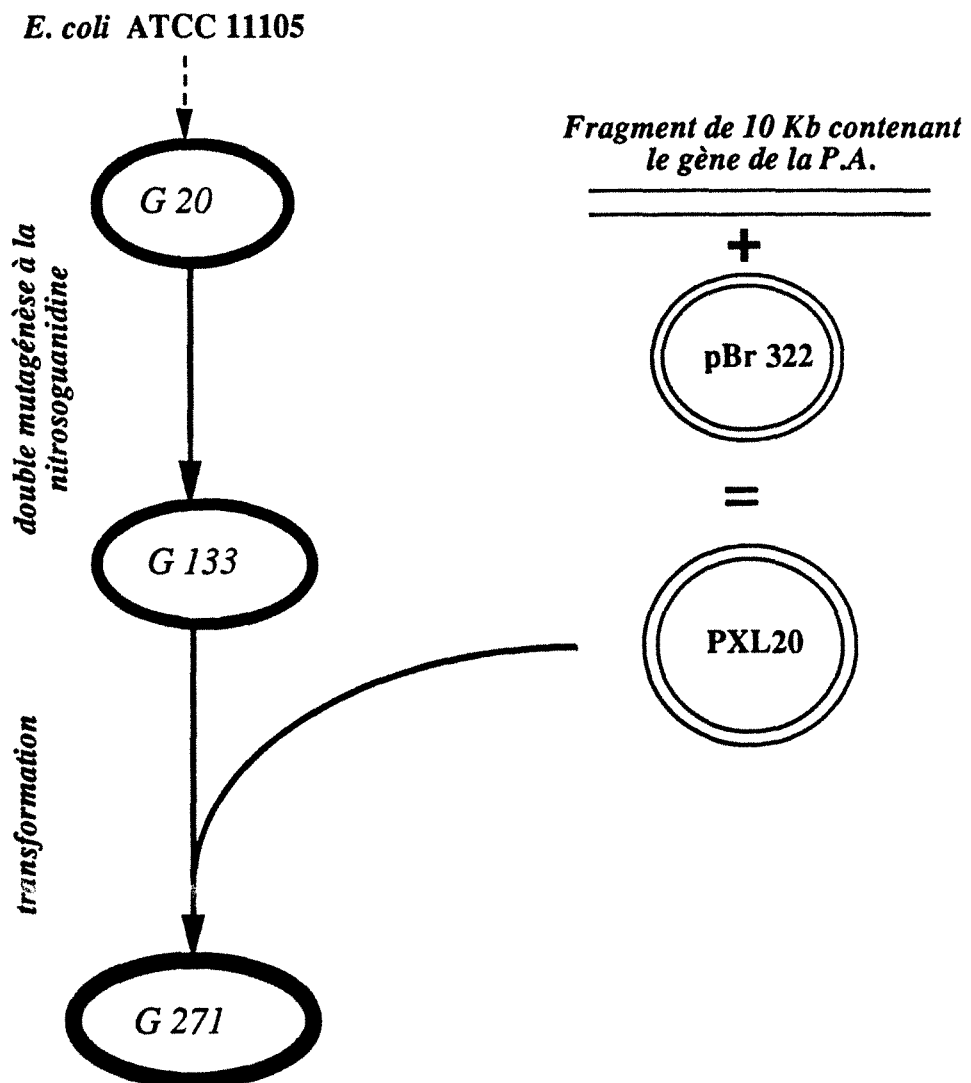


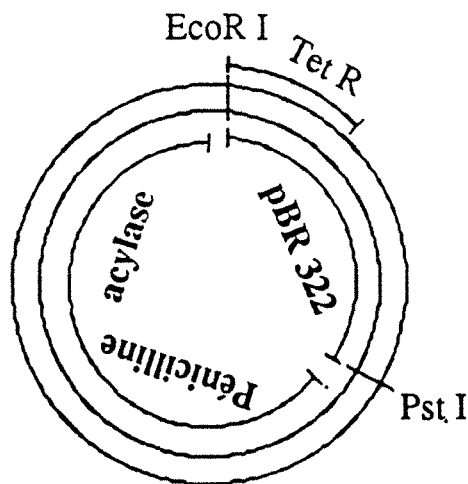
Figure B 1 : Filiation des souches : obtention de la souche d'*E. coli* G271

Les caractéristiques annoncées des différentes souches sont les suivantes :

- G20 :** - ATCC 1105, souche mère productrice de PA  
 - souche surproductrice, qui porte le gène de la PA dans l'ADN chromosomique, elle a été sélectionnée par mutagénèse (nitrosoguanidine).  
 - la production de PA est induite par l'APA et inhibée par le glucose et la température (pas de production si la température est supérieure à 28°C)
- G118 :** - mutant nitrosoguanidine de la souche G20  
 - elle serait résistante à l'effet inhibiteur de la température
- G133 :** - double mutagénèse à la nitrosoguanidine de la souche G20  
 - elle serait résistante à l'effet inhibiteur du glucose et de la température  
 - elle produit autant de PA que la souche G20
- G271 :** - souche G133 contenant le plasmide pXL20 (cf § suivant)  
 - mêmes caractères que la souche G133  
 - résistante à la tétracycline.

### *1.2. - Présentation du vecteur*

Le plasmide utilisé est le plasmide pXL20, il est représenté sur la **figure B 2**. Il a été construit par GENETICA à partir du plasmide pBR 322. Il comprend la partie EcoR1 - Pst1 du plasmide pBR322 et un fragment de 10 kb contenant le gène de la PA (**Fig. B 2**). Il porte le gène de la résistance à la tétracycline (**Fig. B 2**).



**Figure B 2 :** Construction du plasmide pXL20

## II - Réactifs

### II.1. - Milieu de préculture :

Le milieu utilisé est le Luria Broth (LB) dont la composition est la suivante (pour un litre de milieu) :

- Bactotryptone (DIFCO)	5 g
- Extrait de levure (AES LABORATORY)	10 g
- NaCl (FLUKA)	5 g
- H <sub>2</sub> O distillée	qsp 1 litre

Le pH est ajusté à 7.5 avec de la soude (FLUKA) 1N.

### II.2. Milieu de l'inoculum

La composition du milieu de l'inoculum (CS) est la suivante (pour un litre de milieu) :

- Corn steep atomisé (ROQUETTE)	20 g
- Acide phénylacétique (MERCK)	2 g
- Glucose (PROLABO)	20 g
- H <sub>2</sub> O distillée	qsp 1 l

Ce milieu (CS) est ajusté à pH 7 avec de l'hydroxyde de potassium (FLUKA) 1N.

### II.3. - Milieu de production

Le milieu de production (milieu "peptone") a une composition suivante (pour un litre de milieu) :

- Universal peptone MGG (MERCK)	20 g
- NaCl (FLUKA)	5 g
- APA (MERCK)	2 g
- Glucose (PROLABO)	5 g
- Polypropylène glycol P2000 (FLUKA)	0,5 ml
- H <sub>2</sub> O distillée	qsp 1 litre

Ce milieu (peptone) est ajusté à pH 7 avec de l'hydroxyde de potassium (FLUKA) 1N.

Le polypropylène glycol est utilisé comme agent antimousse.

#### II.4. - Milieux d'alimentation

Pour les fermentations semi-continues :

Le milieu d'alimentation est variable d'une fermentation à l'autre, il contient du glucose, du sulfate d'ammonium (FLUKA) et de l'APA. Les concentrations précises seront données dans la partie résultat lorsque nous exploiterons ces fermentations.

Pour les fermentations continues :

Nous utilisons comme milieu d'alimentation, le même que le milieu peptone, dont nous avons donné la composition précédemment. Dans ce milieu nous faisons toutefois varier les concentrations en glucose et peptone.

#### II.5. - Milieux gélosés

Nous utilisons des milieux gélosés (milieux LB, CS et peptone) en boîtes de Pétri. Dans ce cas nous ajoutons aux milieux 15 g/l d'agar-agar (SERVA). Lorsque c'est nécessaire nous ajoutons de la tétracycline (SERVA) à raison de 10 mg/l. Les milieux contenant de l'antibiotique comportent dans leur dénomination la lettre T. Par exemple, une boîte de Pétri contenant un milieu avec du corn steep, de l'APA et de la tétracycline ou un milieu Luria Broth et tétracycline sera nommée respectivement CS + APA + T et LB + T.

### III - Stérilisation

C'est une opération indispensable qui permet d'obtenir des milieux dépourvus de tout organisme vivant.

Suivant le milieu à stériliser nous faisons varier le temps et la pression :

- milieu LB : 50 min, 0,7 bar (115°C)
- milieu CS : 50 min, 1 bar (120°C)
- milieu peptone : 30 min, 1 bar (120°C)

- Le glucose est stérilisé pendant 15 min à 1 bar séparément des autres composants du milieu afin d'éviter les réactions de brunissement enzymatique qui entraînent la formation de radicaux libres qui vont inhiber la croissance.

- La tétracycline n'est pas stérilisée elle est ajoutée au milieu stérilement en poudre.

- Lorsque nous avons besoin d'ajouter stérilement un produit en cours de fermentation nous utilisons des filtres MILLEX-GS (0,2 µm).

La stérilisation est une opération très importante et afin d'obtenir des milieux de culture dans le même état, nous avons respecté au mieux les barèmes de stérilisation.

#### IV - Appareils

- fermenteurs 2 l SGI et BIOLAFITTE avec leurs systèmes d'agitation, de régulation de la température et du pH.
- fermenteur 20 l BIOLAFITTE avec son système de régulation de la température, du pH et de l'oxygène.
- sondes pH et oxygène INGOLD (stérilisables)
- pompes péristaltiques ISMATEC
- pH-mètre CORNING (ION ANALYSER 250)
- étuve bactériologique (MEMMERT B30)
- balance PRECISA 1000 - 3000 D
- balance de précision METTLER AE 240
- centrifugeuse JOUAN M 14-11
- centrifugeuse SIGMA BIOBLOCK SCIENTIFIC 2MK\*
- sonicateur MSE, CROWLEY, SUSSEX (England)\*
- spectrophotomètre CARY 2000 VARIAN \*
- spectrophotomètre LKB (BIOCHROM NOVASPEC 4049)
- spectrophotomètre BAUSH et LOMB (SPECTRONIC 21)
- microscope OLYMPUS BH-2
- chromatographe phase gazeuse FID (INTERSMAT IGC 121 FC)
- enregistreur intégrateur (INTERSMAT ICR 1B)
- sonde à ammonium ORION
- autoanalyseur TECHNICON II
- bandelettes réactives (pour le glucose) KETO-DIASTIX
- hotte à flux vertical (S.I.B.M. PLASTEC)
- minéralisation KJELDALTHERM GERHARDT\*\*
- Vapodest 4 S GERHARDT\*\*
- pH mètre METROH M HERISAU (E 300 B)\*\*
- multidosimat 645 METROHM HERISAU\*\*
- impulsomat METROHM HERISAU\*\*
- HPLC WATER M600A
- colonne POLYPORE BROWNLEE
- enregistreur ENICA 21 (DELSI)
- analyseur de lactate MICROZYM-L SGI

\* : appareils utilisés pour le dosage enzymatique.

\*\* : appareils utilisés pour le dosage de l'azote.

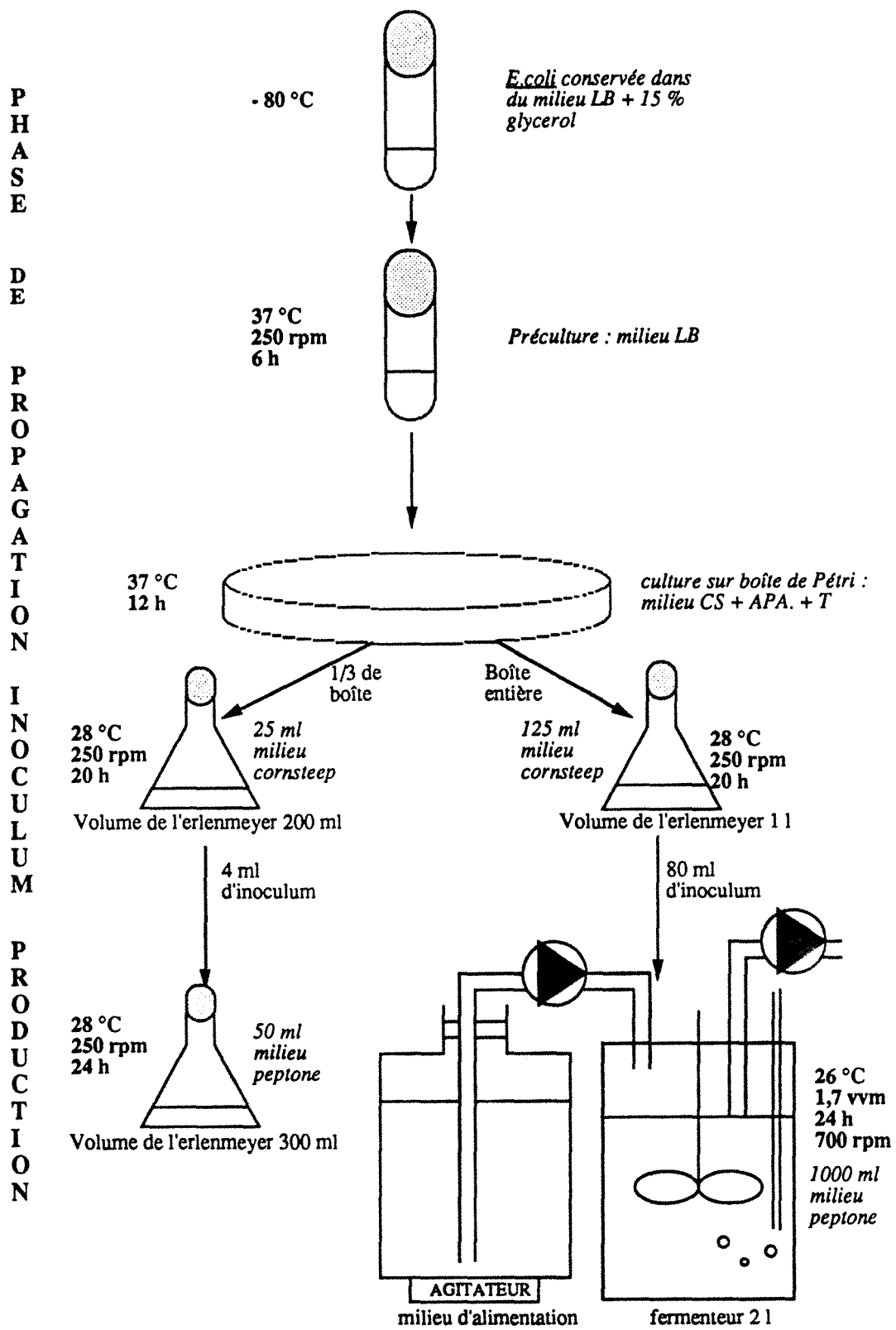


Figure B3 : Les différentes étapes de propagation de la souche *E. coli* G271

## V - Conduite des fermentations

La **figure B 3** permet de récapituler toutes les étapes de la propagation de la culture qui sont détaillées dans ce paragraphe.

### V.1. - Conservation des souches

Les différentes souches sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du milieu LB avec 15 % de glycérol (**Fig. B 3**). Les souches sont obtenues à partir d'un isolement sur boîte de Pétri contenant un milieu gélosé LB avec lorsque c'est nécessaire de la tétracycline comme pression de sélection.

### V.2. - Préculture

Nous transférons stérilement des cellules encore congelées dans un tube à essai contenant du LB stérile (5 ml). Cette phase d'enrichissement dure 6h à  $37^{\circ}\text{C}$  (**Fig. B 3**).

### V.3. - Inoculum

Cette étape (mise au point au LEGG) se fait en trois temps (**Fig. B 3**) :

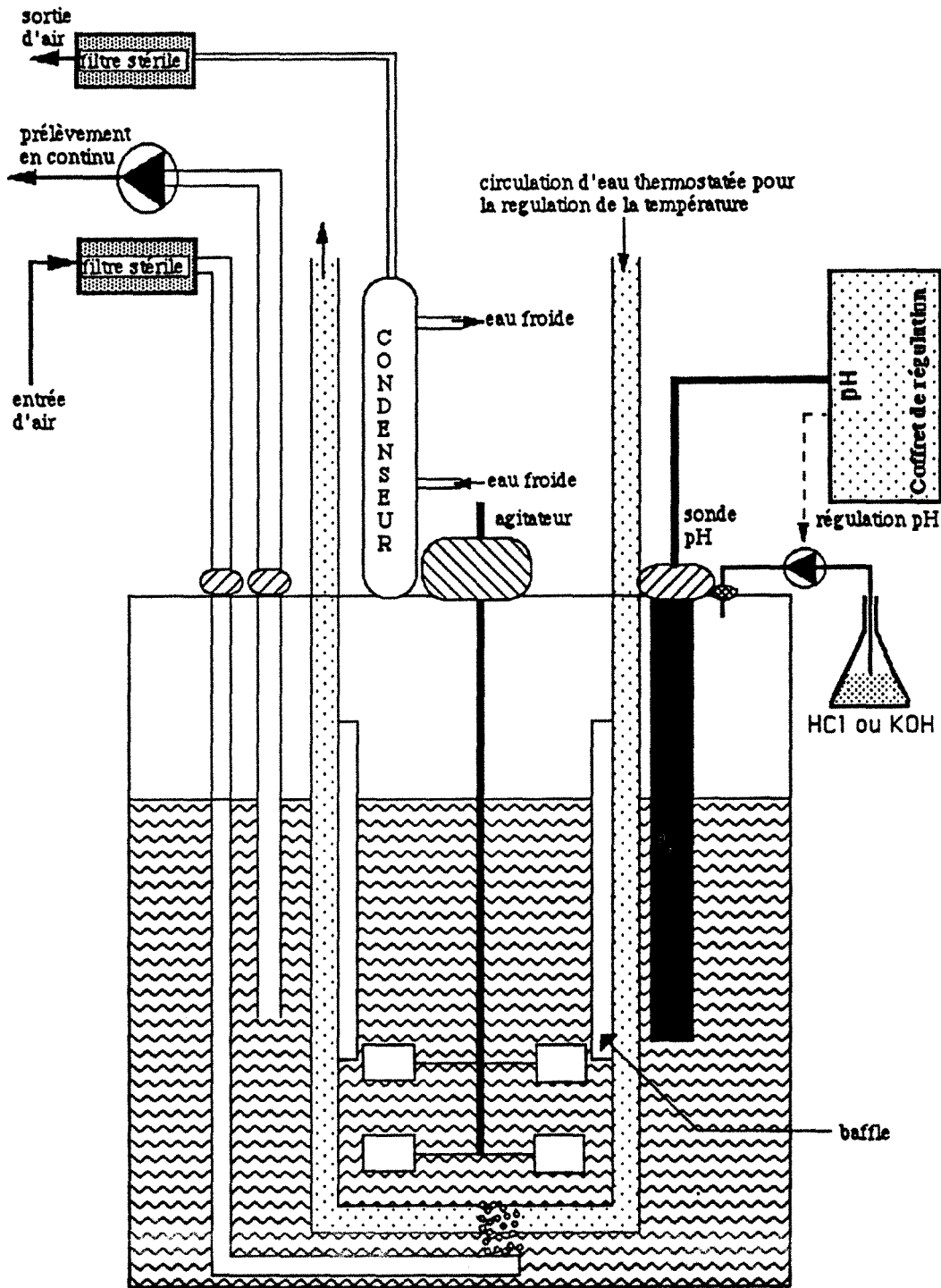
i - 100 ml de la préculture sont étalés sur une boîte de CS + APA + T qui est ensuite mise à incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 12 h, le but étant d'obtenir un tapis cellulaire.

ii - la boîte est ensuite "lavée" avec du milieu LB stérile de façon à récupérer les cellules. Elles sont ensuite transférées dans une éprouvette stérile afin de pouvoir ajuster la quantité qui sera prélevée pour ensemercer l'inoculum contenu dans un erlenmeyer (CS + APA).

iii - le milieu CS + APA étant ensemercé, l'erlenmeyer est mis à incuber dans une chambre thermostatée à  $28^{\circ}\text{C}$  pendant 20h sur une table d'agitation (250 RPM).

### V.4. - Culture

La culture peut être réalisée en erlenmeyer ou en fermenteur. La **figure B 3** décrit le protocole suivi pour la culture en fiole, nous allons détailler la mise en oeuvre d'une culture en réacteur.



**Figure B 4** : Schéma d'un fermenteur BIOLAFFITE (21)



#### *V.4.1. - Descriptif des fermenteurs*

Les figures B 4 et B 5 décrivent les 2 types de fermenteurs utilisés 2 l et 20 l.

La figure B 4 décrit un fermenteur BIOLAFITTE. La différence avec un réacteur SGI réside surtout dans le mode de régulation de la température. Pour ce dernier réacteur la régulation se fait par l'intermédiaire d'une sonde de température qui d'après la valeur du point de consigne, soit met en route une canne chauffante, soit ouvre une électrovanne pour refroidir le milieu. Cette régulation est plus précise et plus souple d'utilisation que le système de bain-marie BIOLAFITTE.

#### *V.4.2. - Protocole des fermentations en discontinu*

Le volume initial est fixé à 1 l ou 10 l (Fig. B 5). L'ensemencement est effectué à partir l'inoculum en début de phase stationnaire (80 ml ou 800 ml). Les prélèvements sont effectués en cours de fermentation, la densité optique est immédiatement lue, le reste de l'échantillon est filtré (membrane SARTORIUS 0,2  $\mu\text{m}$ ) voire préalablement centrifugé 15 min ( $9,7 \cdot 10^3$  g) lorsque la concentration cellulaire dépasse 3 g/l. Le filtrat est utilisé pour réaliser les différents dosages. La fermentation dure en général 24 h mais sa durée peut être modifiée en fonction de l'objectif.

#### *IV.4.3. - Protocole des fermentations en semi-continu*

La mise en œuvre des fermentations semi-continues est semblable à celle des fermentations discontinues. Suivant l'évolution de la croissance et donc des concentrations en substrats dans le fermenteur, soit certains nutriments sont ajoutés ponctuellement à une concentration connue, soit une pompe est mise en route de façon à avoir une alimentation continue. Dans ce dernier cas, le débit de la pompe peut être modifié en cours de fermentation.

#### *I.4.4. - Protocole des fermentations en continu*

Après avoir obtenue une biomasse suffisante, nous mettons en route la pompe d'alimentation et de soutirage. Le volume du réacteur est maintenu constant grâce à une canule de soutirage. Le débit et la composition du milieu d'alimentation peuvent varier d'une fermentation à l'autre.

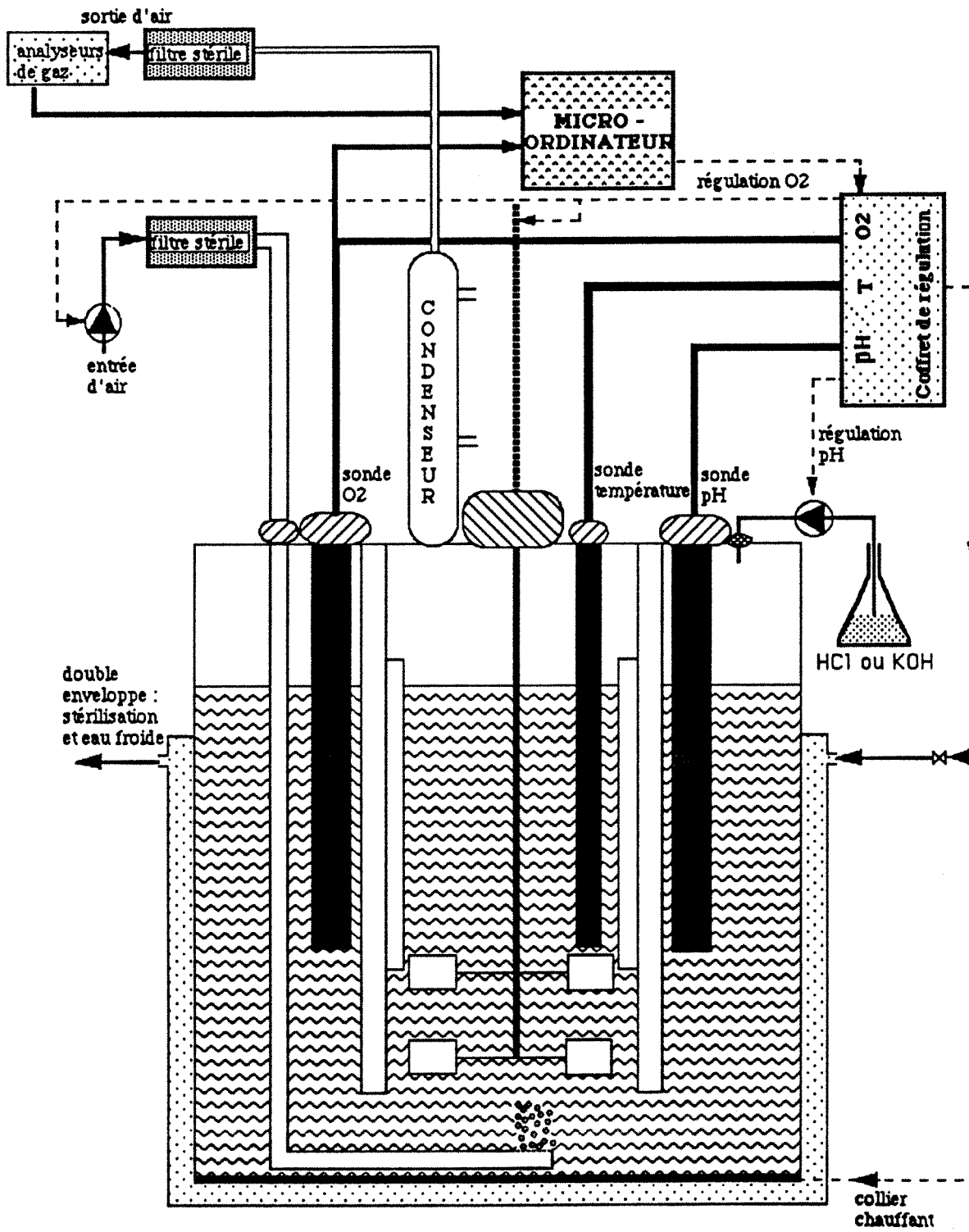


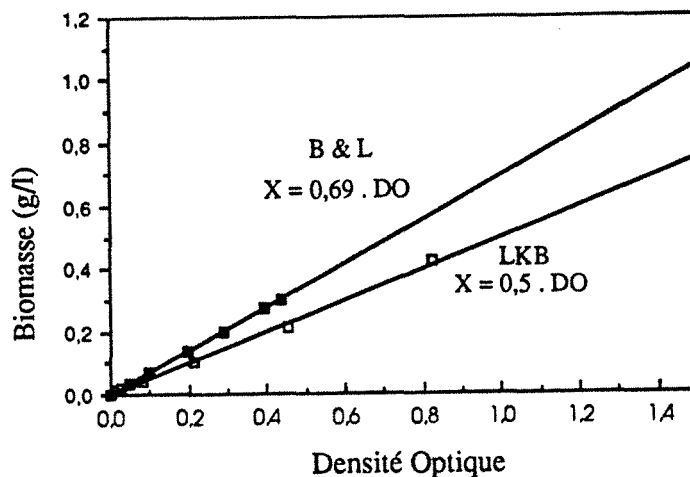
Figure B 5 : Schéma d'un fermenteur BIOLAFFITE (20 l)

## VI - Méthodes d'analyse

### VI.1. - Evaluation de la biomasse

Elle s'effectue grâce à un spectrophotomètre par lecture de la densité optique (DO) à 660 nm. Celle-ci suit une loi de Beer-Lambert pour des solutions diluées. Nous établissons pour chaque spectrophotomètre utilisé (à cause de leur évolution) une corrélation entre les unités DO et la concentration en bactéries donnée en gramme de poids sec par litre (**Fig. B 6**). Lorsque nous ne sommes pas dans la zone de linéarité c'est-à-dire une DO supérieure à 0,4 pour le Bausch & Lomb et 0,8 pour le LKB, nous diluons notre échantillon de façon à obtenir une DO convenable.

Erreur = 5 %



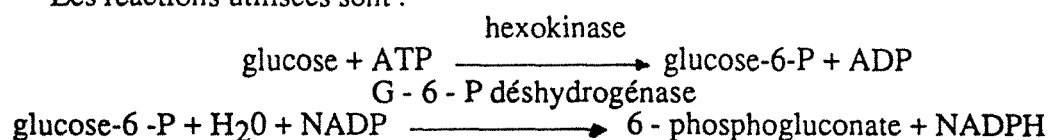
**Figure B 6 :** Courbes d'étalonnage pour les deux spectromètres : densité optique (D.O.) en fonction de la biomasse (poids sec).

### VI.2. - Analyse du milieu de culture

#### VI.2.1. - *Dosage du glucose*

Ce dosage est effectué sur le filtrat obtenu à partir de l'échantillon prélevé. Il est réalisé sur l'autoanalyseur TECHNICON II. Le réactif utilisé contient de l'hexokinase, de l'ATP, du NADP et du glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Les réactions utilisées sont :



L'apparition du NADPH est suivie en mesurant l'absorbance à 340 nm. La quantité de NADPH libérée est proportionnelle à la quantité de glucose initiale pour des concentrations comprises entre 0,1 et 5 g/l. Lorsque la concentration en glucose de l'échantillon est trop forte il est dilué.

Erreur : 10 %

### VI.2.2. - Dosage des acides organiques et de l'éthanol

Les acides organiques et l'éthanol produits au cours de la fermentation sont dosés par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse à FID. Le gaz vecteur est l'azote (pression d'entrée 3 bars, 180°C). La colonne en verre pyrex (2 mm de diamètre et 2 m de long) est remplie de PORAPAK Q 80-100 mesh. La température de l'injecteur et du détecteur est de 220°C, la température du four est à 180°C. Nous utilisons la méthode de l'étalon interne (méthanol). Nous ajoutons donc à l'échantillon du méthanol ainsi que de l'acide chlorhydrique 6N de façon à diminuer le pH et ainsi obtenir les acides sous forme moléculaire. Une solution est utilisée pour étalonner le chromatographe, elle contient les produits à doser à des concentrations connues (étalon externe) à laquelle est ajouté l'étalon interne.

Erreur : 10 %

Le lactate est dosé par la sonde SGI. Le lactate diffuse au travers de la membrane, il est transformé en pyruvate grâce à la lactate déshydrogénase, immobilisée sur une électrode de platine. Cette méthode est utilisée pour mesurer des concentrations en lactate comprise entre 0,1 et 5 mM (0,01 à 0,45 g/l). Si la concentration est trop forte, l'échantillon est dilué avec du tampon phosphate hexocyanate de potassium (pH = 7,2)

Erreur : 5 %

### VI. 2.3. - Dosage de l'acide phénylacétique

L'acide phénylacétique est dosé par chromatographie liquide haute pression. L'éluant utilisé est l'acide sulfurique 0,04 N. La colonne (polypore H. BROWNLEE) est à 65°C et le débit est à 0,9 ml/min. L'analyse se fait à 210 nm. L'appareil est calibré entre 0 et 2 g/l et les échantillons sont dilués de façon à se situer dans ce domaine de concentration. Pour ce dosage, nous utilisons la méthode de l'étalon externe.

Erreur : 5 %

### VI.2.4. - Ions ammonium

Les ions ammonium sont dosés par l'électrode ORION qui utilise une membrane hydrophobe perméable aux gaz, afin de séparer l'échantillon et l'électrolyte. Du NaOH 0,2 N est ajouté afin de transformer tous les ions ammonium en ammoniac. L'ammoniac traverse la membrane et réagit avec l'eau de l'électrolyte pour former des ions  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{OH}^-$ .



L'électrolyte contient du chlorure d'ammonium à une concentration telle que la concentration en ions ammonium est considérée constante. De ce fait la quantité d'ions  $\text{OH}^-$  formée est proportionnelle à la concentration en  $\text{NH}_3$ . Ceci entraîne une variation de potentiel (E) de l'électrode suivant une loi de NERNST :

$$E = E_0 - S \log [\text{OH}^-] \quad E_0 = \text{potentiel de référence}$$

$$E = \text{potentiel de l'électrode}$$

$$S = \text{pente de l'électrode}$$

(S est constante si la température est constante)

La variation du potentiel est proportionnelle au logarithme de la concentration en ions ammonium de notre échantillon. La sonde est étalonnée avec des solutions de concentrations connues en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Fig. B 7). La réponse de la sonde est donnée en mM. La masse molaire de  $\text{NH}_4^+$  est 18 g par mole.

Erreur : 10 %

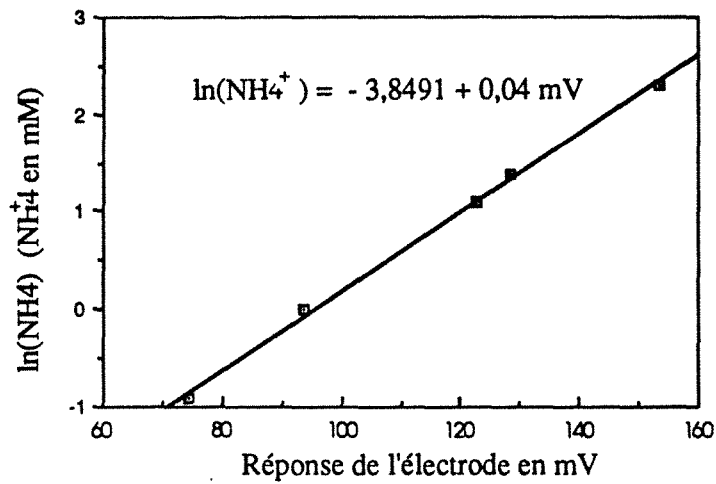
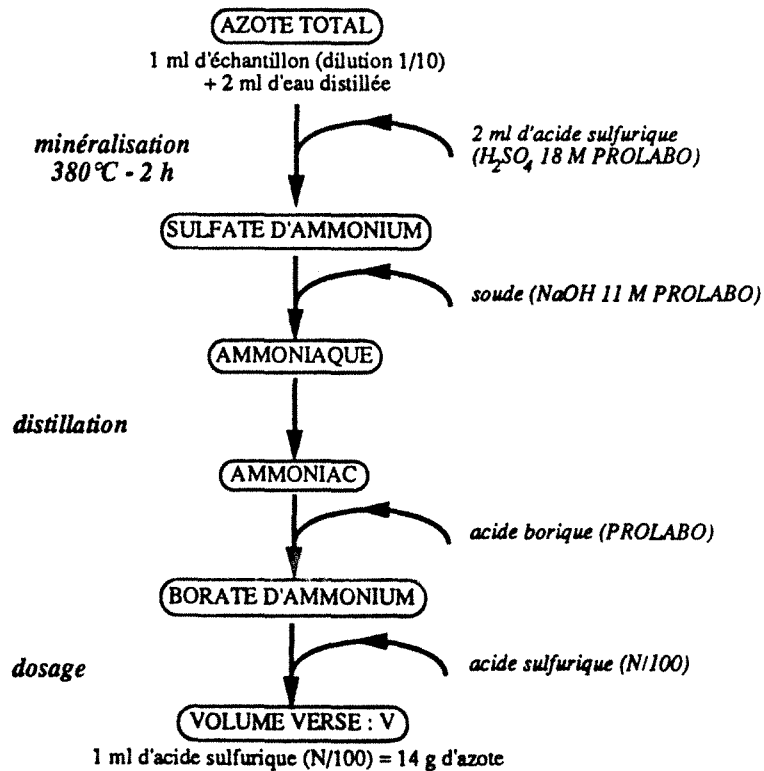


Figure B 7 : Etalonnage de la sonde à ammonium

### VI.2.5. - Dosage de la peptone

La méthode de KJELDAHL est utilisée pour doser l'azote totale.  
Le dosage se fait de la façon suivante :



La courbe d'étalonnage est établie à chaque fois entre le volume d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  N/100) versé et la quantité de peptone (Fig. B 8). Nous évaluons aussi la quantité d'azote du milieu. La seule source d'azote présente dans le milieu étant la peptone, nous suivons ainsi la consommation de la peptone au cours de la fermentation.

Erreur : 15 %

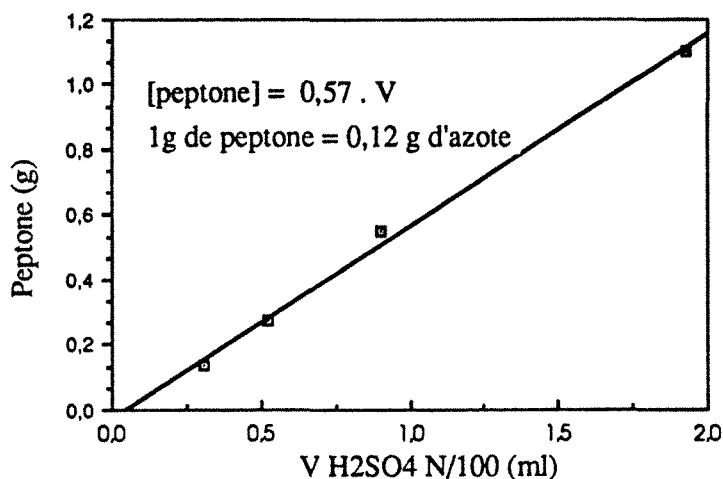


Figure B 8 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de la peptone, relation entre le volume d'acide sulfurique versé (V H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et la quantité de peptone.

### VI .3. Dosage enzymatique de la pénicilline acylase

#### ➤ *Préparation de l'échantillon :*

Un échantillon de 1 ml est prélevé et ensuite centrifugé (15 mn à 15000 RPM) afin de séparer le surnageant et les cellules. Le dosage de l'enzyme est effectué sur ces deux fractions. Les cellules sont mises en suspension dans un tampon phosphate  $10^{-2}$  M dont la composition est la suivante :

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1,36 \text{ g/l}$$

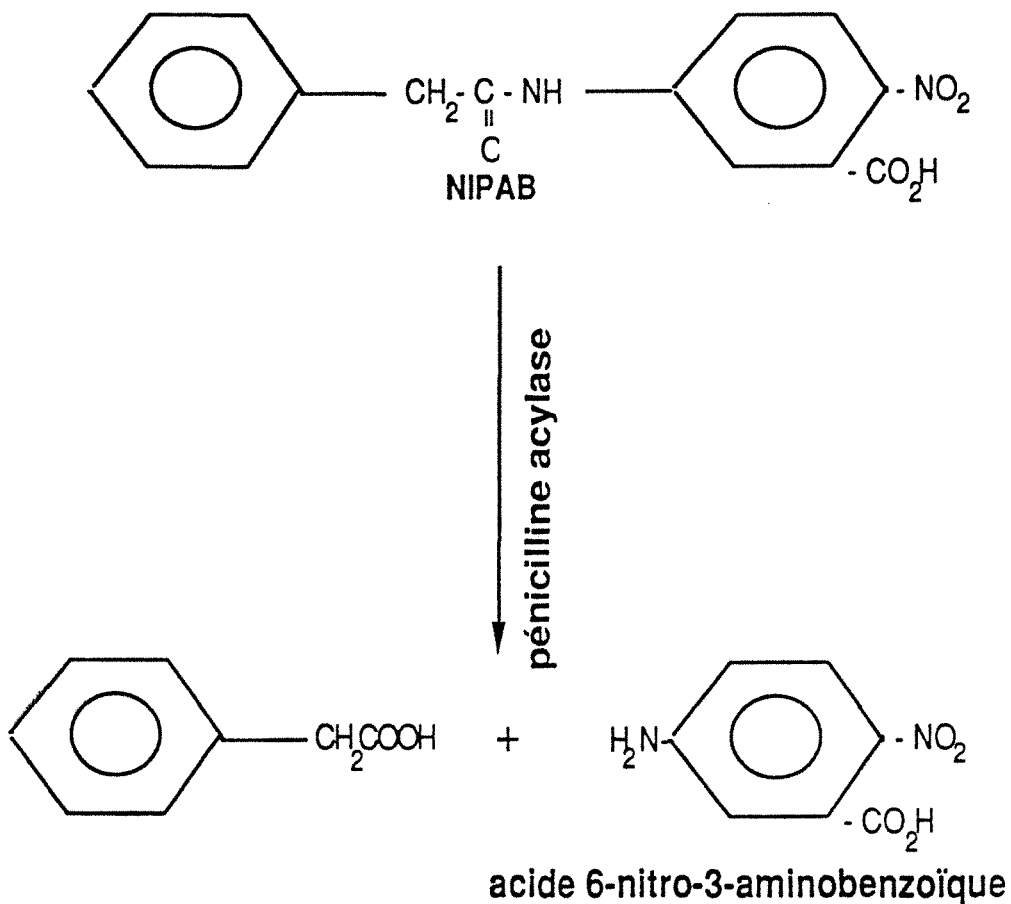
$$\text{pH} = 7,2 \text{ (KOH)}$$

Nous diluons les cellules de façon à obtenir une DO à 660 nm inférieure à 1,4 pour le LKB et 1 pour le Bausch & Lomb. Ainsi la concentration en biomasse (0,7 g/l de biomasse) permet de réaliser une sonication efficace des cellules. Cette étape se déroule à froid en 4 cycles de 30 secondes de sonication (20 Kc/s) et 30 secondes de repos. Ensuite l'échantillon soniqué est

centrifugé à froid (0°C, 30 min, 15000 RPM) de façon à éliminer les débris membranaires. Le dosage enzymatique est réalisé sur ce surnageant et sur le premier surnageant obtenu à partir de l'échantillon brut. Ainsi, nous obtenons respectivement, les quantités d'enzyme intracellulaire et dans le milieu de culture.

➤ *Dosage de l'enzyme :*

Nous utilisons le 6-nitro-3-phénylacétamidobenzoïque (le NIPAB a été synthétisé par M. ZOUHEIRY) qui est un analogue de substrat de la pénicilline G.



L'apparition de l'acide 6-nitro-3-aminobenzoïque, qui donne une coloration jaune au mélange réactionnel, est suivie au spectrophotomètre à 405 nm. Le coefficient d'extinction ( $\Sigma_H$ ) de ce produit est de  $9090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (à 405 nm).

Nous savons que :  $DO = \Sigma_H [\text{Produit}]$

où [produit] est la concentration du produit en mole/l

$$\text{soit } [\text{produit}] = \frac{DO}{\Sigma_H}$$



L'unité de PA est définie comme étant la quantité d'enzyme qui hydrolyse un  $\mu$ mole de NIPAB par minute à 37°C.

➤ **Réalisation du dosage :**

Pour le dosage, nous mélangeons dans la cuve :

- 930  $\mu$ l de tampon phosphate  $10^{-2}$  M à pH = 7,2 et 37°C
- 50  $\mu$ l de NIPAB (solution à 1 mg/ml)
- 20  $\mu$ l de l'échantillon qui peuvent être ou non dilués de façon à obtenir une concentration en PA dans la cuve entre 100 et 300 U/l.

La lecture donne une variation de DO en fonction du temps et cette donnée est transformée afin d'obtenir des concentrations exprimées en unités par litre.

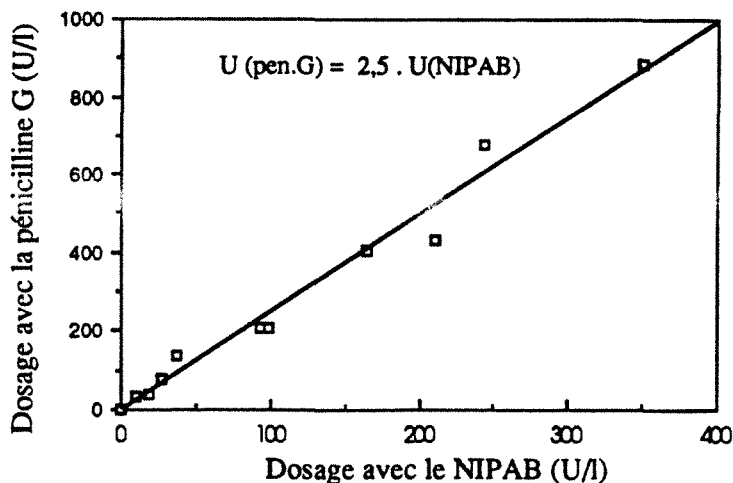
Exemple : nous avons une variation de 1 DO en 50 secondes, l'échantillon est dilué au demi.

$$\frac{1 \times 60 \times 10^6}{50 \times 9090} \times 2 = 264 \text{ U / l}$$

Cet échantillon contient donc 264 U/l d'enzyme.

Erreur : 10 %

Habituellement, les dosages sont réalisés sur la pénicilline G, mais le dosage est long et fastidieux à mettre en oeuvre. Les valeurs obtenues par le dosage avec le NIPAB sont 2,5 fois plus faibles que celles obtenues avec la pénicilline G (Fig. B 9, corrélation établie dans le laboratoire d'Enzymologie et de Génie Génétique de l'Université de Nancy I).



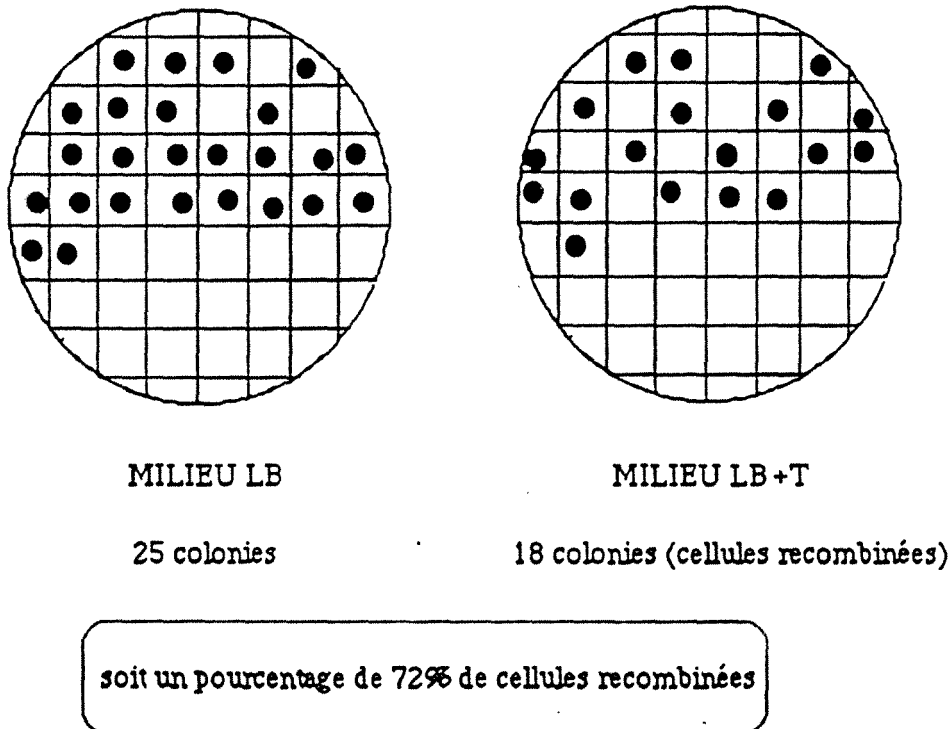
**Figure B9 :** Correspondance entre les unités pénicilline G et les unités NIPAB

Un test sur papier est utilisé afin de déterminer rapidement les clones producteurs sur boîtes de Pétri. Un papier filtre Whatman est imbibé d'une solution de NIPAB (solution à 1 mg/ml). Après séchage à 37°C, le filtre est appliqué sur les boîtes de Pétri où les colonies à tester ont poussé à 28°C pendant 48h. Les colonies productrices laissent une auréole jaune sur le papier après quelques minutes de contact (cette méthode a été mise au point au LEGG-Nancy I).

#### VI.4. - Stabilité du plasmide

##### VI.4.1. - *Dénombrement des cellules recombinées*

Afin de pouvoir détecter l'apparition de cellules sauvages c'est-à-dire de la souche G133 en cours de fermentation, nous prélevons stérilement un échantillon que nous étalons sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé après avoir fait des dilutions adéquates de façon à obtenir une centaine de colonies. Ces boîtes sont mises à incuber pendant 24h à 37°C. Chaque colonie est ensuite repiquée (une centaine en tout) successivement sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB et sur une contenant du milieu LB + T. Ces boîtes ont été préalablement quadrillées et chaque case est repérée par un chiffre : ainsi une colonie sera repiquée sur les deux boîtes dans un carré portant le même chiffre. Un exemple des résultats obtenus est représenté sur la figure B 10.



**Figure B 10 : Dénombrement des cellules recombinées et sauvages**

Nous interprétons les résultats de la façon suivante :

- 1 colonie a poussé sur les deux boîtes, cette cellule possède le plasmide pXL20, c'est une cellule G 271.

- 1 colonie a poussé sur le milieu LB et pas sur le milieu LB + T, cette cellule ne possède plus le plasmide pXL20. Le test sur papier nous permet de mettre en évidence que cette colonie de *E. coli* produit de la PA, donc cette cellule n'est pas un contaminant, elle appartient à la souche G133 .

- nous calculons un pourcentage de cellules recombinées

$$\frac{\text{nombre de colonies sur LB + T}}{\text{nombre de colonies sur LB}} \times 100$$

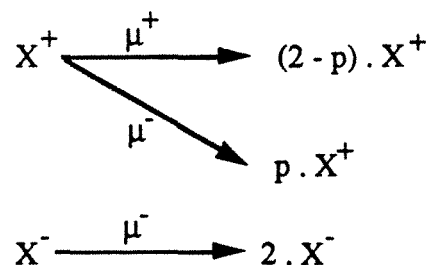
#### VI.4.2. - Evaluation de la probabilité de perte d'un plasmide et de l'avantage de croissance des cellules sauvages

Les deux paramètres clefs qui vont définir la dynamique du réacteur sont :

- (i) la différence entre les taux de croissance des cellules recombinées et sauvages ( $\delta\mu$ )
- (ii) la probabilité pour une cellule de perdre son vecteur (le phénotype correspondant au plasmide) en une génération ( $p$ ).

SAN et WEBER (1989) proposent une méthode graphique pour calculer ces deux paramètres.

Le modèle utilisé est le suivant :



où : -  $X^+$  : cellules recombinées  
 -  $X^-$  : cellules sauvages

$$\text{soit } \frac{dX^+}{dt} = X^+ \cdot (\mu^+ - D) - X^+ \cdot p \cdot \mu^+$$

$$\text{et } \frac{dX^-}{dt} = X^- \cdot (\mu^- - D) + X^+ \cdot p \cdot \mu^+$$

$$\text{or } X_T = X^+ + X^-$$

$$\text{d'où } \frac{dX_T}{dt} = (\mu^+ \cdot X^+) + (\mu^- \cdot X^-) - (D \cdot X_T)$$

En culture discontinue  $D = 0$ , et d'autre part ces auteurs posent :  $y^+ = \frac{X^+}{X_T}$  et  $y^- = \frac{X^-}{X_T}$

$$\text{d'où } \frac{dy^+}{dt} = y^+ \cdot [\delta\mu \cdot (1 - y^+) - p \cdot \mu^+]$$

où  $\delta\mu = \mu^+ - \mu^-$  et donc  $\delta\mu < 0$  (sans pression de selection)

après intégration il vient :

$$\frac{y^+}{\left[1 - y^+ - \left(\frac{p \cdot \mu^+}{\delta\mu}\right)\right]} = - \left(\frac{p \cdot \mu^+}{\delta\mu}\right) \cdot e^{(\delta\mu - p \cdot \mu^+) \cdot t}$$

Ici les auteurs supposent que le système est relativement stable, c'est-à-dire :

$$\delta\mu \gg p\mu^+ \text{ soit donc que } 1 - y^+ \gg \frac{p\mu^+}{\delta\mu}$$

Ainsi l'équation précédente est simplifiée :

$$\text{Ln} \frac{X^+}{X^-} = \text{Ln} \left( - \frac{\delta\mu}{p \cdot \mu^+} \right) + (\delta\mu - p \cdot \mu^+) \cdot t$$

donc la courbe  $\text{Ln}(X^+/X^-) = f(t)$  est une droite d'équation :  $\text{Ln}(X^+/X^-) = at + b$  (Fig. B 11).

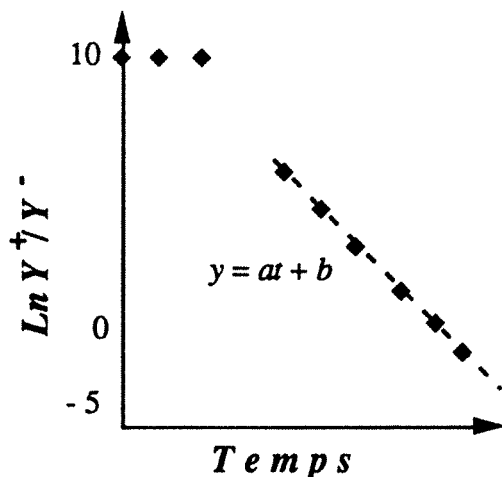


Figure B 11 : Détermination graphique des paramètres  $p\mu^+$  et  $\delta\mu$ .

$$\text{où } a = \delta\mu - p\cdot\mu^+$$

$$\text{et } b = \text{Ln}\left(-\frac{\delta\mu}{p\cdot\mu^+}\right)$$

$$\text{soit } p\cdot\mu^+ = \delta\mu - a$$

$$\text{et } \delta\mu = \frac{a}{1 + e^{-b}}$$

Lorsqu'il y a 100 % de cellules recombinées,  $X^+/X^-$  est infini. Nous prenons alors une valeur arbitraire suffisamment grande, par exemple  $\text{Ln}(X^+/X^-) = 10$ .

Seule la partie linéaire de la courbe  $\text{Ln}(X^+/X^-)$  en fonction du temps est utilisée pour calculer  $p\mu^+$  et  $\delta\mu$ .

#### VI.5. - Gels de protéines

L'électrophorèse est réalisée sur un surnageant de cellules soniquées afin de visualiser le contenu protéique.

gel de concentration 5 % :

tris - HCl (0,5 M pH = 6,8)	48 $\mu$ l
SDS (10 %)	50 $\mu$ l
solution d'acrylamide bisacrylamide	625 $\mu$ l
temed	50 $\mu$ l
persulfate d'ammonium (30 mg/ml)	125 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O distillée	qsp 5 ml

## gel de séparation 10 % :

tris - HCl (1M pH = 8,8)	3,125 ml
SDS (10 %)	0,125 ml
solution d'acryl bisacrylamide	3,125 ml
temed	0,625 ml
persulfate d'ammonium (30 mg/ml)	0,125 ml
H <sub>2</sub> O distillée	qsp 12,5 ml

## Tampon d'électrophorèse :

glycine	14,4 g
tris	3 g
SDS	1 g
H <sub>2</sub> O distillée	qsp 1 l
pH = 8,8	

## bleu de bromophénol :

EDTA	125 nM
SDS	2 %
glycérol	25 % (V/V)
bleu de bromophénol	0,12 %

## bleu de Coomassie :

bleu de Coomassie	0,2 %
acide acétique	10 % (V/V)

L'échantillon à déposer est mis dans un bain-marie d'eau bouillante pendant 3 minutes. Puis le bleu de bromophénol est ajouté (au minimum 1/3 du volume de l'échantillon). Ce bleu permet d'alourdir l'échantillon et donc de faciliter le dépôt, il permet aussi de visualiser le front de migration.

L'équivalent de 15 mDO à 280 nm de PA (purifiée au LEGG-Nancy I) est déposé sur le gel. Pour les échantillons provenant des surnageants de sonication, l'équivalent de 4 unités de PA est déposé. Si l'échantillon ne contient pas d'enzyme, nous déposons l'équivalent de 20 mDO. Nous utilisons un gel de dimension 120 x 100 x 1 mm. La migration se fait pendant 2h30 à 30 mA. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie puis décoloré avec de l'acide acétique 10 % (V/V). Finalement le gel est séché sur papier Whatman.

## VII - Exploitation des données expérimentales

### VII.1. - Définition des paramètres cinétiques

#### Les vitesses spécifiques

A partir des vitesses de consommation du substrat ( $r_S$ , exprimée par unité de volume du réacteur : g/l.h), de production du produit ( $r_P$  en g/l.h) et de croissance ( $r_X$  en g/l.h) à l'instant  $t$ , nous pouvons exprimer les vitesses spécifiques de la façon suivante :

- vitesse spécifique de croissance ( $h^{-1}$ ) :  $\mu = \frac{r_X}{X}$
- vitesse spécifique de consommation des substras ( $h^{-1}$ ) :  $\gamma_S = \frac{r_S}{X}$
- vitesse spécifique de production de l'enzyme ( $h^{-1}$ ) :  $\Pi_P = \frac{r_P}{X}$

où  $X$  est la concentration en biomasse à l'instant  $t$ .

Lorsqu'il y a consommation du substrat  $\gamma_S$  est positif.

#### Les rendements

Les rendements  $Y_{X/S}$  et  $Y_{P/X}$  sont définis respectivement comme le poids de biomasse formée par gramme de substrat utilisé et la quantité d'enzyme produite par gramme de biomasse formée. Nous distinguons deux types de rendements :

i - les rendements instantanés qui sont le rapport des vitesses spécifiques entre deux temps donnés par exemple  $t_j$  et  $t_{j+1}$  (avec  $t_j < t_{j+1}$ ) :

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{X_{j+1} - X_j}{S_j - S_{j+1}}$$

$$Y_{P/X} = \frac{r_P}{r_X} = \frac{P_{j+1} - P_j}{X_{j+1} - X_j}$$

ii - les rendements globaux, qui expriment la part de substrat transformé en biomasse depuis le début de la fermentation ou la part d'enzyme formée à partir de la biomasse produite depuis le début de la fermentation :

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

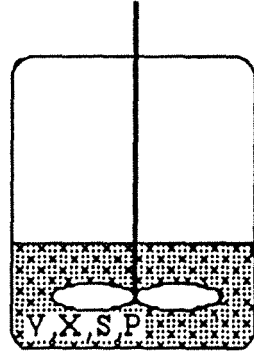
$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0}$$

l'indice 0 indique que les concentrations sont prises au temps initial.

## VII.2. - Evaluation des paramètres cinétiques

### VII.2.1. - *En fermentation discontinue*

A partir des courbes de croissance ( $X = f(t)$ ), d'assimilation du substrat ( $S = f(t)$ ) et de formation de produit ( $P = f(t)$ ), les vitesses  $r_X$ ,  $r_S$  et  $r_P$  sont calculées à chaque instant  $t$  en déterminant les tangentes à ces courbes à l'instant  $t$ .



fermentation discontinue

Les équations de bilan donnent :

$$r_X = \frac{dX}{dt}$$

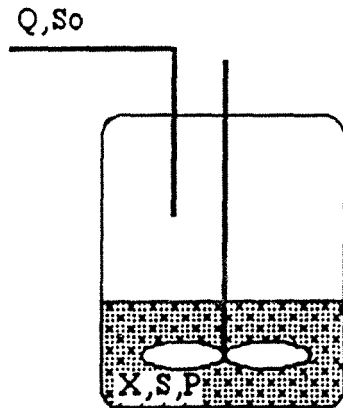
$$r_S = -\frac{dS}{dt}$$

$$r_P = \frac{dP}{dt}$$

Nous calculons  $\frac{dX}{dt}$ ,  $\frac{dS}{dt}$ ,  $\frac{dP}{dt}$  à partir des courbes  $X = f(t)$ ,  $S = f(t)$  et  $P = f(t)$ .

Ainsi les vitesses sont calculées.

### VII.2.2. - *En fermentation semi-continue*



fermentation semi-continue

$$Q = \frac{dV}{dt}$$



Les bilans donnent :

$$r_X = \frac{Q}{V} \cdot X + \frac{dX}{dt}$$

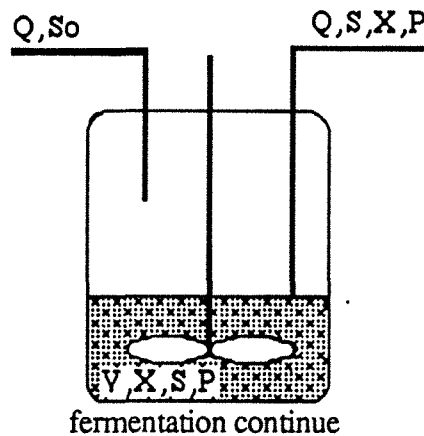
$$r_S = \frac{Q}{V} \cdot (S_0 - S) - \frac{dS}{dt}$$

$$r_P = \frac{Q}{V} \cdot P + \frac{dP}{dt}$$

Nous calculons  $\frac{dX}{dt}$ ,  $\frac{dS}{dt}$ ,  $\frac{dP}{dt}$  à partir des courbes  $X = f(t)$ ,  $S = f(t)$  et  $P = f(t)$ .

Ayant à chaque instant  $t$  les valeurs de  $Q$ ,  $V$ ,  $X$ ,  $S$  et  $P$  nous pouvons calculer  $r_X$ ,  $r_S$  et  $r_P$ .

### VII.2.3. - En fermentation continue



le volume est constant ( $\frac{dV}{dt} = 0$ ) et nous notons  $D$  le taux de dilution,  $D = \frac{Q}{V}$

Les bilans de matière pour  $S$ ,  $X$  et  $P$  donnent :

$$r_X = DX + \frac{dX}{dt}$$

$$r_S = D(S_0 - S) - \frac{dS}{dt}$$

$$r_P = DP + \frac{dP}{dt}$$

Les vitesses  $r_X$ ,  $r_S$  et  $r_P$  sont calculées de la même façon que pour les fermentations semi-continues.

### VII.3. - Modélisation

La résolution des équations différentielles décrivant le comportement de la souche *E. coli* G271 sur un milieu complexe est effectuée par la méthode de RUNGE-KUTTA d'ordre 4 sur un ordinateur SUN PACKAGE 3/60 (système d'exploitation : SUN UNIX 3).



*PARTIE C*

---

*ETUDES PRELIMINAIRES DES CONDITIONS DE  
CULTURE POUR LA PRODUCTION DE PENICILLINE  
ACYLASE ET COMPARAISON DE LA SOUCHE HOTE ET DE  
LA SOUCHE RECOMBINEE*

---



## PARTIE C : ETUDES PRELIMINAIRES DES CONDITIONS DE CULTURE POUR LA PRODUCTION DE PENICILLINE ACYLASE ET COMPARAISON ENTRE LA SOUCHE HOTE ET LA SOUCHE RECOMBINEE

<b>I - Mise au point des conditions de culture pour la production de pénicilline acylase</b>	p 104
<b><u>I.1. - Influence de l'aération</u></b>	p 104
<b><u>I.2. - Influence de la concentration initiale en glucose</u></b>	p 108
<i>I.2.1. - Etude préliminaire en erlenmeyer de l'influence de la concentration initiale en glucose</i>	p 108
<i>I.2.2. - Etude de l'influence de la concentration initiale en glucose en réacteur</i>	p 110
<b><u>I.3. - Influence du pH</u></b>	p 114
<i>I.3.1. - Influence de la régulation du pH</i>	p 114
<i>I.3.2. - Détermination du pH optimal</i>	p 117
<i>I.3.3. - Conclusion sur l'influence du pH</i>	p 119
<b><u>I.4.- Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique</u></b>	p 121
<i>I.4.1. - Etude de l'influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la croissance</i>	p 121
<i>I.4.2. - Etude de l'influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la production de pénicilline acylase</i>	p 123
<i>I.4.3. - Conclusion sur l'influence de la concentration initiale en acide phénylacétique</i>	p 123
<b><u>I.5. - Influence de la température</u></b>	p 125
<b><u>I.6. - Conclusion sur les conditions optimales de culture de la souche <i>E. coli</i> G271 pour la production de pénicilline acylase</u></b>	p 126

<b>II - Comparaison de la souche hôte et de la souche recombinée</b>	<b>p 128</b>
<b>II.1. - <u>Etude préliminaire en erlenmeyer</u></b>	<b>p 128</b>
<b>II.2. - <u>Etude en fermenteur</u></b>	<b>p 130</b>
<b>II.3. - <u>Influence du plasmide sur la cellule hôte</u></b>	<b>p 133</b>

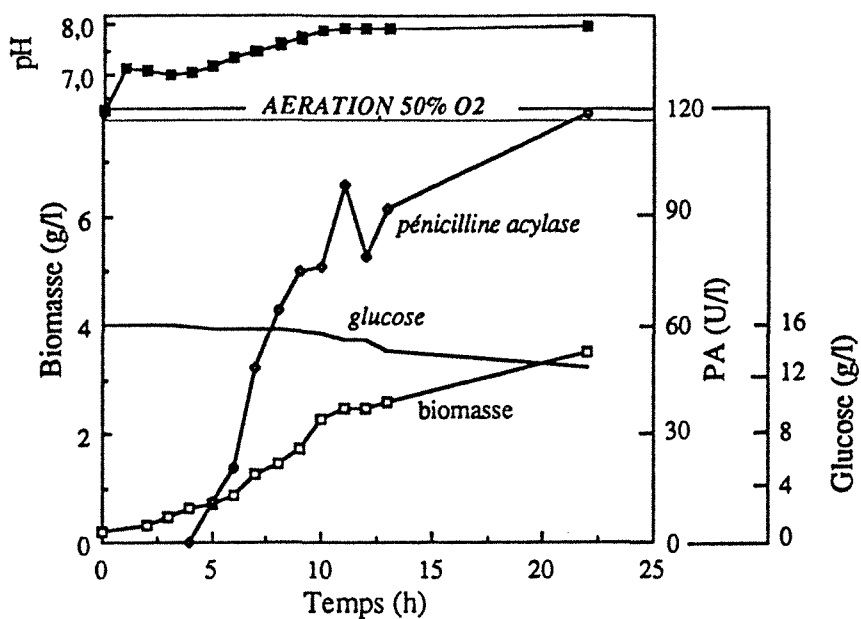
## **PARTIE C : ETUDES PRELIMINAIRES DES CONDITIONS DE CULTURE POUR LA PRODUCTION DE PENICILLINE ACYLASE ET COMPARAISON DE LA SOUCHE HOTE ET DE LA SOUCHE RECOMBINEE**

La souche *E. coli* G271, surproductrice de PA a été fournie au LEGG (Nancy I) dans le cadre d'une collaboration avec la société RHONE-POULENC. Une première étude comparative du comportement des souches G20, G133 et G271 avait été réalisée en erlenmeyers au LEGG par Mme GHRIBI et M. ZOUHEIRY, les conclusions suivantes avaient été tirées sur la production de PA par la souche recombinée G271 (ZOUHEIRY, 1990). La production de PA dans cette souche restait sensible à l'effet négatif des températures supérieures à 28°C. Dans cette souche, la production de PA est non pas inhibée par le glucose, mais au contraire stimulée pour des concentrations allant de 0 à 20 g/l. Une production constitutive de PA est obtenue sans acide phénylacétique, néanmoins, la production d'enzyme est augmentée lorsque la concentration initiale en APA passe de 0 à 1 g/l. La présence de tétracycline dans le milieu de culture a un effet négatif à la fois sur la biomasse et sur la production d'enzyme. Un travail a alors été entrepris en collaboration entre le GPBA et le LEGG avec l'accord de la société RHONE-POULENC, dans l'objectif d'adapter les conditions de fermentations obtenues en erlenmeyer à la culture en réacteur.

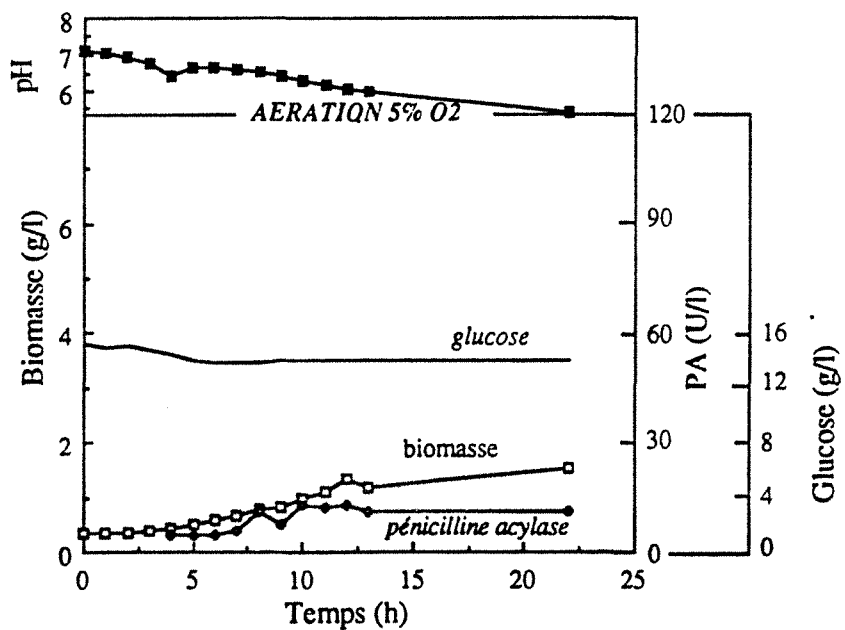
Nous cultivons une souche de *E. coli* surproductrice de PA sur un milieu complexe contenant de la peptone, du glucose et de l'APA. D'après les résultats présentés dans la bibliographie, nous constatons que les milieux utilisés pour produire la PA sont toujours complexes et souvent à base de peptone. Le choix du milieu est important, mais il faut aussi fixer les conditions de culture en fonction du microorganisme producteur. Les données de la bibliographie seules ne permettent pas de fixer ces conditions de culture, mais elles indiquent les paramètres clefs à étudier : l'aération, la concentration en glucose et en APA, le pH et la température.

Dans une première partie, nous allons étudier l'influence de ces paramètres importants sur la production de la PA. Ainsi, nous déterminerons les conditions de culture favorables à la production de cette enzyme qui seront utilisées ensuite pour poursuivre notre étude.

Dans une deuxième partie, utilisant ces conditions de culture, nous étudierons le comportement de la souche *E. coli* G271. La souche *E. coli* G271 provient de la transformation de la souche hôte G133 par le plasmide pXL20. Comme nous l'avons souligné dans la bibliographie, l'introduction d'un plasmide dans une cellule entraîne des modifications de son métabolisme : la cellule doit réaliser des synthèses supplémentaires (ADN et protéines plasmidiques). Nous quantifierons le surplus métabolique que représente le plasmide pour la cellule hôte.



**Figure C 1 :** Evolution du pH et des concentrations en PA, glucose et en biomasse au cours d'une culture en réacteur discontinu de *E. coli* G271 (oxygène dissous à 50 % de la saturation).



**Figure C 2 :** Evolution du pH et des concentrations en PA, glucose et en biomasse au cours d'une culture en réacteur discontinu de *E. coli* G271 (oxygène dissous à 5 % de la saturation).



## I - Mise au point des conditions de culture pour la production de pénicilline acylase :

Dans cette partie, nous voulons déterminer les conditions de culture favorables à la production de PA et donc qui permettent d'obtenir une bonne production spécifique. Ce critère, qui est le rapport entre la concentration en PA sur la concentration en biomasse, rend compte de la productivité des cellules. L'influence de chacun de ces paramètres clefs sur la production de l'enzyme sera étudiée (l'aération, la concentration en glucose et en APA, le pH et la température).

### I.1. - Influence de l'aération :

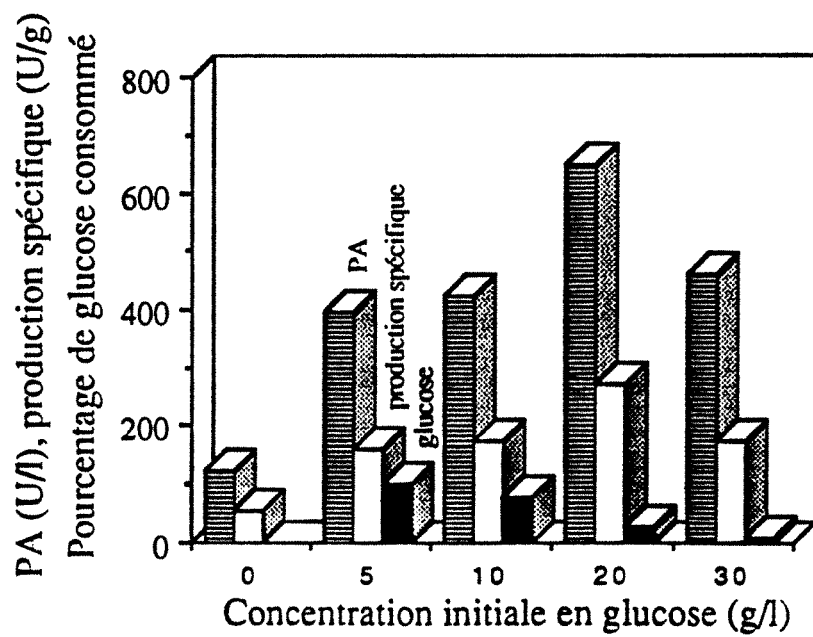
La littérature, nous l'avons vu, n'est pas très précise à ce sujet : les conditions d'aération sont très variables mais la tendance générale serait de maintenir une aération faible qui favoriserait la production de l'enzyme. Nous voulons déterminer si la souche *E. coli* G271 produit plus de PA lorsque l'aération est forte ou au contraire faible.

Nous avons donc comparé deux fermentations menées à des concentrations en oxygène dissous différentes (5 % et 50 %), sans réguler le pH, à 26 °C et en utilisant le milieu "peptone" avec une concentration initiale en glucose de 15 g/l.

➡ La figure C 1 représente l'évolution du pH ainsi que des concentrations en biomasse, glucose, et PA au cours d'une fermentation standard. Lorsque l'aération est forte, la souche G271 croît rapidement pendant les 10 premières heures de la fermentation (phase exponentielle), puis la croissance est ralentie. La PA est produite pendant la phase exponentielle. Le glucose est consommé à partir de la 6<sup>ème</sup> heure de culture, et en fin de fermentation, il reste encore 13 g/l de glucose dans le milieu, le pH du milieu de culture augmente et se stabilise à 8. Dans ces conditions d'aération la souche ne produit pas d'éthanol. La concentration maximale d'acétate dans le milieu de culture est de 0,2 g/l.

➡ La figure C 2 rend compte de l'évolution des mêmes variables d'état (pH, concentrations en biomasse, glucose, et PA) lorsque l'aération est faible (5 % en oxygène dissous). Dans ces conditions, la phase exponentielle bien que plus faible que précédemment se déroule en même temps (pendant les 10 premières heures). La production de PA est fortement réduite, et le glucose est consommé dès les premières heures de la culture. Mais à partir de la 7<sup>ème</sup> heure de fermentation, la concentration en glucose dans le milieu se stabilise à 14 g/l. Le pH diminue et atteint la valeur de 5,5 en fin de culture. Dans ces conditions, la concentration maximum en acétate est de 2,5 g/l (à la 8<sup>ème</sup> heure de fermentation).

GOTTSCHALK (1979) ainsi que CUTAYAR et POILLON (1989) ont mis en évidence que la consommation de glucose entraîne une production d'acides organiques dans le milieu de culture



**Figure C3 :** Influence de la concentration initiale en glucose sur la concentration finale et la production spécifique en PA ainsi que sur la consommation du glucose pour des cultures en erlenmeyers de *E. coli* G271 (valeurs finales après 20 h de culture, ZOUHEYRI, 1990).

lorsque la souche croît en limitation d'oxygène. Dans notre cas, lorsque l'aération est faible, la souche assimile le glucose dès les premières heures, le pH diminuerait suite à une production d'acides organiques. Les productions d'enzyme et de biomasse sont dans ces conditions plus faibles. Les rendements de conversion du glucose en biomasse sont plus faibles : 1,1 g/g pour une faible aération contre 1,3 g/g pour une forte aération (ces rendements sont calculés pendant la phase de consommation de ce substrat), ceci traduirait une dispersion du glucose dans la production des acides organiques. Lorsque la concentration en oxygène dissous est maintenue à 50 % de la saturation, la production spécifique en PA est 4,5 fois plus élevée alors que la biomasse n'est multipliée que par 2,3. Il apparaît donc qu'une bonne aération favorise la production enzymatique et pas seulement la croissance. L'acétate est décrit comme étant le principal inhibiteur de la croissance pour *E. coli*. D'après les résultats de TAHA (1987), pour une concentration de 2 g/l, le taux de croissance maximum de la souche G271 n'est diminué que de 14%. Dans notre cas, avec une aération forte, la croissance n'est donc pas inhibée par l'acétate.

En résumé, pour ce qui est de la croissance, nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature. Pour obtenir une forte densité cellulaire, il est souhaitable de maintenir une concentration en oxygène dissous supérieure à 40 % de façon à limiter la production d'acides organiques et notamment la production d'acétate qui peut inhiber la croissance. En revanche, nos résultats sur la production de PA ne sont pas en accord avec ceux cités dans la bibliographie (pour des souches différentes de *E. coli*) où une faible concentration en oxygène dissous permet en général d'obtenir une meilleure production d'enzyme : pour GEBAUER et coll. (1987), l'optimum se situe à 5 % de la saturation. Cependant nous sommes en accord avec BIBAL et coll. (1989) qui précisent que l'acétate dégradé par l'intermédiaire du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire, perturbe la synthèse des protéines hétérologues. Afin de maximiser la production de protéines recombinées, ces auteurs préconisent de maintenir une bonne aération et de contrôler la croissance afin d'éviter une production d'acétate. Cette dernière explication paraît plus plausible que la précédente dans la mesure où aucun mécanisme d'inhibition de la synthèse de l'enzyme par l'oxygène n'a jamais été proposé ni mis clairement en évidence. A partir de ces résultats, les cultures en réacteur seront effectuées de façon à maintenir une concentration en oxygène dissous à 40 % de la saturation.

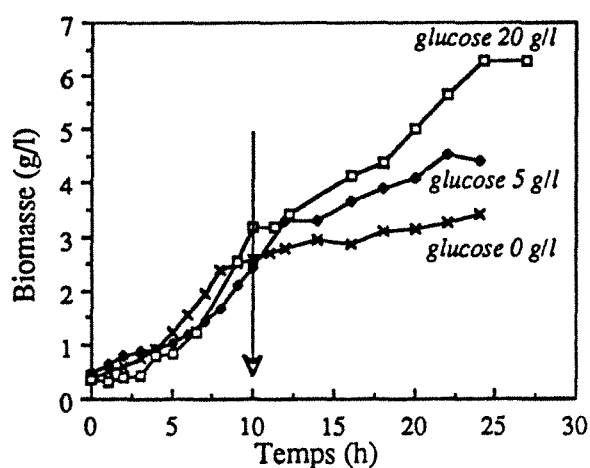
## I.2. - Influence de la concentration initiale en glucose :

### *I.2.1 Etude préliminaire en erlenmeyer de l'influence de la concentration initiale en glucose*

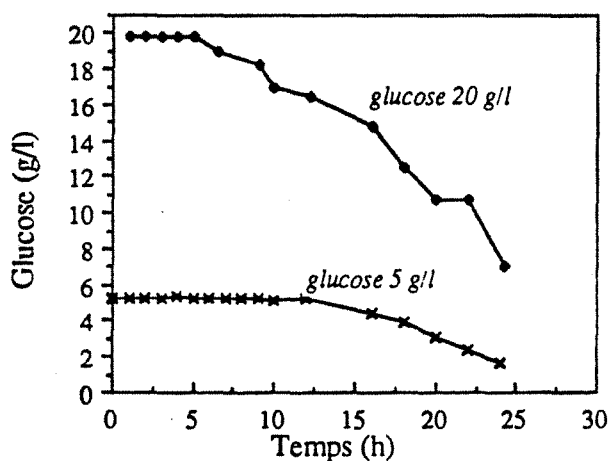
Les souches d'*E. coli* productrices de PA sont généralement soumises à la répression catabolique par le glucose. La souche *E. coli* G271 est issue d'une souche mutée qui n'est plus sensible à l'effet inhibiteur du glucose. Nous avons donc étudié l'influence de la concentration en glucose sur la production de PA par la souche G271 (ZOUHEYRI, 1990).

	CULTURE EN ERLENMEYER	
glucose initial	0	5
biomasse finale (g/l)	2,6	3,5
pH final	8,6	5,5
PA final (U/l)	53	396

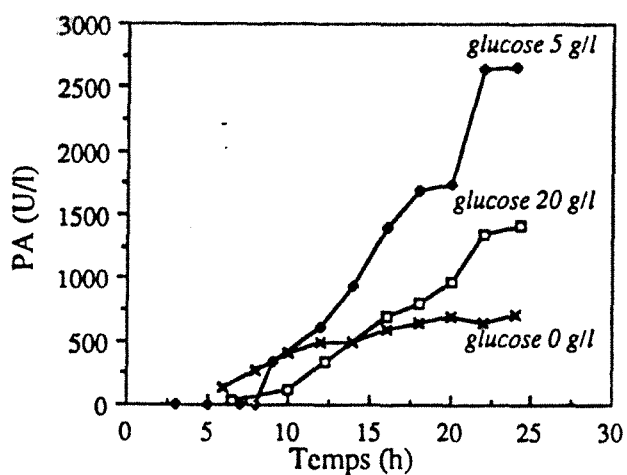
**Tableau C 1** : Influence de la concentration initiale en glucose sur la croissance de la souche *E. coli* G271, la production de PA et la valeur finale du pH.



**Figure C 4** : Influence de la concentration initiale en glucose sur la croissance de la souche *E. coli* G271 cultivée en réacteur discontinu.



**Figure C 5** : Influence de la concentration initiale en glucose sur la consommation du glucose par la souche *E. coli* G271 cultivée en réacteur discontinu.



**Figure C 6** : Influence de la concentration initiale en glucose sur la production de PA par la souche *E. coli* G271 cultivée en réacteur discontinu.

ZOUHEYRI). Nous avons débuté notre étude par des cultures en erlenmeyer, en utilisant le milieu "peptone" et en faisant varier les concentrations initiales en glucose (la température est de 26 °C).

➔ La figure C 3, rend compte de l'influence de la concentration initiale en glucose sur les concentration et production spécifique finales en enzyme, ainsi que le pourcentage de glucose consommé. Une augmentation de la concentration initiale en glucose entre 0 et 20 g/l entraîne une amélioration de la production de PA, et aussi de la production spécifique en enzyme. Au delà de 20 g/l, la production diminue, la concentration finale en enzyme est la même pour des concentrations initiales en glucose de 10 et 30 g/l. Le glucose est complètement consommé pour une concentration initiale de 5 g/l. Dans ces conditions, la concentration et la production spécifique en PA sont supérieures à celles obtenues sans glucose.

➔ Le tableau C 1 permet de comparer les performances des cultures avec et sans glucose. En présence de glucose, nous obtenons des concentrations finales en biomasse et en PA plus élevées qu'en absence de glucose. Pour une concentration initiale en glucose de 5 g/l, le pH du milieu de culture diminue alors que sans sucre il augmente.

La souche G271 n'est donc plus soumise à la répression catabolique par le glucose, ce substrat permet même d'augmenter la production de PA. La concentration optimale se situe aux alentours de 20 g/l.

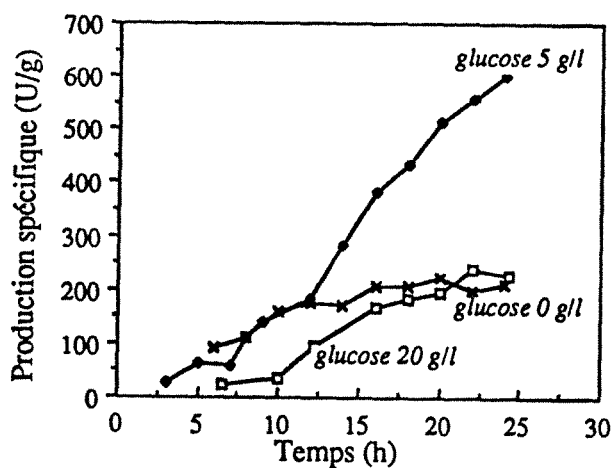
### *1.2.2 Etude de l'influence de la concentration initiale en glucose en réacteur*

Des cultures en réacteur discontinu ont été mises en œuvre en utilisant le même milieu de culture et en faisant varier la concentration initiale en glucose (la température est de 26 °C, l'aération est de 1,5 vvm et l'agitation de 700 RPM). Dans ces conditions de culture, nous étudions l'influence du glucose sur la production de PA.

➔ Les cinétiques de croissance de la souche G271 pour les différentes concentrations initiales en glucose testées, sont représentées sur la figure C 4. En réacteur discontinu avec la régulation du pH, une augmentation de la concentration initiale en glucose entre 0 et 20 g/l se traduit par une nette amélioration de la croissance à partir de la 10<sup>ème</sup> heure de culture. Une concentration initiale en glucose élevée (20 g/l) entraîne une amélioration de la vitesse spécifique de croissance pendant la 2<sup>ème</sup> phase de la culture ( $\mu_2$ ) alors que la vitesse spécifique de croissance ( $\mu_1$ ) pendant la 1<sup>ère</sup> phase de la fermentation (10 premières heures) n'est pas modifiée.

➔ La figure C 5 décrit les cinétiques de consommation du glucose pour des fermentations menées avec des concentrations initiales en glucose de 5 et 20 g/l. Que la concentration initiale en glucose soit de 5 g/l ou de 20 g/l, ce substrat n'est pas complètement consommé, il reste au moins un gramme de glucose en fin de culture.

➔ La figure C 6 permet de comparer les cinétiques de production de la PA pour les différentes concentrations initiales en glucose testées. Pour une concentration initiale en glucose de 20 g/l, la



**Figure C7 :** Influence de la concentration initiale en glucose sur la production spécifique en PA par la souche *E. coli* G271 cultivée en réacteur discontinu.

	pH non régulé		pH régulé	
glucose initial	0	5	0	5
biomasse finale (g/l)	1,9	2,7	3,4	4,5
pH final	8,5	8,3	7	7
PA final (U/l)	102	154	718	2650

**Tableau C 2 :** Influence de la concentration initiale en glucose sur la croissance de la souche de *E. coli* G271 et la production de PA. Cultures en fermenteur avec ou sans régulation du pH.

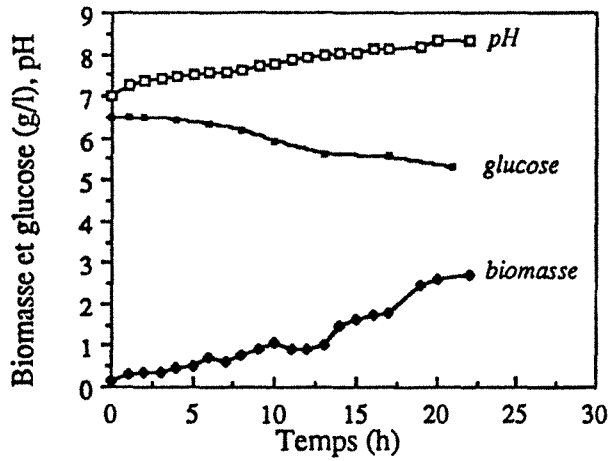
production de PA est meilleure qu'en absence de glucose. Cependant, la concentration optimale en glucose se situe aux alentours de 5 g/l.

➔ L'influence de la concentration initiale en glucose sur la production spécifique en enzyme est illustrée **figure C 7**. Pour des concentrations initiales en glucose de 0 et 20 g/l, les productions spécifiques en enzyme sont comparables. Pour une concentration initiale de 5 g/l en glucose, la production spécifique en PA est nettement plus élevée que celles obtenues avec 20 ou 0 g/l de glucose.

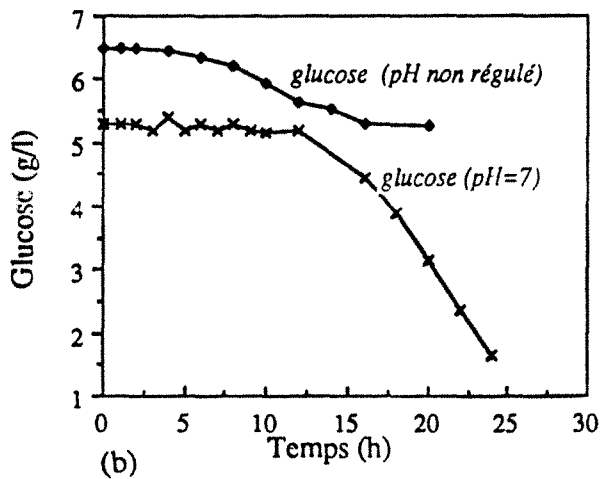
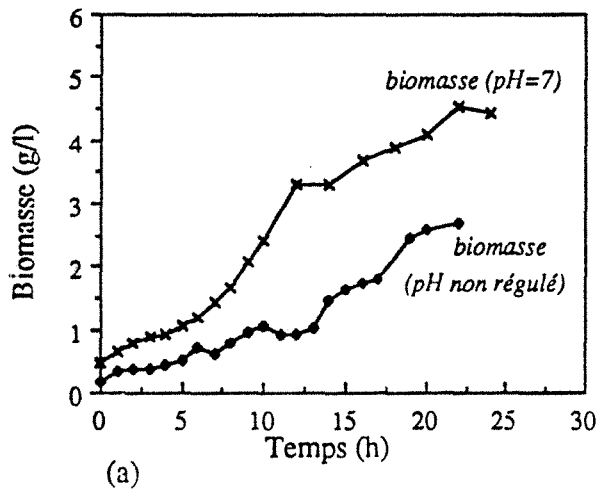
➔ Le **tableau C 2** résume les valeurs finales de pH ainsi que des concentrations en biomasse et PA obtenues en culture discontinue. L'ajout de glucose dans le milieu de culture entraîne une amélioration de la concentration finale en enzyme, cet effet est très prononcé lorsque le pH du milieu de culture est régulé à 7. La production spécifique d'enzyme est également améliorée lorsqu'il y a du glucose dans le milieu de culture. Une concentration initiale en glucose de 5 g/l permet d'obtenir de meilleures performances, c'est-à-dire une concentration finale en PA plus forte et une production spécifique plus élevée. En présence comme en absence de glucose, le pH du milieu de culture a tendance à augmenter au cours de la fermentation.

En erlenmeyer, la concentration optimale en glucose est, nous l'avons vu, de 20 g/l. En réacteur, la production de PA est maximale pour une concentration en glucose de 5 g/l. En erlenmeyer, le pH final des cultures se situe entre 5 et 6 en présence de glucose et atteint 8 en absence de glucose. La souche consomme complètement le glucose et produirait des acides organiques responsables de la chute du pH (cf. § précédent) : la souche se comporte de la même façon qu'en réacteur peu aéré. En réacteur discontinu, avec une bonne aération, la souche n'est pas en limitation d'oxygène, le rendement de conversion du glucose en biomasse est plus élevé qu'en erlenmeyer. La différence des concentrations optimales en glucose entre les cultures en erlenmeyer et en réacteur, serait due à une modification de l'aération entre ces deux modes de culture.

En réacteur, lorsque le pH est régulé à 7 et que la concentration initiale en glucose est de 5 g/l, ce substrat devient limitant en fin de fermentation. Une augmentation de la concentration initiale en glucose n'améliore le taux de croissance que durant la deuxième phase de la culture. En revanche, la production spécifique est moins élevée pour une concentration initiale en glucose de 20 g/l que 5 g/l. Contrairement aux résultats obtenus en erlenmeyers, une augmentation de la concentration initiale en glucose au delà de 5 g/l, ne favorise que la croissance. La souche serait encore partiellement soumise à la répression catabolique par le glucose. Ces résultats ne peuvent pas être comparés avec ceux de la littérature car toutes les souches utilisées sont soumises à la répression catabolique. Dans les expériences ultérieures, les concentrations initiales en glucose employées sont de 5 g/l en réacteur et 20 g/l en erlenmeyer.



**Figure C 8 :** Fermentation en réacteur discontinu sans régulation du pH de la souche *E. coli* G271 : croissance et consommation du glucose au cours du temps.



**Figure C9 :** Influence de la régulation du pH sur la croissance (a) et la consommation du glucose (b).



### I.3. - Influence du pH :

Le pH est un paramètre important pour toutes les fermentations. Nous allons étudier dans un premier temps l'influence de la régulation du pH sur les performances de la souche. Le pH des cultures est régulé à différentes valeurs en fonction des souches de *E. coli* cultivées (cf. partie A). Dans un deuxième temps, nous étudierons l'influence de la valeur du pH sur le comportement de la souche *E. coli* G271.

#### I.3.1. - *Influence de la régulation du pH*

Afin d'étudier l'influence de la régulation du pH sur la culture de *E. coli* G271, des fermentations sont réalisées avec et sans régulation de pH (la température est de 26 °C, l'aération est de 1,5 vvm, l'agitation est de 700 RPM et la concentration initiale en glucose est de 5 g/l).

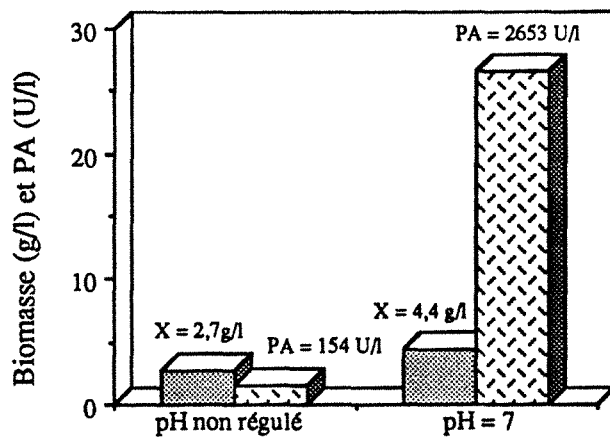
➔ La figure C 8 rend compte de l'évolution du pH ainsi que des concentrations en biomasse et en glucose au cours d'une culture en réacteur discontinu. Le pH augmente dès le début de la culture, puis il se stabilise aux alentours de 8, la croissance est alors très faible et le glucose est peu consommé.

➔ La figure C 9 (a et b) permet de comparer les cinétiques de croissance et de consommation du glucose pour des fermentations avec et sans régulation du pH. Lorsque le pH est régulé à 7, la croissance est nettement améliorée (Figure C 9 a) et il ne reste que 1 g/l de glucose en fin de culture (Figure C 9 b). Sans régulation de pH, 2 g de glucose sont seulement consommés (Figure C 9 b).

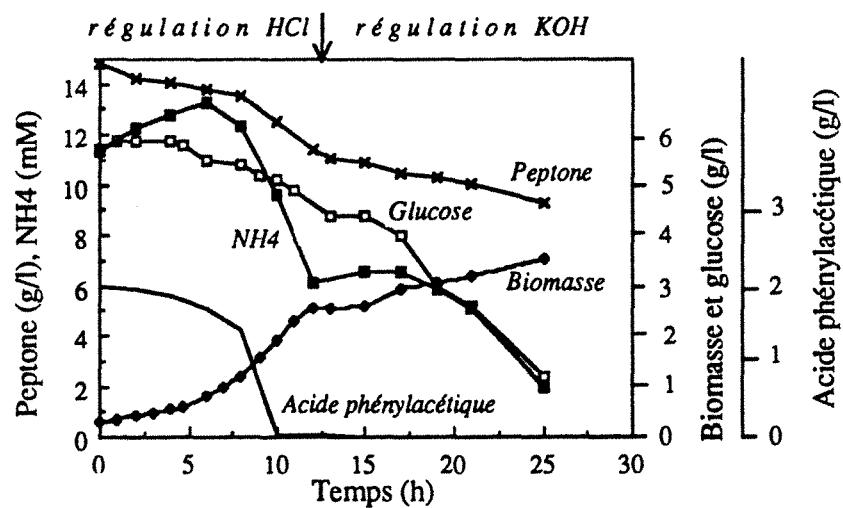
➔ La figure C 10 rend compte de l'influence du pH sur les concentrations finales en biomasse et en PA. La régulation du pH permet de multiplier les concentrations finales en biomasse et en PA respectivement par 1,6 et 17.

➔ Sur la figure C 11, les cinétiques de croissance et de consommation des substrats sont représentées pour une culture standard (avec régulation du pH). En début de culture, la régulation du pH est acide puis à partir de la 12ème heure, elle devient basique. Dans un premier temps, la peptone et l'APA sont consommés et les ions ammonium sont produits. L'assimilation des acides aminés voire de certains peptides contenus dans la peptone entraînent une production d'ions ammonium. De plus, il est généralement admis que seule la forme moléculaire de l'acide peut pénétrer dans la cellule (CHING et coll., 1989), entraînant une consommation d'ions H<sup>+</sup> du milieu. La régulation acide du pH serait donc due aux consommations de l'APA et de la peptone.





**Figure C 10 :** Influence de la régulation du pH sur les concentrations finales en biomasse (X) et en PA obtenues en culture discontinue.



**Figure C 11 :** Cinétiques de croissance et de consommation des substrats (glucose, APA, ions ammonium et peptone) au cours d'une fermentation en réacteur discontinu de la souche *E. coli* G271.

HCl : régulation du pH avec de l'acide chlorhydrique

KOH : régulation du pH avec de l'hydroxyde de potassium

Ensuite, lorsque l'inducteur est épuisé, le glucose est assimilé. Les ions ammonium et la peptone sont consommés en même temps durant cette deuxième phase (la régulation du pH est basique).

Afin de confirmer ces hypothèses la quantité théorique d'acide chlorhydrique (HCl) versée est calculée par rapport à la production d'ions ammonium et la consommation d'APA. Le tableau C 3 permet de comparer cette valeur théorique avec la quantité réellement versée d'acide chlorhydrique.

Composition du milieu	Peptone	Peptone + APA	APA
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> produit (mmole)	15,2	9,2	0
APA consommé (mmole)	0	14,7	14,7
quantité théorique de HCl (mmole)	15,2	23,9	14,7
quantité réelle de HCl versée (mmole)	11	25	13,8

**Tableau C 3 :** Quantité d'acide chlorhydrique versé pour réguler le pH au cours d'une culture discontinuée de *E. coli* G271, comparaison des valeurs théoriques et expérimentales (milieux contenant que de la peptone, de la peptone et de l'APA et que de l'APA).

➔ D'après les résultats reportés dans le tableau C 3 (colonne 2), nous constatons que la quantité d'acide versé est plus importante lorsqu'il y a de l'APA dans le milieu de culture. Lorsqu'il n'y a que de la peptone ou que de l'APA, les quantités sont équivalentes (Tab. C 3 colonnes 1 et 3).

La confrontation des calculs théoriques et expérimentaux permet de confirmer l'hypothèse précédente, c'est-à-dire que la production d'ions ammonium et la consommation concomitante de l'APA sont responsables de l'augmentation du pH qui entraîne la mise en œuvre d'une régulation acide.

D'autre part, nous supposons que la production des ions ammonium provient de la consommation de la peptone. Afin de confirmer cette hypothèse, nous calculons la quantité de peptone consommée pendant la phase de production des ions ammonium, nous l'exprimons en g d'azote. De la même façon, la quantité d'ions ammonium produite est calculée et exprimée dans la même unité. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau C 4.

$\text{NH}_4 = 18 \text{ g/mole}$  et l'azote (N) représente 77,8 % de  $\text{NH}_4^+$

1 mg de peptone =  $12,5 \cdot 10^{-2}$  mg de N.

Composition du milieu	Peptone	Peptone + APA
production de $\text{NH}_4^+$ (mmole)	15,2	9,2
production de $(\text{NH}_4^+)$ (g de N)	0,21	0,13
consommation de la peptone (g/l)	1,2	1,2
consommation de la peptone (g de N)	0,15	0,15

**Tableau C 4** : Calcul de la production et de la consommation d'azote au cours d'une fermentation discontinue de *E. coli* G271 (milieux contenant que de la peptone, de la peptone et de l'APA et que de l'APA).

➔ La confrontation des résultats du **tableau C 4**, entre la production d'ions ammonium exprimée en g d'azote et la consommation de peptone exprimée dans la même unité permet également de confirmer l'hypothèse précédente.

En résumé, nous avons donc une première phase de croissance durant laquelle l'APA et la peptone sont consommés et les ions ammonium produits, entraînant une augmentation du pH. Puis une deuxième phase de croissance pendant laquelle la régulation du pH est basique, elle correspond à une assimilation du glucose et des ions ammonium.

### 1.3.2. - Détermination du pH optimal

Afin de déterminer le pH optimal pour la production de PA, les valeurs de pH couramment utilisées dans la littérature (6,5 et 7,5) ont été testées. Trois fermentations en réacteur discontinu, correspondant à trois valeurs de consignes différentes pour la régulation du pH (6,5-7-7,5), ont été mises en œuvre (la température est de 26 °C, l'aération est de 1,5 vvm, l'agitation est de 700 RPM et la concentration initiale en glucose est de 5 g/l).

➔ La **figure C 12** rend compte de l'influence du pH sur la production spécifique en PA. La production spécifique, qui est le reflet de la productivité des cellules, est plus élevée lorsque le pH est régulé à 7. Les performances des deux autres cultures, menées à des pH de 6,5 et 7,5 sont similaires.

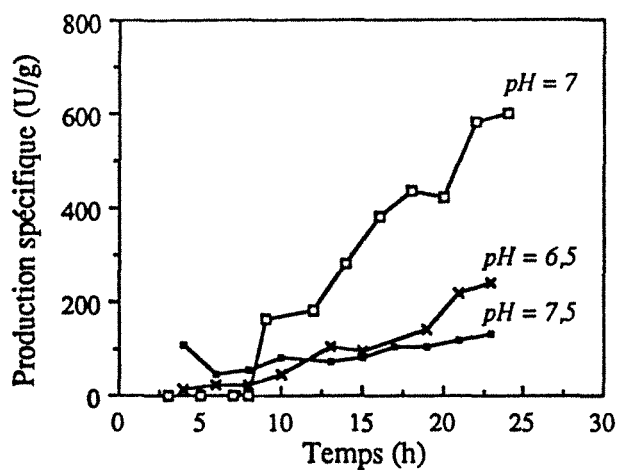


Figure C 12 : Comparaison de la production spécifique en PA pour des cultures en réacteur discontinu de la souche *E. coli* G271 menées à des pH de 6,5 - 7 et 7,5.

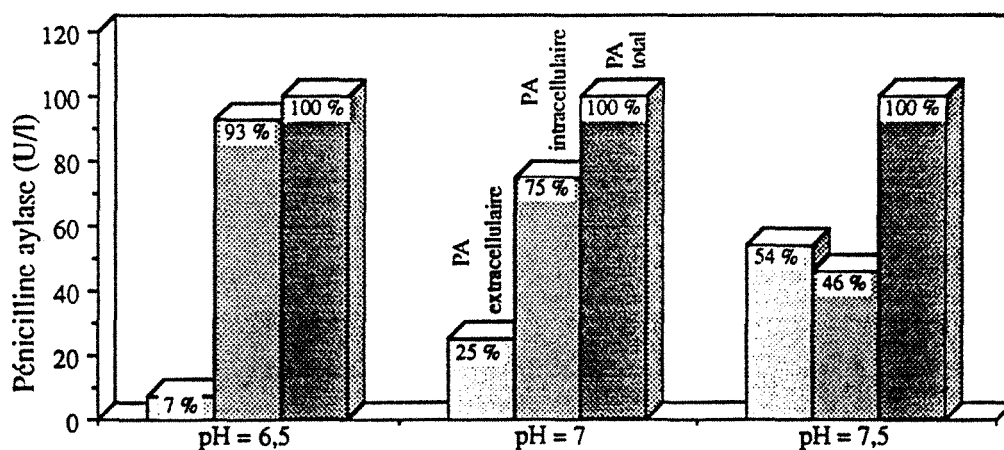


Figure C 13 : Influence de la valeur du pH sur la répartition de la PA entre les milieux extracellulaire et cytoplasmique. Cultures en réacteur discontinu de la souche *E. coli* G271 menées à des pH de 6,5 - 7 et 7,5.

➔ La répartition de la PA entre les milieux intracellulaire et extracellulaire est représentée sur la figure C 13 en fonction de la valeur du pH. La quantité de PA dans le milieu intracellulaire par rapport au milieu extracellulaire augmente lorsque le pH diminue .

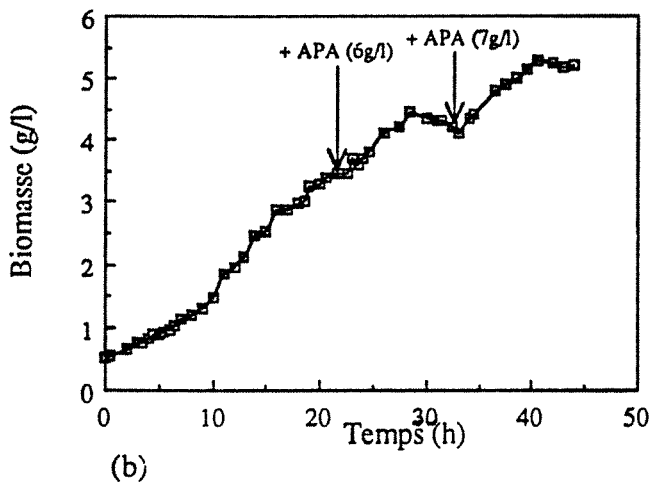
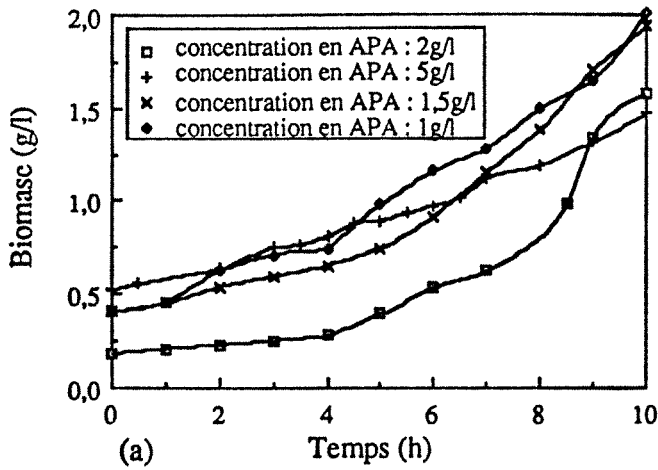
### 1.3.3. - Conclusion sur l'influence du pH

☞ Nous venons de mettre en évidence qu'une régulation du pH à 7 permettrait d'améliorer à la fois la croissance et la production de PA.

La cellule maintient un gradient de pH entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme, ce qui lui permet de réaliser les transports transmembranaires et la production d'ATP, le pH est donc un paramètre très important à contrôler. Le pH interne de *E.coli* est maintenu entre 7,6 et 7,8 (KASHKET, 1985), de plus, il est plus basique que le pH externe. Aussi, dans notre cas, lorsque le pH du milieu de culture atteint la valeur de 8, la cellule ne peut plus maintenir un gradient de pH au travers de sa membrane, les transports transmembranaires et la synthèse d'ATP sont stoppés, la cellule ne peut donc plus croître. La régulation du pH permet de prolonger la croissance et le glucose est alors consommé. GANG et SHAIKH (1976) ne régulent pas le pH de leur culture effectuée sur un milieu tampon synthétique. GEBAUER et coll. (1987) cultivent une souche de *E. coli* à pH 6,8 et SIKYTA et SLEZAK (1964) régulent le pH du milieu à 7,5. Pour la souche *E. coli* G271, et dans les conditions de culture qui ont été choisies, le pH optimum pour la production de PA est 7. Ainsi, la croissance et surtout la production de PA sont améliorées : la production spécifique est multipliée par 10 par rapport à une culture sans régulation du pH.

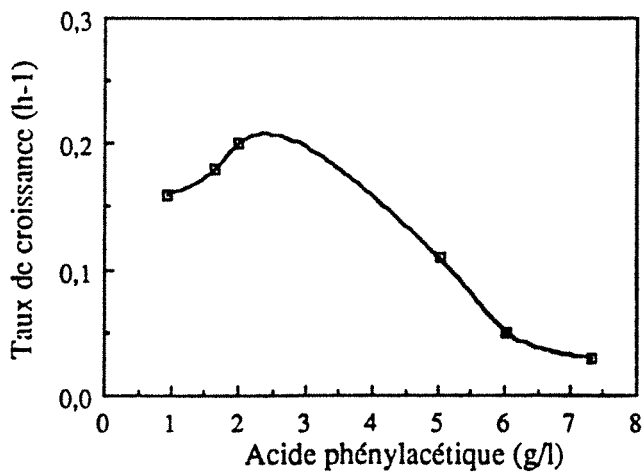
☞ Nous avons montré d'autre part que le pH avait une influence sur la répartition de la PA entre les milieux intracellulaire et extracellulaire, ce qui n'a jamais été décrit pour cette enzyme.

Ce phénomène mis en évidence par GEORGIU et coll. (1988) pour la  $\beta$ -lactamase, serait dû à des altérations spécifiques de la membrane dans la mesure où une enzyme intracellulaire, la  $\beta$ -galactosidase, n'est pas détectée dans le milieu de culture. Il faudrait cependant approfondir l'étude et déterminer s'il s'agit ou non d'une lyse cellulaire, en dosant comme l'ont fait GEORGIU et coll. (1988) la  $\beta$ -galactosidase. Cette propriété pourrait éventuellement être utilisée pour récupérer la PA dans le milieu de culture, ce qui faciliterait l'étape de purification. Les fermentations suivantes sont réalisées à pH 7.



**Figure C 14 :** Influence de la concentration en APA sur la croissance de *E. coli* G271 en réacteur discontinu.

courbe a : concentrations initiales en APA de 1 - 1,5 - 2 - 5 g/l, et courbe b : concentrations de 6 et 7 g/l.



**Figure C 15 :** Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique (APA) sur le taux de croissance de la souche *E. coli* G271 (culture en réacteur discontinu).



#### I.4. - Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique :

D'après la bibliographie, l'APA est une source de carbone qui peut inhiber la croissance et qui induit la production de PA. Suivant les auteurs, les concentrations initiales en APA utilisées varient en fonction des souches utilisées. Nous voulons étudier dans cette partie, l'influence de la concentration initiale en APA sur la croissance et la production d'enzyme afin de déterminer la concentration optimale en inducteur.

##### *I.4.1. - Etude de l'influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la croissance*

Des cultures en réacteur discontinu ont été réalisées sur milieu "peptone" avec des concentrations initiales en APA variables. D'autre part, nous avons réalisé une culture en ajoutant de l'APA à la 21ème et la 31ème heure de fermentation, de façon à obtenir après chaque ajout une concentration croissante en APA dans le réacteur. Les autres constituants du milieu sont aussi ajoutés de façon à ce qu'ils ne soient pas limitants. Pour toutes ces cultures, la température est de 26 °C, l'aération est de 1,5 vvm, l'agitation est de 700 RPM, le pH est régulé à 7 et la concentration initiale en glucose est de 5 g/l.

➔ La **figure C 14 (a et b)** représente les cinétiques de croissance des fermentations menées à des concentrations différentes en APA. La **figure C 14 (a)** ne prend en compte que les 10 premières heures de cultures durant lesquelles le taux de croissance est calculé. Sur la **figure C 14 (b)** le temps d'observation est prolongé car l'APA est ajouté à la 21ème et 31ème heure de la fermentation. Pour des concentrations initiales en APA comprises entre 1 et 2 g/l, les cinétiques de croissance sont comparables. Pour une concentration initiale en APA de 5 g/l, la souche croît beaucoup plus lentement. D'après la **figure C 14 (b)**, nous constatons que la croissance reprend lorsque la concentration en APA dans le milieu de culture augmente, mais que le taux de croissance diminue. Afin de mettre en évidence l'influence de la concentration en APA sur la croissance de la souche *E. coli* G271, les taux de croissance sont calculés à partir de ces résultats.

➔ Sur la **figure C 15**, nous reportons les valeurs des taux de croissance en fonction de la concentration en APA dans le réacteur. Une augmentation de la concentration initiale en APA jusqu'à 2 g/l se traduit par une amélioration du taux de croissance maximum de la souche *E. coli* G271. Pour une concentration initiale en APA de 5 g/l, le taux de croissance de la souche a diminué de moitié, à 7 g/l il n'est plus que de 0,03 h<sup>-1</sup>.

	Concentrations initiales en APA	
	2g/l	0 g/l
Concentration initiale en glucose (g/l)	5	5
Concentration finale en biomasse (g/l)	4,5	4,5
Concentration finale en PA (U/l)	2650	180

**Tableau C 5 : Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la production de PA par la souche de E. coli G271**

L'APA inhibe la croissance pour des concentrations supérieures à 2 g/l. Afin de ne pas inhiber la croissance de la souche, nous utilisons une concentration initiale en APA de 2 g/l.

#### *1.4.2. - Etude de l'influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la production de pénicilline acylase*

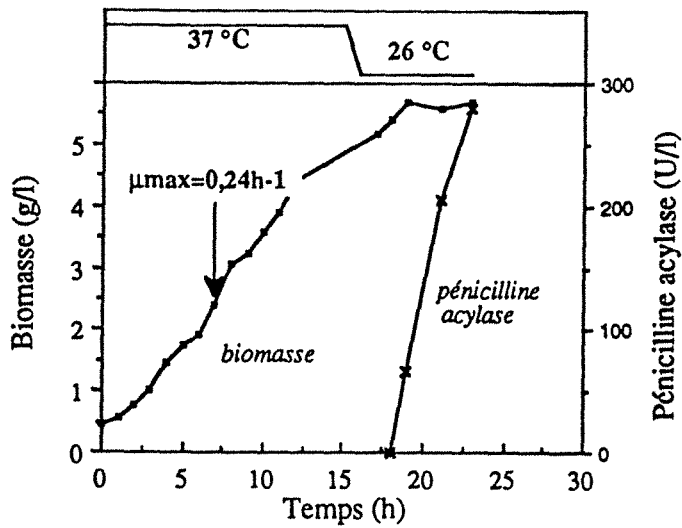
La souche G271 est issue d'une *E. coli* mutée. L'APA est décrit dans la bibliographie comme étant un inducteur de la production de PA par *E. coli*. Nous voulons vérifier que la production de cette enzyme par la souche G271 est encore induite par l'APA. Deux fermentations ont été réalisées avec et sans APA dans le milieu de culture (la température est de 26 °C, l'aération est de 1,5 vvm, l'agitation est de 700 RPM, le pH est régulé à 7 et la concentration initiale en glucose est de 5 g/l).

➡ Les concentrations finales en biomasse et en PA sont reportées dans le **tableau C 5** pour les deux fermentations menées avec et sans APA. En présence d'APA, la concentration finale en biomasse n'est pas modifiée alors que la concentration finale en PA augmente de 180 U/l à 2650 U/l .

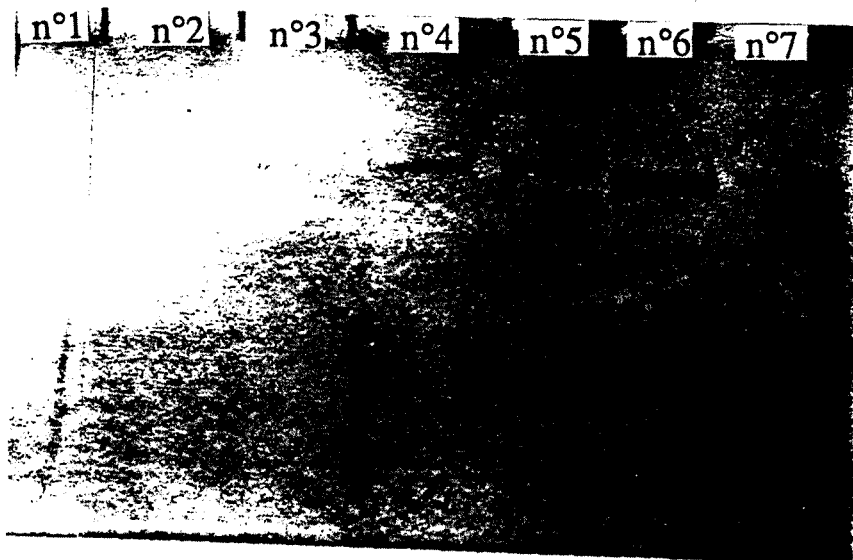
L'APA permet d'augmenter fortement la production de PA : avec 2 g/l d'APA en début de culture la concentration finale en PA et la production spécifique en enzyme sont multipliées par 15.

#### *1.4.3. - Conclusion sur l'influence de la concentration initiale en acide phénylacétique*

Nous avons constaté précédemment que la souche G271 consommait l'APA dès les premières heures, avant le glucose, ce qui la distingue des autres souches de *E. coli*. En effet, dans la bibliographie nous trouvons que les sucres sont toujours les premiers substrats consommés (VOJTISEK et SLESACK 1975 c). Conformément aux résultats de la bibliographie (WOJSKOWICZ, 1981), la production de PA est inductible par l'APA, et la croissance est inhibée par ce même substrat au delà d'une concentration critique. Pour GEBAUER et coll. (1987) la concentration optimale est de 0,8 g/l d'APA tandis que pour VOJTISEK et SLESACK (1975 c) elle est de 2 g/l si l'APA est la seule source de carbone dans le milieu de culture sinon ils utilisent 1 g/l. Nous utiliserons une concentration initiale en APA de 2 g/l afin de ne pas inhiber la croissance et dans ces conditions, la production spécifique est multipliée par 15. Les auteurs précédemment cités cultivent une souche qui n'est pas recombinée, ce qui peut expliquer cette différence de comportement. Des études réalisées sur la même souche dans le laboratoire d'Enzymologie et de Génie Génétique de l'Université de Nancy I par ZOUHEYRI (1990) ont montré que la présence d'APA dans toutes les étapes de la propagation conduit à une meilleure production.



**Figure C 16 :** Cinétique de croissance et évolution de la concentration en PA au cours d'une culture discontinue de la souche *E. coli* G271 : la température de fermentation est diminuée de 37°C à 26°C à la 12ème heure.



**Figure C 17 :** Gel de protéine réalisé à partir d'échantillons pris au cours d'une fermentation en réacteur discontinu de la souche *E. coli* G271 (la température de la culture est diminuée de 37°C à 26°C à la 12ème heure).

Ordre des dépôts :

dépôt n° 1 : échantillon prélevé à la 13ème heure de fermentation (T = 37°C)

dépôt n° 2 : échantillon prélevé à la 15ème heure de fermentation (T = 37°C)

dépôt n° 3 : échantillon prélevé à la 17ème heure de fermentation (T = 26°C)

dépôt n° 4 : échantillon prélevé à la 19ème heure de fermentation (T = 26°C)

dépôt n° 5 : échantillon prélevé à la 21ème heure de fermentation (T = 26°C)

dépôt n° 6 : échantillon témoin de PA.

dépôt n° 7 : échantillon prélevé à la 27ème heure de fermentation (T = 26°C)

### I.5. - Influence de la température :

La PA est généralement produite à des températures comprises entre 26 et 28°C, alors que la température optimale de *E. coli* est de 37°C. Au delà de 28°C, les souches ne produisent plus de PA mais les résultats de la bibliographie ne décrivent pas le rôle de la température sur la synthèse de cette enzyme.

⇒ Nous avons effectué une première culture en réacteur discontinu de la souche G271 à 37°C (l'aération est de 1,5 vvm, l'agitation est de 700 RPM, le pH est réglé à 7 et la concentration initiale en glucose est de 5 g/l). Dans ces conditions, la souche n'a pas produit de PA. La souche *E. coli* G271 ne peut pas produire d'enzyme à 37°C.

D'après la bibliographie, nous savons que la production de PA se fait en deux étapes : la synthèse d'un précurseur cytoplasmique et la maturation de cette molécule en une enzyme active périplasmique. La température pourrait soit perturber une étape précédant la maturation soit la maturation elle-même et dans ce cas là il y aurait une accumulation du précurseur dans le cytoplasme. Ce précurseur peut être mis en évidence sur un gel d'acrylamide.

⇒ Nous avons effectué une 2ème culture en réacteur discontinu à 37°C pendant 16h puis la température a été baissée à 26°C (les autres conditions de culture sont inchangées). Nous avons effectué d'une part des dosages enzymatiques pour mettre en évidence la production de PA et d'autre part des gels de protéines afin de visualiser une éventuelle accumulation du précurseur.

➔ La figure C 16 représente les cinétiques de croissance et de production de la PA au cours de cette fermentation. Le taux de croissance de la souche à 37°C est de 0,24 h<sup>-1</sup>, il est légèrement plus élevé qu'à 26°C (0,2 h<sup>-1</sup>). D'autre part, l'enzyme apparaît à partir de la 18ème heure de culture (après le changement de température).

➔ La figure C 17 est une représentation d'un gel d'acrylamide réalisé sur des échantillons prélevés à différents temps de fermentation. Aucune bande protéique n'est révélée pour les 3 premiers dépôts correspondant aux prélèvements effectués à la 13ème, 15ème et 17ème heure de culture. Une bande protéique migrant à la même hauteur que le témoin apparaît à partir du 4ème dépôt provenant de l'échantillon prélevé à la 19ème heure de culture.

Durant la culture à 37°C, il n'y a pas de production de précurseur ni d'enzyme (dépôts 1,2 et 3). L'enzyme qui apparaît à 18ème heure de culture (dépôts 4,5 et 7) n'est donc pas le résultat de la

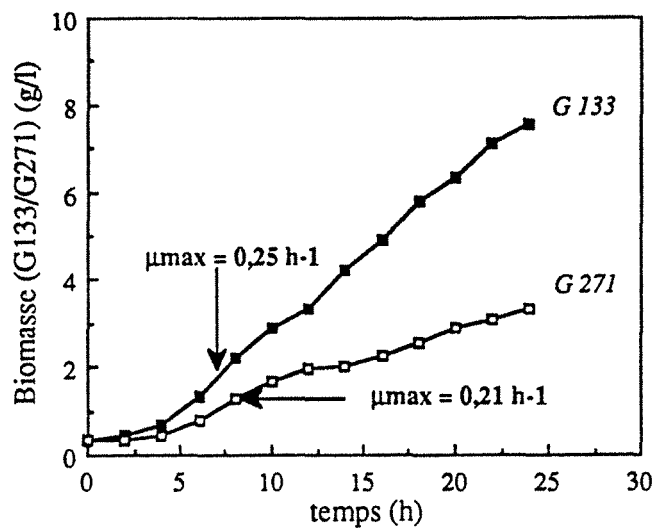


maturation d'un précurseur synthétisé à 37°C. La température perturberait donc la synthèse du précurseur.

Cette souche est donc toujours sensible à la température, nous n'effectuerons pas une première étape de la culture à 37°C favorisant la croissance suivie d'une deuxième étape à 26°C pendant laquelle l'enzyme serait produite. Nous cultiverons la souche de *E. coli* G271 à une température constante de 26°C.

#### I.6. - Conclusion sur les conditions optimales de culture de la souche *E. coli* G271 pour la production de la pénicilline acylase :

Dans cette première étude nous avons déterminé des conditions de culture de façon à améliorer la production de PA et plus précisément la production spécifique. Nous avons vu qu'une forte aération permettrait une "meilleure" utilisation du glucose, c'est-à-dire que la production spécifique de PA est meilleure. Ce résultat est à première vue en contradiction avec les résultats de certains auteurs qui comme GEBAUER et coll. (1987) préconisent une aération faible (concentration en oxygène dissous de 5 %), mais il faut signaler que leur souche est cultivée en absence de glucose car elle ne l'assimile pas. Notre souche a été mutée plusieurs fois et, contrairement aux autres souches productrices de PA elle ne subit plus la répression catabolique. Cependant, ce résultat est en accord avec BIBAL et coll. (1989) qui prétendent qu'une diversification des métabolites produit à partir d'une oxydation incomplète du glucose, suite à une mauvaise aération, entraînerait une diminution de la synthèse des protéines hétérologues. La concentration optimale en glucose est de 5 g/l pour des cultures en réacteur et 20 g/l en erlenmeyer. D'autre part, en accord avec les résultats de la bibliographie, nous trouvons que l'APA permet d'améliorer de façon importante la production de PA et au delà d'une concentration de 2 g/l, il inhibe la croissance. De plus une température de 37°C entraîne un arrêt de la synthèse de la PA et même de son précurseur. L'étape thermosensible serait donc une étape précédant la maturation. Enfin, durant la première phase de croissance, où l'APA et la peptone sont consommés et les ions ammonium produits, le pH augmente, lorsqu'il atteint la valeur de 8 la croissance s'arrête. Lorsque le pH est régulé à 7, la culture est prolongée par une deuxième phase de croissance pendant laquelle le glucose, la peptone et les ions ammonium sont assimilés. Le pH optimum est 7 mais il est important de signaler que le pH semble avoir une influence sur la répartition de la PA entre les milieux intracellulaire et extracellulaire : ce phénomène pourrait être utilisé afin de faciliter l'étape d'extraction dans la mesure où une production à plus grande échelle serait envisagée.



**Figure C 18 :** Comparaison des cinétiques de croissance des souches d'*E. coli* sauvage (G133) et recombinée (G271) : culture discontinue en erlenmeyer ( $\mu_{max}$  : taux de croissance maximum).



Suite à cette première étude les conditions de cultures retenues sont les suivantes :

- ☞ aération : oxygène dissous maintenu au dessus de 40 % de la saturation
  - pour les fermenteurs de 2 l une aération de 1,5 vvm et une agitation de 700 RPM
  - pour le 20 l : régulation de l'oxygène à 40 % de la saturation.
- ☞ pH : 7
- ☞ Température : 26°C
- ☞ APA initiale : 2 g/l
- ☞ Glucose initial : → 5 g/l en réacteur
  - 20 g/l en erlenmeyer
- ☞ peptone : 20 g/l

## II. - Comparaison de la souche hôte et de la souche recombinée

Nous allons comparer le métabolisme de la souche hôte G133 avec celui de la souche recombinée G271 afin de quantifier les conséquences métaboliques du plasmide sur la souche hôte. Nous commencerons par une étude préliminaire en erlenmeyer. Ensuite en réacteur, nous étudierons plus en détail la consommation des substrats.

### II.1. - Etude préliminaire en erlenmeyer :

Une culture de chaque souche (G133 et G271) a été réalisée en erlenmeyer dans les conditions standard, afin de mettre en évidence une éventuelle différence de comportement entre ces deux souches.

➡ La figure C 18 représente les cinétiques de croissance des souches G133 et G271. Après une phase de latence de 3 à 4 h la croissance commence. Le taux de croissance maximum de la souche G133 ( $0,23 \text{ h}^{-1}$ ) est légèrement supérieur à celui de la souche G 271 ( $0,21 \text{ h}^{-1}$ ), mais c'est surtout durant la deuxième phase de croissance que la souche G271 croît plus lentement ( $0,09 \text{ h}^{-1}$  contre  $0,13 \text{ h}^{-1}$ ). En fin de culture la concentration en biomasse obtenue avec la souche G271 est deux fois plus faible qu'avec la souche G133. Nous constatons pour ces deux souches que les croissances sont biphasiques avec un ralentissement à la 10<sup>ème</sup> heure. Ce palier est plus marqué pour la souche G271 qui semble donc s'adapter plus lentement que la souche G133.

Nous mettons donc en évidence une différence de comportement entre ces deux souches du fait de la présence du plasmide (croissance et adaptation plus lente). Nous allons maintenant approfondir ce résultat en réacteur par une étude des paramètres cinétiques liés à la consommation des substrats.

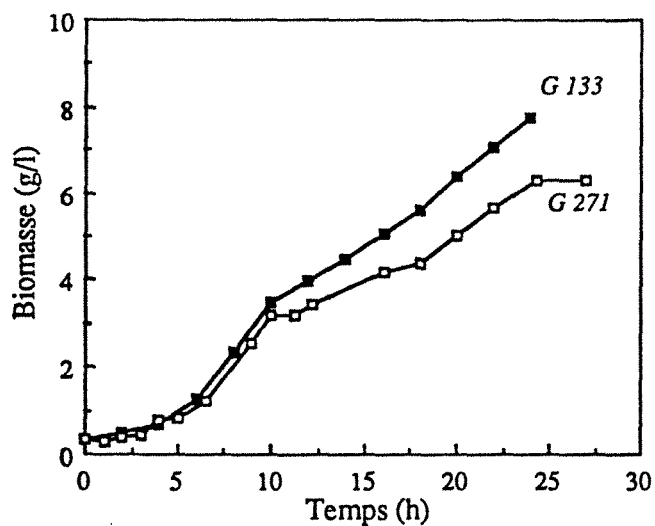


Figure C 19 : Comparaison des cinétiques de croissance des souches d'*E. coli* sauvage (G133) et recombinée (G271) : culture discontinue en réacteur.

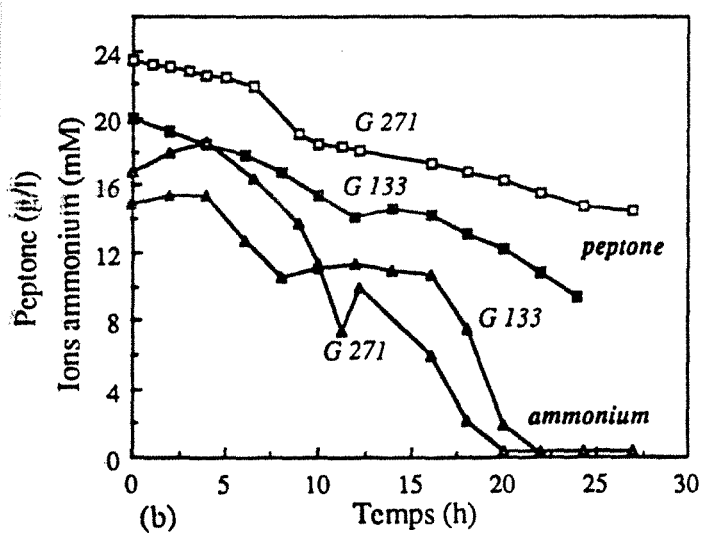
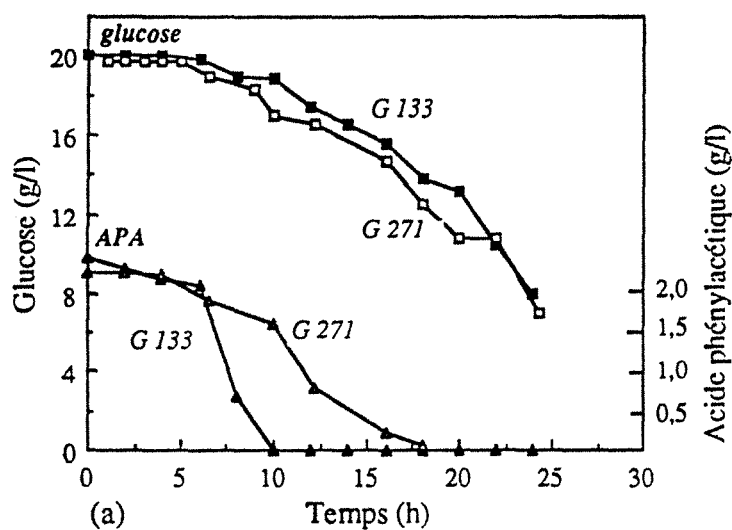


Figure C 20 : Comparaison entre les souches d'*E. coli* sauvage (G133) et recombinée (G271) : des cinétiques de consommation du glucose et de l'acide phénylacétique (APA) (courbe a) et des cinétiques de consommation des ions ammonium et de la peptone (courbe b). (culture discontinue en réacteur)

## II.2. - Etude en fermenteur :

Nous avons mis en évidence que la souche G133 poussait plus rapidement que la souche G271, aussi pour ne pas limiter la croissance par un manque de glucose, sa concentration initiale est augmentée de 5 à 20 g/l. Nous réalisons donc deux cultures en réacteur discontinu, dans les conditions standard mais en ajoutant initialement 20 g/l de glucose. Dans ces conditions, la production de PA pour la souche G271 n'est pas optimale.

➔ La **figure C 19** rend compte des cinétiques de croissance des souche *E. coli* G133 et G271 en réacteur discontinu. Nous constatons que la croissance est toujours biphasique et que la souche G271 pousse plus lentement pendant la deuxième phase de la culture et qu'elle s'adapte moins rapidement que la souche G133.

➔ Les cinétiques de consommation des substrats sont représentées sur la **figure C 20 (a et b)**. Ces deux souches consomment l'APA avant le glucose (**Fig. C 20 a**). Ce comportement qui nous l'avons vu précédemment n'est pas courant, provient vraisemblablement de la mutation et non de la présence du plasmide. La phase de transition entre les deux substrats carbonés correspond au ralentissement de la croissance (entre 10h et 12h). La souche G133 s'adapte plus rapidement que la souche G271 au changement de substrat entre l'APA et le glucose. Nous retrouvons ce palier dans la cinétique de consommation de la peptone (**Fig. C 20 b**). Les allures des cinétiques de consommation et production des ions ammonium sont semblables pour ces deux souches (**Fig. C 20 b**).

Après une brève description du comportement de ces deux souches nous allons comparer leurs paramètres cinétiques.

➔ Pour la souche G271, la cinétique de croissance ainsi que l'évolution de la vitesse spécifique de production de la PA sont représentées sur la même **figure C 21**. La vitesse de production de la PA est maximum entre la 10ème et la 15ème heure de fermentation, c'est-à-dire en fin de phase exponentielle.

➔ Nous avons calculé les différents paramètres cinétiques pour chacune des deux souches G133 et G271 : les vitesses spécifiques maximum de croissance et de consommation des substrats, les rendements et la constante d'affinité pour le glucose. A partir de ces résultats, nous avons calculé le pourcentage de variation entre les paramètres cinétiques de la souche G271 et ceux de la souche G133, ces valeurs sont ensuite reportées **figure C 22**. Les taux de croissance calculés pendant la 1ère et la 2ème phase de la culture ( $\mu_1$  et  $\mu_2$ ) sont plus faibles pour la souche



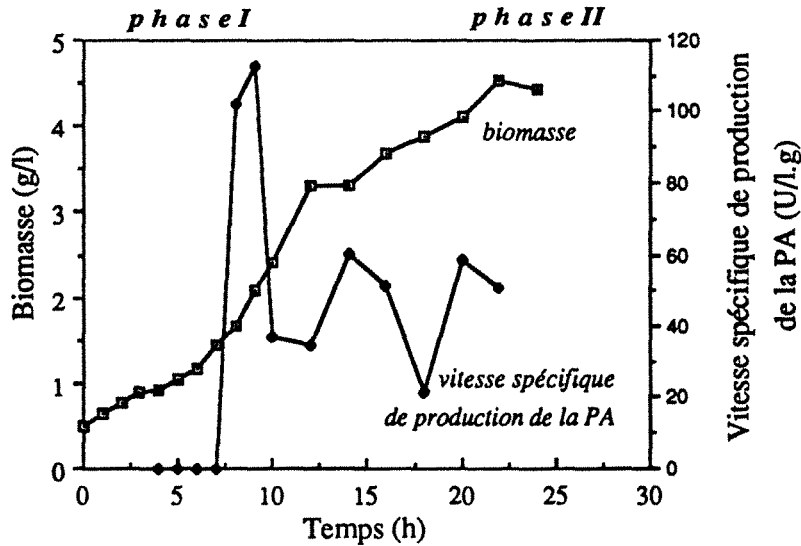


Figure C 21 : Cinétique de croissance et évolution de la vitesse spécifique de production de la PA au cours d'une fermentation en réacteur discontinu de la souche *E. coli* G271.

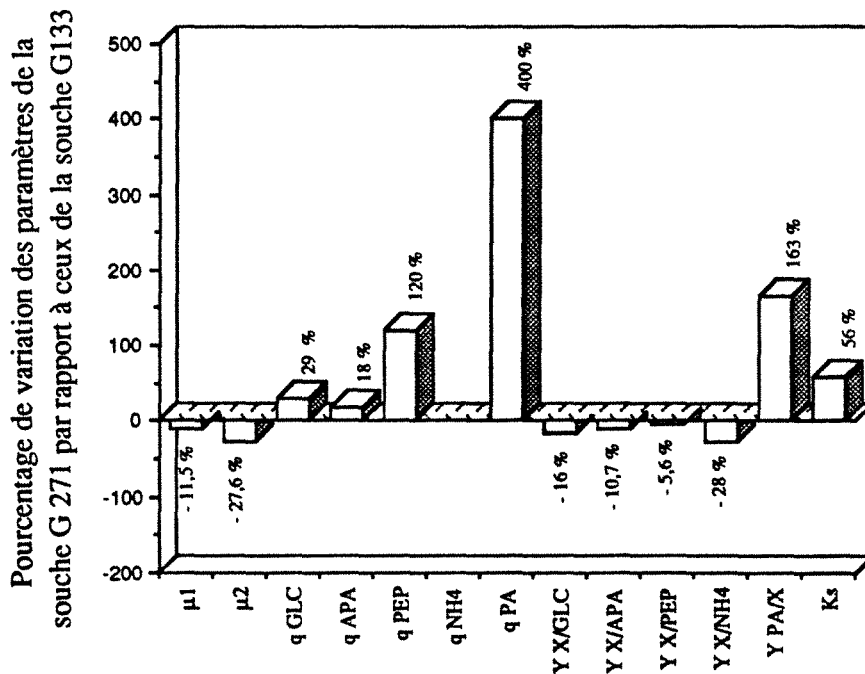


Figure C 22 : Comparaison des paramètres cinétiques entre la souche recombinée (G271) et la souche hôte (G133). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de variation du paramètre  $p$  de la souche G271 par rapport au même paramètre  $p$  de la souche G133.

$\mu_1$  et  $\mu_2$  : taux de croissance de la première et le deuxième phase de croissance.

$q_i$  : vitesse spécifique maximum de consommation du substrat  $i$

$Y_{a/b}$  : rendement de conversion de  $b$  en  $a$

$K_s$  : constante d'affinité pour le glucose

GLC : glucose, PEP. : peptone, APA : acide phénylacétique,  $NH_4$  : ions ammonium,

X : biomasse, PA : pénicilline acylase.

recombinée. En revanche, les vitesses spécifiques maximum de consommation des substrats et de production de PA ainsi que la constante d'affinité pour le glucose sont plus élevées pour la souche G271. Les rendements sont calculés globalement sur toute la fermentation. Les rendements de conversion des substrats en biomasse de la souche G271 sont tous plus faibles que ceux de la souche G133, et le rapport s'inverse pour le rendement de production de la PA à partir de la biomasse.

☞ En résumé, la souche recombinée pousse moins vite en consommant plus rapidement mais de façon moins efficace les substrats. Le plasmide représente donc un handicap pour la cellule car elle doit synthétiser, en plus par rapport à la souche mère, l'ADN et les protéines plasmidiques. En revanche la souche G271 a une vitesse spécifique de production de la PA nettement plus élevée. Le plasmide a donc un effet positif sur la production de cette enzyme, mais négatif sur la croissance.

☞ Plusieurs auteurs ont montré (SEO et BAILEY, 1985 et MASON et BAILEY, 1989) que le transport du glucose est plus lent chez les bactéries recombinées ce qui expliquerait que la croissance soit plus faible. D'autre part, MASON et BAILEY (1989) ont mis en évidence une modification de la répartition du glucose entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates en faveur de cette dernière. Ceci permet à la cellule recombinée de couvrir une demande plus importante en intermédiaires et en précurseurs (NADPH et pentoses phosphates). Mais globalement, l'activité de ces deux voies demeure plus faible pour la souche recombinée ce qui serait lié là aussi à un mauvais transport du glucose dans la cellule. Pour la souche G271, la constante d'affinité pour le glucose est plus forte, ce qui signifie que l'assimilation du glucose est perturbée.

☞ Durant la première phase de croissance, la synthèse de PA est faible. La vitesse spécifique de production de l'enzyme est maximum vers 10-15 h de fermentation, ce qui correspond au début de la seconde phase de croissance. Cette synthèse représente un surplus métabolique pour la cellule.

PERETTI et BAILEY (1989) ont eux aussi montré que la synthèse de  $\beta$ -lactamase se fait en fin de phase exponentielle sur milieu LB (milieu complexe) et pendant la phase exponentielle sur milieu M9 (milieu synthétique), c'est-à-dire en fait, quand le taux de croissance n'est pas trop élevé. Une augmentation de la synthèse des protéines hétérologues est dans certains cas liée à une multiplication du nombre de plasmides dans la cellule (STUEBER et BUJARD, 1982). Dans notre cas, une augmentation de la synthèse de la PA et/ou du contenu plasmidique pourrait expliquer que le taux de croissance diminue surtout pendant la deuxième phase.

☞ D'autre part la phase de transition entre la consommation de l'APA et du glucose s'effectue plus rapidement pour la souche G133. Ce résultat qui n'est pas encore décrit dans la littérature, est

en accord avec ceux de WEBER et SAN (1988 a) qui ont montré qu'une oscillation des taux de dilution en culture continue permet de stabiliser la concentration en cellules recombinées. Lorsque le taux de dilution est diminué, les cellules sauvages apparues au cours de la culture, s'adaptent à ce changement en diminuant leur taux de croissance. Puis le taux de dilution est augmenté, entraînant un lessivage des cellules sauvages avant qu'elles ne s'adaptent à ces nouvelles conditions. Les cellules recombinées, n'ayant pas eu le temps de s'adapter à la première modification du taux de dilution, ne sont pas lessivées. Ce procédé permet donc d'éliminer les cellules non recombinées. Mais WEBER et SAN (1989 b) ont ensuite montré en modifiant les paramètres de leur modèle de façon à ce que les résultats des simulations soient en accord avec les données expérimentales, que la variation du taux de dilution diminuait la probabilité de perte du plasmide. Ces auteurs n'ont pas donné d'explication à ce phénomène. Nos résultats permettent de compléter les observations faites par WEBER et SAN (1989 b). La présence du plasmide diminue la capacité d'adaptation de la cellule suite à une perturbation qui généralement est une modification du taux de croissance et qui dans notre cas est un changement de substrat.

☞ De nombreux auteurs (DA SILVA et BAILEY, 1986 et SEO et BAILEY, 1985) ont montré que la présence du plasmide provoque une diminution du rendement de conversion du glucose en biomasse. Nous obtenons ici le même type de résultat, mais nous précisons qu'il en est de même pour tous les substrats présents dans le milieu. De plus nous mettons en évidence que la souche recombinée consomme plus rapidement tous les substrats présents dans le milieu de culture.

☞ Nous constatons donc, en accord avec la littérature, que la présence du plasmide représente un fardeau pour la cellule, qui croît plus lentement et requiert plus de substrat pour sa croissance (rendements plus élevés). Nous ajoutons que la souche recombinée consomme les substrats plus rapidement mais de façon moins efficace et, d'autre part, qu'elle s'adapte moins rapidement à un changement de métabolisme. Par contre la présence du plasmide améliore la synthèse de la production de PA aussi bien en production spécifique qu'en vitesse de production : nous obtenons 4,5 fois plus d'enzyme avec la souche G271.

### II.3. - Influence du plasmide sur la cellule hôte :

Nous proposons maintenant de quantifier le surplus métabolique que représente le plasmide pour la cellule hôte en évaluant les quantités supplémentaires de substrats assimilées par la bactérie due à la présence du vecteur.

Nous utilisons les différences de rendements entre les deux souches afin d'évaluer la consommation supplémentaire de substrats de la souche G271 par rapport à la souche G133. Les

rendements précédemment calculés, sont exprimés en gramme de cellules formées par gramme de substrat consommé. Or une cellule recombinée est plus lourde que la cellule hôte dont elle est issue, à cause du poids représenté par l'ADN plasmidique et la protéine hétérologue (DA SILVA et BAILEY, 1986). Nous commençons donc par calculer l'augmentation de poids des cellules recombinées due à la quantité de protéines (**P**) et d'ADN plasmidiques (**D**).

Les formules de calcul de **P** (quantité de protéines plasmidiques) et **D** (quantité d'ADN plasmidique) ainsi que la composition en protéines et en ADN chromosomiques sont données dans l'article de DA SILVA et BAILEY (1986).

Ce calcul repose sur 2 hypothèses :

- (i) la protéine hétérologue a une composition semblable à la composition moyenne des protéines naturellement synthétisée par la cellule.
- (ii) une cellule recombinée a la même composition moyenne qu'une cellule "normale", exception faite de la quantité de protéines et d'ADN plasmidiques, c'est-à-dire que le contenu en polysaccharides, lipides, ARN, ADN chromosomique et protéines est le même.

Une cellule moyenne d'*E. coli* contient en poids 52,4 % de protéines et 3,2 % d'ADN chromosomique.

- ➔  $\delta$  représente la fraction de protéines produites par le plasmide par rapport aux protéines totales :  

$$\delta = P / [P + \text{protéines de la cellule}]$$
 où **P** représente la quantité de protéines plasmidiques
- ➔  $\beta$  est le nombre de paires de bases du plasmide (le chromosome a  $4,7 \cdot 10^6$  paires de bases)
- ➔ **n** est le nombre de copies de plasmide.

Le calcul de l'augmentation de poids est fait pour 100 g de cellules.

Pour 100 g de cellules recombinées :

➔ les protéines représentent 52,4 g  
 donc 
$$\delta = \frac{P}{P + 52,4}$$

soit 
$$P = 52,4 \cdot \frac{\delta}{1 - \delta}$$

➔ l'ADN chromosomique représente 3,2 g (pour  $4,7 \cdot 10^6$  paires de bases)  
 une paire de bases (pb) représente :  $3,2 / (4,7 \cdot 10^6)$  g/pb

or, le plasmide contient  $n \times \beta$  paires de bases, nous pouvons donc calculer **D** qui représente la quantité d'ADN plasmidique.



soit 
$$D = 3,2 \cdot \frac{n \cdot \beta}{4,7 \cdot 10^6}$$

Pour la souche G271 nous prenons :

- ➔  $\delta = 0,02$  (la PA représente 0,2 % des protéines totales)
- ➔  $n = 60$  (pour le pBR 322 n est compris entre 60 et 80)
- ➔  $\beta = 6800$  pb (plasmide pXL20)

En appliquant les formules précédentes pour calculer P et D, nous obtenons :

- ➔  $P = 1,07$  g
- ➔  $D = 27,8 \cdot 10^{-2}$  g

Donc pour 100 g de cellules recombinées, l'augmentation de poids est de 1,35 g soit 1,35 %.

Les rendements de conversion du glucose en biomasse sont respectivement pour les souches G133 et G271 de 0,6 g/g et 0,5 g/g

*Pour la souche G133 :*

$Y_{X^-/GLC} = 0,6$  : ce qui signifie que pour chaque gramme de glucose consommé 0,6 g de biomasse ( $X^-$ ) est formé, soit pour former 1 g de  $X^-$  il faut 1/0,6 g de glucose.

*Pour la souche G271 :*

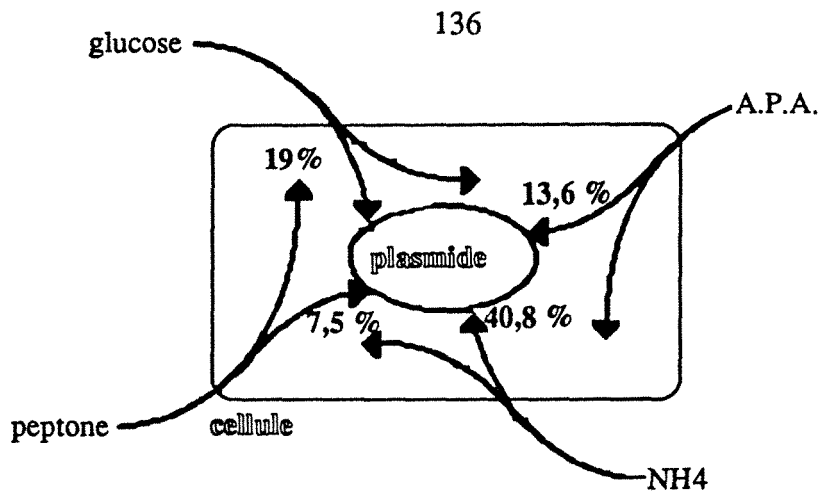
$Y_{X^+/GLC} = 0,5$  : ce qui signifie que pour chaque gramme de glucose consommé 0,5 g de biomasse ( $X^+$ ) est formé, soit pour former 1 g de  $X^+$  il faut 1/0,5 g de glucose.

Si nous considérons qu'une cellule non recombinée ( $X^-$ ) pèse m g, alors une cellule recombinée ( $X^+$ ) pèse  $m (1 + 1,35 \cdot 10^{-2})$  g

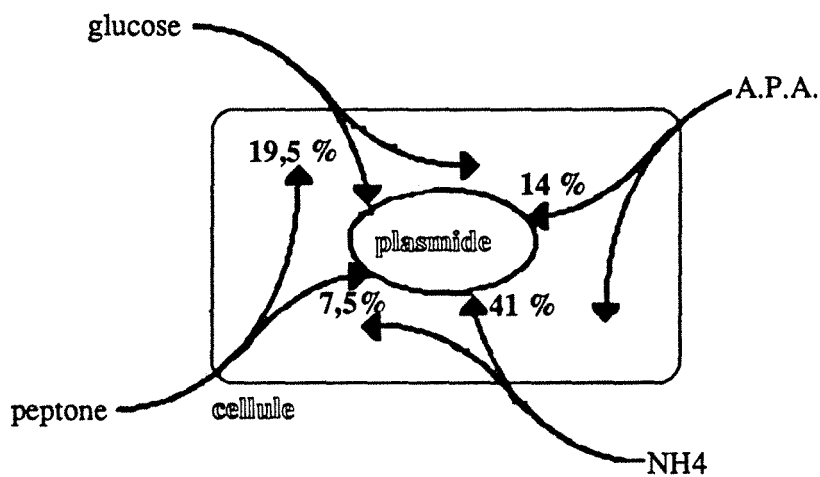
La quantité de glucose consommée pour former une cellule hôte est  $(m / 0,6)$  g, ce qui correspond une consommation de  $1,7 \cdot m$  g de glucose.

La quantité de glucose consommée pour former une cellule recombinée est  $(m [1 + 1,35 \cdot 10^{-2}] / 0,5)$  g, ce qui correspond une consommation de  $2,03 \cdot m$  g de glucose.

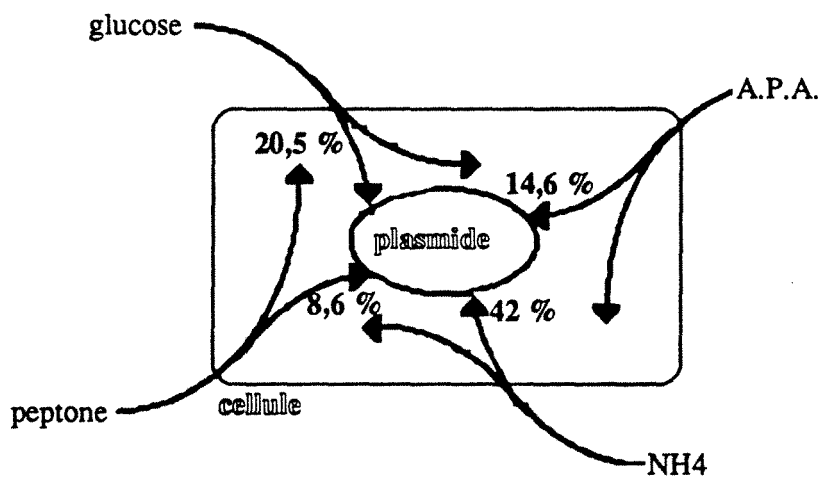
Les rendements de conversion du glucose en biomasse exprimés en gramme de glucose consommé par cellule formée sont respectivement pour les souches G133 et G271 de  $1,7 \cdot m$  et  $2,03 \cdot m$ . Donc une cellule recombinée consomme  $0,33 \cdot m$  g de glucose en plus à cause du plasmide ( $[2,03 \times m] - [1,7 \times m]$ ). Lorsqu'une cellule recombinée consomme du glucose, 16 % de la



**Figure C 23** : Répartition des substrats entre la cellule et le plasmide  
 $n = 60$  et  $\partial = 2\%$



**Figure C 24** : Répartition des substrats entre la cellule et le plasmide  
 $n = 120$  et  $\partial = 2\%$



**Figure C 25** : Répartition des substrats entre la cellule et le plasmide  
 $n = 60$  et  $\partial = 4\%$

quantité assimilée est due à la présence du plasmide ( $([0,33m+2,03m] \times 100)$ ). La consommation supplémentaire de glucose due à la présence du plasmide représente 18 % de la quantité assimilée par la cellule ( $([0,31m+1,7m] \times 100)$ ).

➔ Les mêmes calculs sont réalisés sur chaque rendement de conversion des substrats en biomasse. Ainsi, pour chaque substrat, la consommation supplémentaire due à la présence du vecteur est calculée. Nous pouvons ainsi construire la **figure C 23** qui schématise l'influence du vecteur sur la consommation des substrats d'une cellule recombinée de la souche G271.

Pour la souche G271, nous constatons que 19 % de la consommation de glucose, 14 % de la consommation de l'APA, 41 % de la consommation des ions ammonium et 7,5 % de la consommation de peptone sont utilisés pour réaliser la multiplication de l'ADN plasmidique et la synthèse des enzymes codées par le vecteur. Les flux en glucose et en ions ammonium, assimilés pendant la deuxième phase de croissance, sont plus perturbés que ceux de la peptone et de l'APA qui eux, sont consommés en début de fermentation. La production de l'enzyme et éventuellement une élévation du contenu plasmidique se traduirait par une modification des flux de consommation des substrats en faveur du plasmide.

➔ Sur les **figures C 24 et C 25** nous reportons les résultats des calculs réalisés respectivement pour un nombre de copies de plasmides par cellule plus élevé ( $n$ ) et un pourcentage d'expression de la PA par rapport aux protéines totales plus important ( $\delta$ ). Une amélioration du taux de synthèse de l'enzyme (**figure C 25**) entraîne une plus forte modification des flux de consommation des substrats due à la présence du vecteur, qu'une augmentation du nombre de copies de plasmides par cellule (**figure C 24**). D'après ces résultats, le fardeau métabolique que représente le plasmide pour la cellule hôte, est dû à la replication du plasmide mais aussi et surtout à la synthèse de la PA. DA SILVA et BAILEY (1986) précisent que la polymérisation des protéines consomme beaucoup d'ATP dans la cellule. L'augmentation de la synthèse de la PA serait responsable des perturbations du comportement de la souche G271 pendant la deuxième phase de croissance.



***PARTIE D***

---

***ETUDES DES CINETIQUES ET DES PERFORMANCES  
DES CULTURES EN REACTEUR DISCONTINU,  
SEMI-CONTINU ET CONTINU***

---



## PARTIE D : ETUDE DES CINÉTIQUES ET DES PERFORMANCES DES CULTURES EN REACTEURS DISCONTINU, SEMI-CONTINU ET CONTINU

<b>I - Etude des cinétiques et des performances en culture discontinue</b>	p 145
<b>I.1. - <u>Remarque préliminaire sur l'évolution de la souche <i>E. coli</i> G271</u></b>	p 145
<b>I.2. - <u>Influence de la peptone</u></b>	p 145
<i>I.2.1. - Variation de la concentration initiale en peptone</i>	p 147
I.2.1.1. - Description des cultures discontinues réalisées à des concentrations initiales en peptone variables	p 147
I.2.1.2. - Influence de la concentration initiale en peptone sur la croissance	p 149
I.2.1.3. - Influence de la concentration initiale en peptone sur la consommation des substrats	p 149
I.2.1.4. - Influence de la concentration initiale en peptone sur la production de pénicilline acylase	p 152
<i>I.2.2. - Cinétiques et performances d'une culture réalisée avec seulement de la peptone</i>	p 155
<i>I.2.3. - Cinétiques et performances d'une culture réalisée sans peptone</i>	p 155
<i>I.2.4. - Influence de l'ajout de l'extrait de levure</i>	p 158
<i>I.2.5. - Conclusion sur l'influence de la peptone</i>	p 158
<b>I.3. - <u>Influence du glucose</u></b>	p 161
<i>I.3.1. - Variation de la concentration initiale en glucose</i>	p 161
I.3.1.1. - Description des cultures discontinues réalisées à des concentrations initiales en glucose variables	p 161
I.3.1.2. - Influence de la concentration initiale en glucose sur la croissance	p 163
I.3.1.3. - Influence de la concentration initiale en glucose sur la consommation des substrats	p 163
I.3.1.4. - Influence de la concentration initiale en glucose sur la production de pénicilline acylase	p 163
<i>I.3.2. - Conclusion sur l'influence du glucose</i>	p 166

<b>I.4. - <u>Influence de l'acide phénylacétique</u></b>	p 166
<i>I.4.1. - Variation de la concentration initiale en acide phénylacétique</i>	p 166
I.4.1.1. - Description des cultures discontinues réalisées à des concentrations initiales en acide phénylacétique variables	p166
I.4.1.2. - Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la croissance	p 168
I.4.1.3. - Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la consommation des substrats	p 168
I.4.1.4. - Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la production de pénicilline acylase	p 168
<i>I.4.2. - Cinétiques et performances d'une culture réalisée sans acide phénylacétique</i>	p 168
<i>I.4.3. - Cinétiques et performances d'une culture réalisée avec de l'acide phénylacétique et sans glucose</i>	p 171
<i>I.4.4. - Conclusion sur l'influence de l'acide phénylacétique</i>	p 171
<b>I.5. - <u>Analyse de la limitation de la densité cellulaire en culture discontinue</u></b>	p 171
<i>I.5.1. - Supplémentation d'un surnageant de fin de culture avec les différents composants du milieu</i>	p 174
<i>I.5.2. - Supplémentation d'un surnageant de fin de culture avec des concentrations croissantes en nutriments</i>	p 174
<b>I.6. - <u>Conclusion</u></b>	p 178
<b>II - Etude des cinétiques et des performances en culture semi-continue</b>	p 179
<b>II.1. - <u>Etude des cinétiques et performances en fonction du mode d'alimentation</u></b>	p 179
<i>II.1.1.- Culture semi-continue avec un ajout de glucose</i>	p 181
<i>II.1.2.- Culture semi-continue avec un ajout de glucose et d'une source d'azote</i>	p 183
II.1.2.1.- Culture semi-continue avec un ajout de glucose et de sulfate d'ammonium	p 183
II.1.2.2.- Culture semi-continue avec un ajout de glucose et de chlorure d'ammonium	p 183
II.1.2.3.- Influence de la source azotée sur les performances des cultures semi-continues	p 185
<i>II.1.3.- Culture semi-continue avec une alimentation continue en glucose et en sulfate d'ammonium</i>	p 187



<i>II.1.4.- Comparaison des performances entre les fermentations semi-continues réalisées en ajoutant du glucose et/ou une source d'azote</i>	p 187
<b>II.2. - <u>Etude de l'ajout de l'acide phénylacétique</u></b>	p 191
<i>II.2.1. - Alimentation du réacteur avec du glucose et de l'APA</i>	p 191
<i>II.2.2. - Alimentation du réacteur avec de l'acide phénylacétique</i>	p 193
<i>II.2.3. - Comparaison des cultures semi-continues réalisées avec une alimentation mixte glucose et APA et une alimentation ne contenant que de l'APA</i>	p 195
<b>II.3. - <u>Conclusion</u></b>	p 197
<b>III - Etude des cinétiques et des performances en cultures continues</b>	p 200
<b>III.1. - <u>Etude des cinétiques et des performances en culture continue</u></b>	p 202
<i>III.1.1. - Faible taux de dilution</i>	p 202
<i>III.1.2. - Taux de dilution intermédiaire</i>	p 204
<i>III.1.3. - Taux de dilution élevé</i>	p 206
<i>III.1.4. - Faible taux de dilution et forte concentration en peptone dans l'alimentation</i>	p 211
<b>III.2. - <u>Etude de la stabilité du plasmide</u></b>	p 213
<i>III.2.1. - Influence du taux de dilution et de la composition du milieu d'alimentation sur la stabilité du contenu plasmidique</i>	p 213
<i>III.2.2. - Discussion</i>	p 216
<b>III.3. - <u>Conclusion</u></b>	p 217
<b>IV - Comparaison des cinétiques et des performances de la souche G271 dans les trois modes de culture</b>	p 218
<b>IV.1. - <u>Comparaison des cinétiques de la souche G271 dans les trois modes de culture</u></b>	p 218
<i>IV.1.1. - Croissance et production de pénicilline acylase</i>	p 218
<i>IV.1.2. - Consommation de la peptone</i>	p 219
<i>IV.1.3. - Consommation du glucose et de l'acide phénylacétique</i>	p 219
<i>IV.1.4. - Consommation des ions ammonium</i>	p 219
<b>IV.2. - <u>Comparaison des performances de la souche G271 dans les trois modes de culture</u></b>	p 221



## **PARTIE D : ETUDE DES CINETIQUES ET DES PERFORMANCES DES CULTURES EN REACTEURS DISCONTINU, SEMI-CONTINU ET CONTINU**

Les milieux complexes sont couramment utilisés et notamment pour la production de PA, mais le comportement des microorganismes sur de tels milieux ne sont pas détaillés : les substrats sont nombreux et les interactions entre eux sont difficiles à interpréter. Le milieu "peptone" est un milieu complexe dans lequel quatre substrats ont été identifiés : la peptone, le glucose, l'APA et les ions ammonium. Dans la partie C, nous avons déterminé les conditions de culture favorables à la production de la PA. Dans cette partie D, nous allons étudier d'une part les cinétiques afin de comprendre le comportement de la souche pour être en mesure de le modéliser par la suite, et d'autre part les performances pour les fermentations discontinues, semi-continues et continues. Le plan de la partie D est schématisé par la **figure D 1**.

⇒ Les cultures discontinues nous permettront d'étudier les interactions entre les substrats carbonés et azotés, la croissance et la production de PA.

⇒ Les cultures semi-continues nous permettront de confirmer les résultats obtenus en culture discontinue, mais elles seront surtout utilisées pour améliorer les performances de la souche *E. coli* G271. Ce mode de culture est employé pour augmenter les productivités volumétriques en biomasse et en PA, les concentrations cellulaires et enzymatiques ainsi que la production spécifique en PA. Suite à l'étude préliminaire réalisée en réacteur discontinu (TAHA, 1987), de l'extrait de levure est ajouté au milieu "peptone" afin de favoriser la croissance.

⇒ Les cultures continues permettront de compléter les connaissances acquises sur le comportement de la souche, et notamment d'étudier la stabilité du vecteur. L'instabilité du contenu plasmidique est un des problèmes majeur inhérent à l'utilisation des microorganismes recombinés. Le mode de culture continu est un outil très employé pour étudier l'instabilité du vecteur et notamment l'influence du taux de croissance et de la composition du milieu de culture sur ce paramètre.

⇒ Toutes ces données cinétiques seront finalement exploitées pour décrire le comportement de la souche *E. coli* G271, qui sera repris dans la partie suivante pour construire un modèle mathématique. D'autre part, les performances obtenues avec ces trois modes de culture seront comparées afin de déterminer laquelle est la plus appropriée à la production de PA. Nous emploierons trois critères de comparaison : la productivité volumétrique en enzyme, la production spécifique et le coût en matières premières de production de la PA.



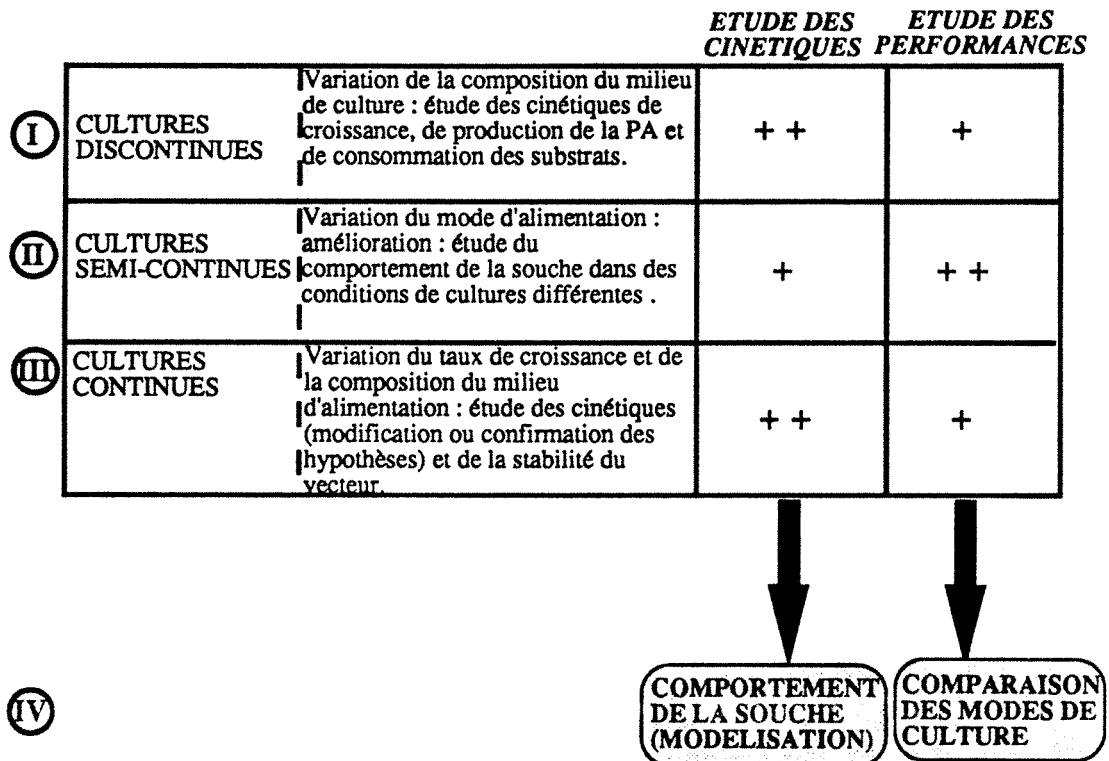
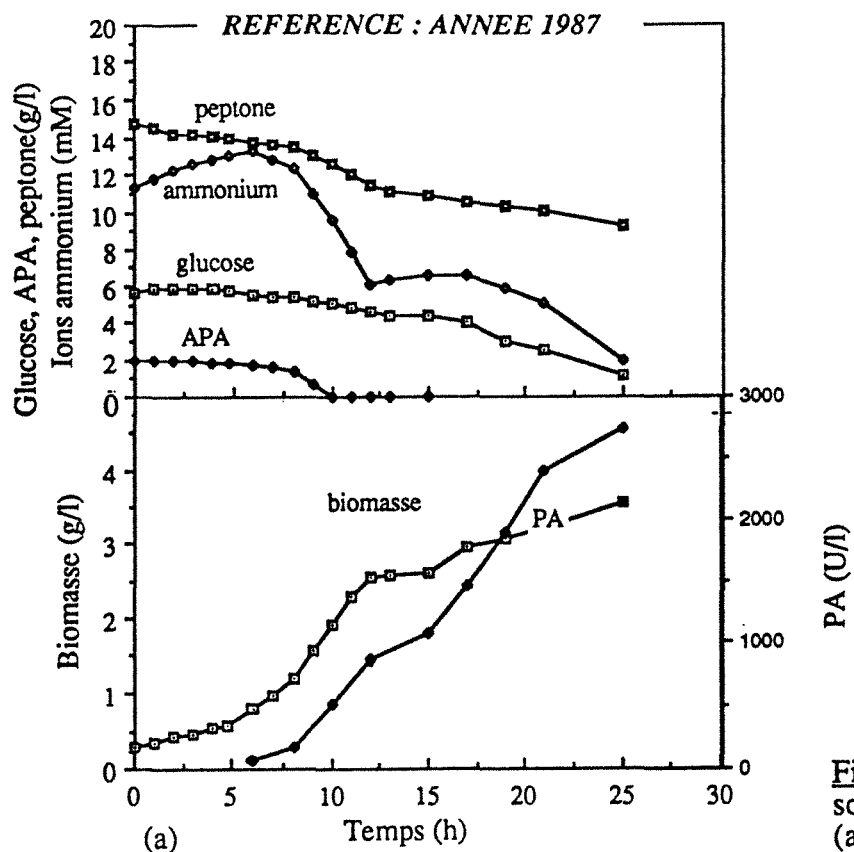
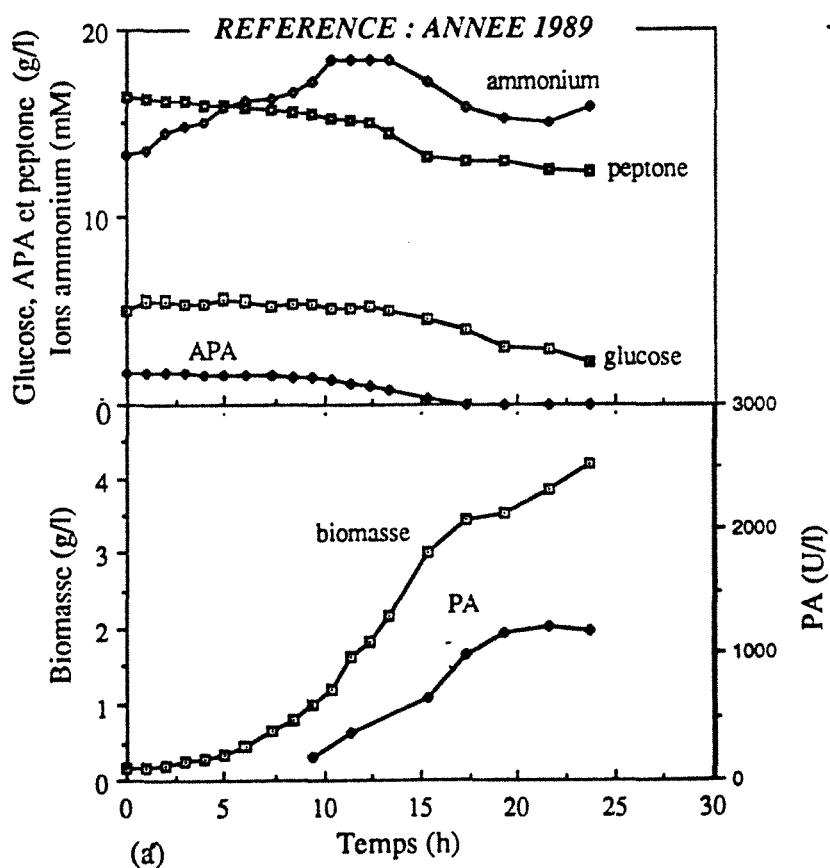


Figure D 1 : Plan de la partie D 1 (++ : contribution importante, + : faible contribution)



**Figure D 2 :** Evolution de la souche *E. coli* G271 entre 1987 (a) et 1989 (a') : comparaison des cinétiques de croissance et de consommation des substrats (glucose, acide phénylacétique -APA- et ions ammonium -NH<sub>4</sub>-) en réacteur discontinu .



## I. - Etude des cinétiques et des performances en culture discontinue

Nous commençons l'étude du comportement de la souche *E. coli* G271 en réacteur discontinu. Utilisant les conditions de cultures précédemment définies (partie C), nous étudierons l'influence de chaque substrat (peptone, glucose et APA) sur la croissance et la production de PA ainsi que les interactions entre eux. Cette étude est réalisée d'une part en faisant varier la concentration initiale en substrat et d'autre part en le supprimant du milieu de culture. Finalement, nous terminerons cette partie par l'analyse de la limitation de la densité cellulaire en culture discontinue.

### I.1. - Remarque préliminaire sur l'évolution de la souche *E. coli* G271 :

Les résultats cinétiques ont été obtenus à partir de fermentations réalisées entre 1987 et 1989.

➔ La figure D 2 a et a' décrit l'évolution des cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de PA pour 2 cultures discontinues réalisées en 1987 et 1989. Les cinétiques de croissance sont identiques mis à part un temps de latence plus long pour la fermentation 2 a'. De ce fait, les cinétiques de consommation de substrats sont décalées dans le temps mais l'allure des courbes est la même. En revanche, nous constatons que les performances de la souche ont évolué au cours de ces 3 années. Si nous ne pouvons pas comparer les concentrations finales en PA car pour la fermentation 2 a' la croissance n'est pas terminée en 24 h, nous observons que les productivités spécifiques sont de 780 et 280 U/g respectivement pour les fermentations 2 a et 2 a'. Cette baisse de performance peut être due à une mauvaise conservation de la souche, une diminution du contenu plasmidique ou une modification dans la structure de l'ADN (plasmidique ou chromosomique). Aussi, nous utilisons ces deux fermentations comme référence afin de pouvoir comparer les fermentations qui leur sont contemporaines.

### I.2. - Influence de la peptone :

Afin de déterminer l'influence de la peptone sur les cinétiques et les performances de la souche *E. coli* G271, nous allons procéder en 4 étapes :

⇒ étude de l'influence de la concentration initiale en peptone sur la croissance, la consommation des substrats et la production de PA,

⇒ comparaison des cinétiques entre une culture réalisée sur un milieu contenant seulement de la peptone et une culture standard,

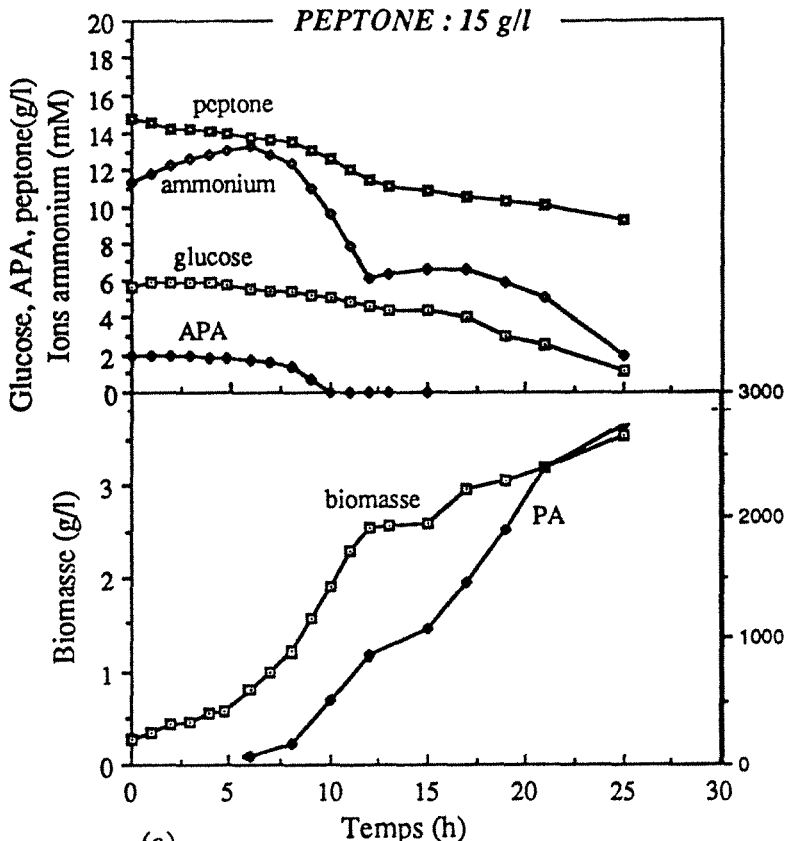
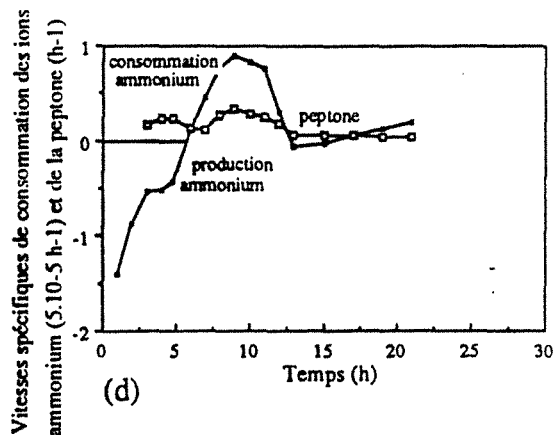
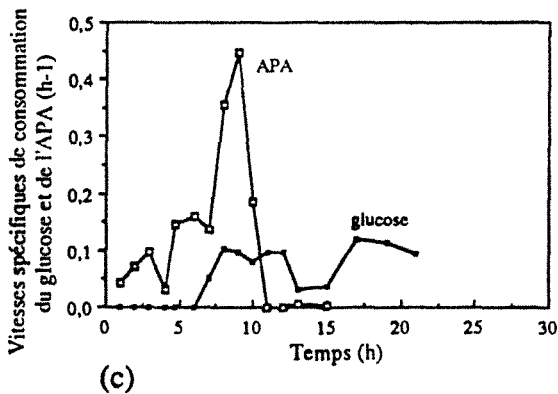
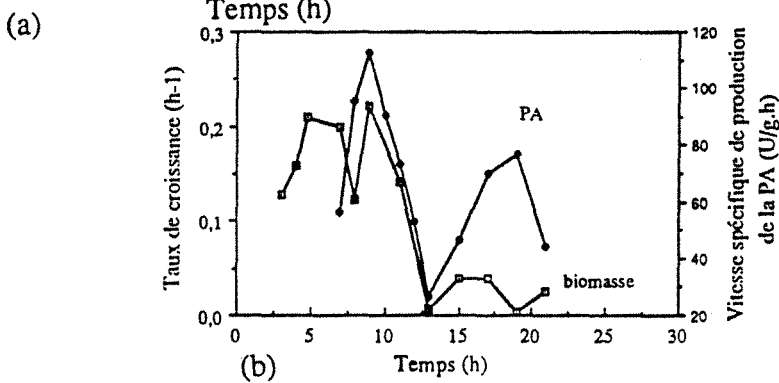


Figure D 3: Culture en réacteur discontinue de la souche *E. coli* G271.

➤ cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de la PA (a),

➤ évolution au cours du temps des vitesses spécifiques de croissance (a), de production de PA (b) et de consommation des substrats (c et d).





⇒ comparaison des cinétiques entre une culture réalisée sur un milieu sans peptone et une culture standard,

⇒ étude de l'ajout de l'extrait de levure dans le milieu de culture. L'extrait de levure permet d'améliorer la croissance de la souche, et nous étudierons l'influence de ce substrat sur le comportement de la souche *E. coli* G271.

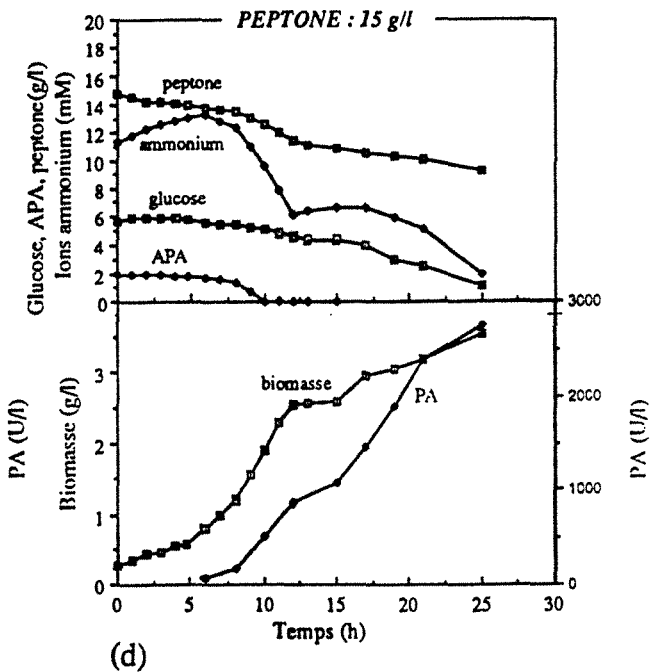
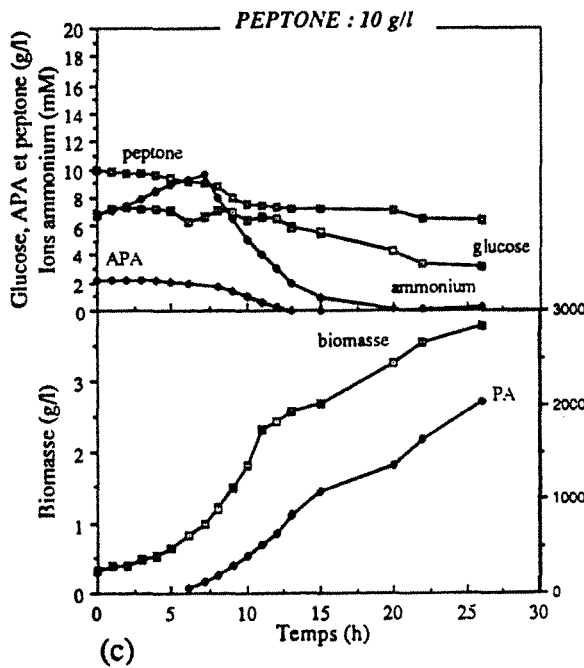
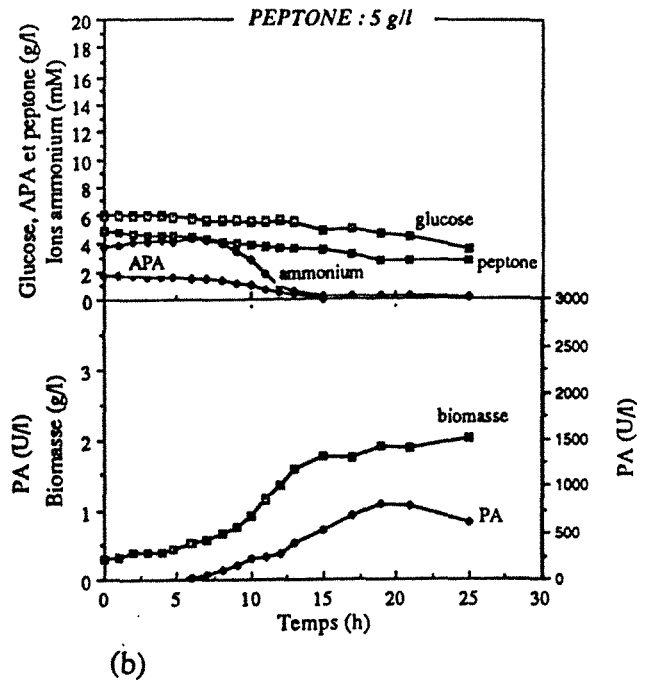
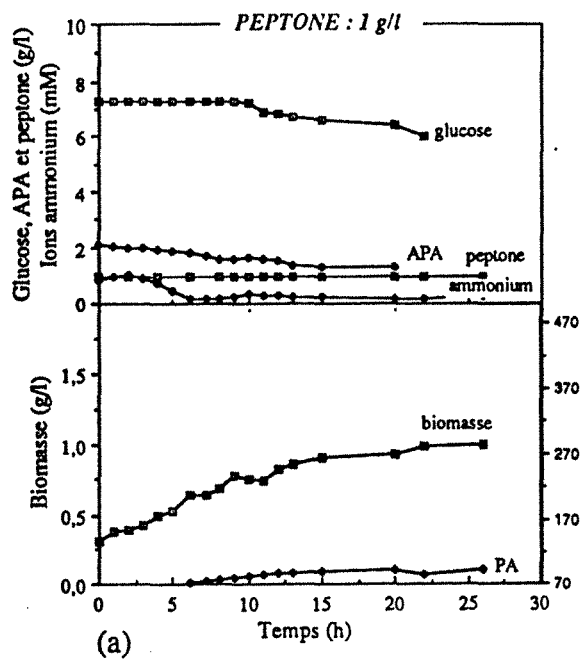
### 1.2.1. - Variation de la concentration initiale en peptone

Plusieurs cultures ont été mises en œuvre en faisant varier les concentrations initiales en peptone entre 1 et 15 g/l, les autres conditions sont maintenues constantes. Après avoir décrit les différentes cinétiques pour chaque fermentation, nous étudierons plus en détail l'influence de la concentration initiale en peptone sur la croissance, la consommation des substrats et finalement sur la production de la PA.

#### 1.2.1.1. - Description des cultures discontinues réalisées à des concentrations initiales en peptone variables

Nous commençons cette partie par une description détaillée d'une fermentation standard.

➤ La figure D 3 (a, b, c et d) représente les cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de la PA au cours d'une culture discontinue de la souche *E. coli* G271 réalisée avec initialement 15 g/l de peptone. La phase exponentielle débute après une phase de latence de 3 h. A la 12<sup>ème</sup> heure de culture la croissance s'infléchit puis reprend avec un taux de croissance plus faible (a et b). Les vitesses spécifiques de croissance et de production de la PA évoluent de la même façon au cours de la fermentation (b). La vitesse spécifique de croissance est de  $0,2 \text{ h}^{-1}$  (b). La production de la PA est associée à la croissance. L'APA et la peptone sont consommés dès le début de la fermentation (a). La vitesse spécifique de consommation de l'APA augmente pendant les 10 premières heures de la culture puis s'annule. Les valeurs élevées obtenues à la 7<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> heure de culture ne sont pas significatives car la consommation est rapide et le nombre de points est faible. La transition entre la consommation de l'APA et du glucose est responsable de l'arrêt de la croissance à la 12<sup>ème</sup> heure de culture. Le glucose est assimilé à partir de la 6<sup>ème</sup> heure de culture (a). La vitesse spécifique de consommation du glucose est nulle pendant les 6 premières heures de culture, puis elle augmente alors que la vitesse spécifique de consommation de l'APA s'annule (b) : l'APA est consommé avant le glucose. Les ions ammonium sont produits pendant les 6 premières heures de la culture, puis sont assimilés (a). Les vitesses spécifiques de consommation des ions ammonium et de la peptone s'annulent à la 10<sup>ème</sup> heure lorsque la croissance est nulle (pour les ions ammonium leur consommation correspond à une valeur positive).



**Figure D 4 :** Influence de la concentration en peptone sur les cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation du glucose, de l'acide phénylacétique (APA) et des ions ammonium ( $\text{NH}_4$ ) d'une culture en réacteur discontinu de la souche *E. coli* G271.

➤ courbes (a), (b), (c) et (d) : les concentrations initiales en peptone sont respectivement de 1, 5, 10 et 15 g/l.

➔ La figure D 4 (a, b, c et d) permet de comparer les cinétiques des fermentations réalisées à des concentrations initiales en peptone variable. Si nous supprimons la peptone du milieu de culture, la croissance est nulle. Pour une concentration initiale en peptone de 1 g/l, la croissance, la consommation des substrats et la production de la PA sont très faibles (a). En fin de culture, nous obtenons seulement 1 g/l de biomasse. Pour les autres cultures, la concentration initiale en peptone ne modifie pas l'allure des cinétiques. La croissance est toujours biphasique et la succession entre les consommations de substrat est la même. Pour des concentrations initiales en peptone de 5 et 10 g/l, les ions ammonium sont complètement consommés (b et c).

#### I.2.1.2. - Influence de la concentration initiale en peptone sur la croissance

➔ La figure D 5 décrit l'évolution du taux de croissance en fonction de la concentration initiale en peptone. En absence de peptone, la souche *E. coli* G271 ne croît pas. Nous avons vu dans la partie A que cette souche est issue de la souche ATCC 9637 qui a besoin pour sa croissance de nombreux acides aminés. Une augmentation de la concentration initiale en peptone entre 1 et 15 g/l entraîne une augmentation du taux de croissance de la première phase (calculé pendant les 10 premières heures), qui atteint une valeur maximum de  $0,2 \text{ h}^{-1}$  pour la dernière concentration utilisée (15 g/l). Pour les 3 premières concentrations initiales en peptone, la croissance s'arrête lorsque les ions ammonium sont épuisés. Pour la culture réalisée avec initialement 15 g/l de peptone, la croissance en fin de culture est très faible alors que tous les substrats ne sont pas encore épuisés. A l'aide de ces courbes, nous calculons le rendement de conversion du glucose en biomasse (0,9 g/g) et celui de l'APA (1,5 g/g).

#### I.2.1.3. - Influence de la concentration initiale en peptone sur la consommation des substrats

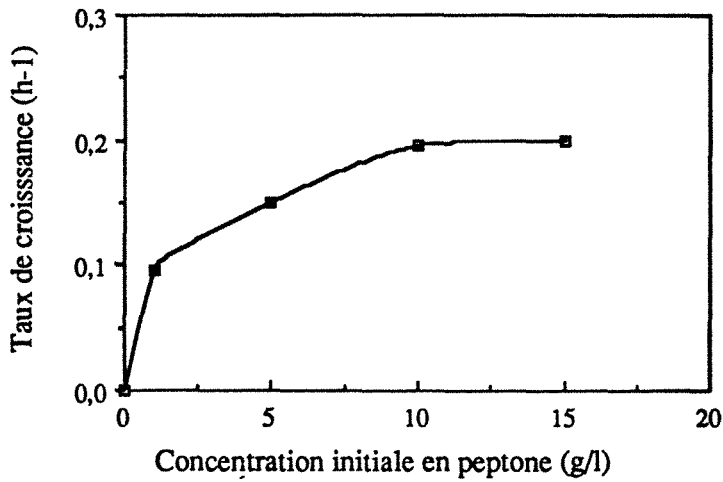
##### Influence de la concentration initiale en peptone sur la consommation du glucose et de l'APA :

➔ La figure D 6 (a et b) représente l'évolution du glucose et de l'APA consommés en fonction de la biomasse formée. Les points correspondant aux différentes fermentations sont regroupés, mettant en évidence que la concentration initiale en peptone n'a pas d'influence sur l'assimilation de ces deux substrats : les rendements stoechiométriques de conversion du glucose et de l'APA en biomasse sont constants.

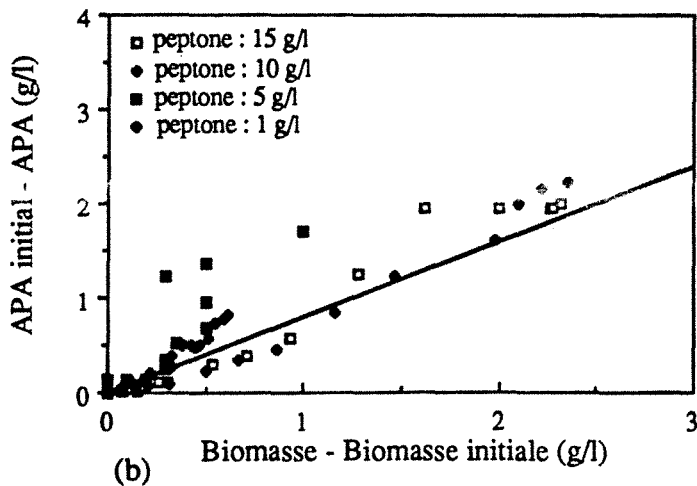
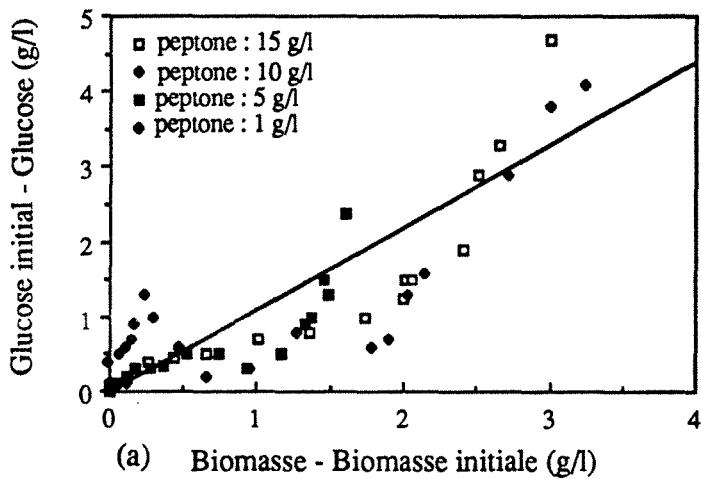
##### Influence de la concentration initiale en peptone sur la consommation de la peptone :

➔ L'évolution des concentrations en peptone au cours de ces 4 fermentations sont reportées sur la figure D 7. La concentration finale en peptone n'est jamais nulle, elle se stabilise à une valeur qui est d'autant plus élevée que la concentration initiale en peptone est forte. L'azote de la peptone n'est pas entièrement assimilable par la bactérie. Pour les concentrations initiales en peptone de 5,

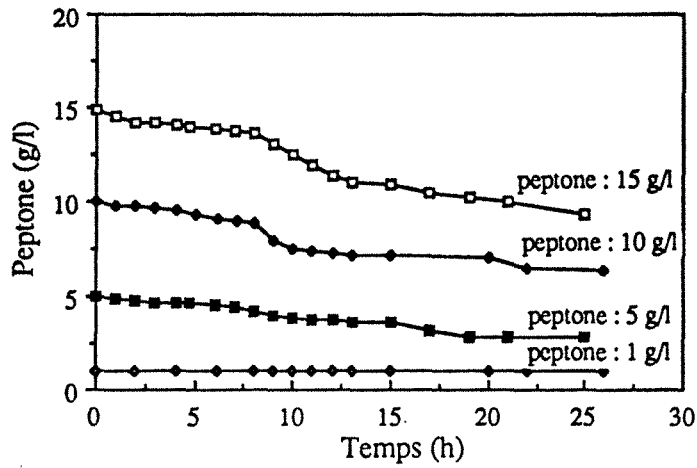




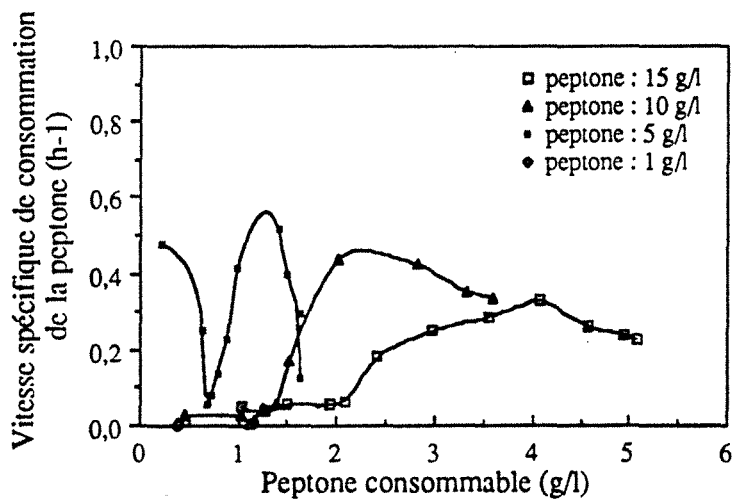
**Figure D 5:** Influence de la concentration initiale en peptone sur le taux de croissance de la souche *E. coli* G271 (culture en réacteur discontinu).



**Figure D 6:** Influence de la concentration initiale en peptone sur l'évolution du glucose (a) et de l'APA (b) consommés en fonction de la biomasse formée.



**Figure D 7 :** Influence de la concentration initiale en peptone sur les cinétiques de consommation de ce substrat (cultures discontinues de la souche *E. coli* G271).  
 > concentrations initiales en peptone de 1, 5, 10 et 15 g/l.



**Figure D 8 :** Influence de la concentration initiale en peptone sur la vitesse spécifique de consommation de ce substrat (cultures discontinues de la souche *E. coli* G271).  
 > concentrations initiales en peptone de 1, 5, 10 et 15 g/l.

10 et 15 g/l, il reste respectivement en fin de fermentation 2,8, 6,4 et 9,3 g/l de peptone. La concentration finale en peptone est en moyenne égale à 60 % de la quantité initiale. La variation de la concentration en peptone pour la fermentation menée avec 1 g/l de peptone est trop faible pour être prise en compte.

➔ La **figure D 8** rend compte de l'évolution des vitesses spécifiques de consommation de la peptone en fonction de la peptone assimilable, c'est-à-dire en retranchant à la valeur de la concentration résiduelle en peptone la quantité de peptone non assimilable. La précision des dosages de la peptone par rapport à la variation de sa concentration, ne permet pas de réaliser des calculs très précis de la vitesse spécifique de consommation de ce substrat. Aussi, pour les cultures réalisées à des concentration initiales en peptone de 1 et 5 g/l la vitesse spécifique de consommation de ce substrat chute très rapidement. Cependant, l'exploitation de ces grandeurs pour les deux autres cultures met en évidence que la vitesse spécifique de consommation de la peptone suit une loi de type michaelien, c'est-à-dire que la consommation de la peptone est limitée par sa propre concentration.

#### Influence de la concentration initiale en peptone sur la consommation des ions ammonium :

➔ Les cinétiques de consommation des ions ammonium pour ces 4 fermentations discontinues sont semblables (**Fig. 4 a à d**). Pour les fermentations réalisées à de faibles concentrations en peptone (1 et 5 g/l), la concentration en ions ammonium est nulle à la 12ème heure de culture. Pour une concentration initiale en peptone de 10 g/l, les ions ammonium sont épuisés à la 15ème heure de culture. Lorsque la concentration initiale en peptone est de 15 g/l, les ions ammonium ne sont pas complètement assimilés. Quelle que soit la concentration initiale en peptone l'allure de la cinétique des ions ammonium est la même, il y a une phase de production puis une phase de consommation.

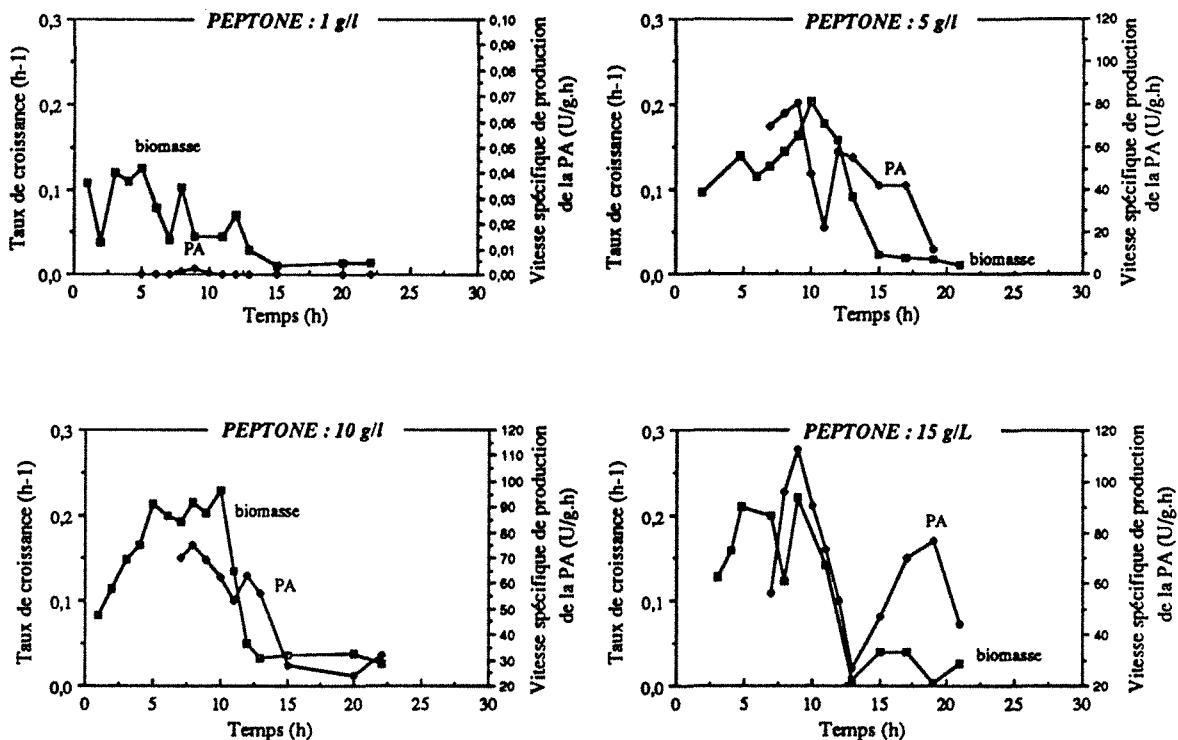
#### **I.2.1.4. - Influence de la concentration initiale en peptone sur la production de pénicilline acylase**

➔ Les évolutions au cours du temps du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA de chaque culture sont reportées **figure D 9 (a, b, c et d)**. Pour la plus faible concentration en peptone, le taux de croissance reste faible, et la vitesse spécifique de production de l'enzyme est nulle. Pour les trois autres cultures, nous constatons que ces deux grandeurs augmentent pendant les 10 premières heures de la culture puis ensuite diminuent. Le taux de croissance et la vitesse spécifique de production de la PA sont donc associés.

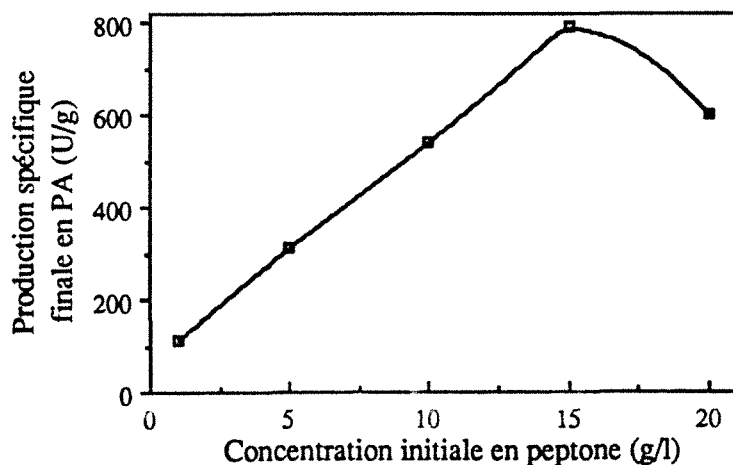
➔ La **figure D 10** permet de comparer les performances de ces différentes cultures. Nous avons reporté sur cette figure, la valeur de la production spécifique finale en fonction de la concentration



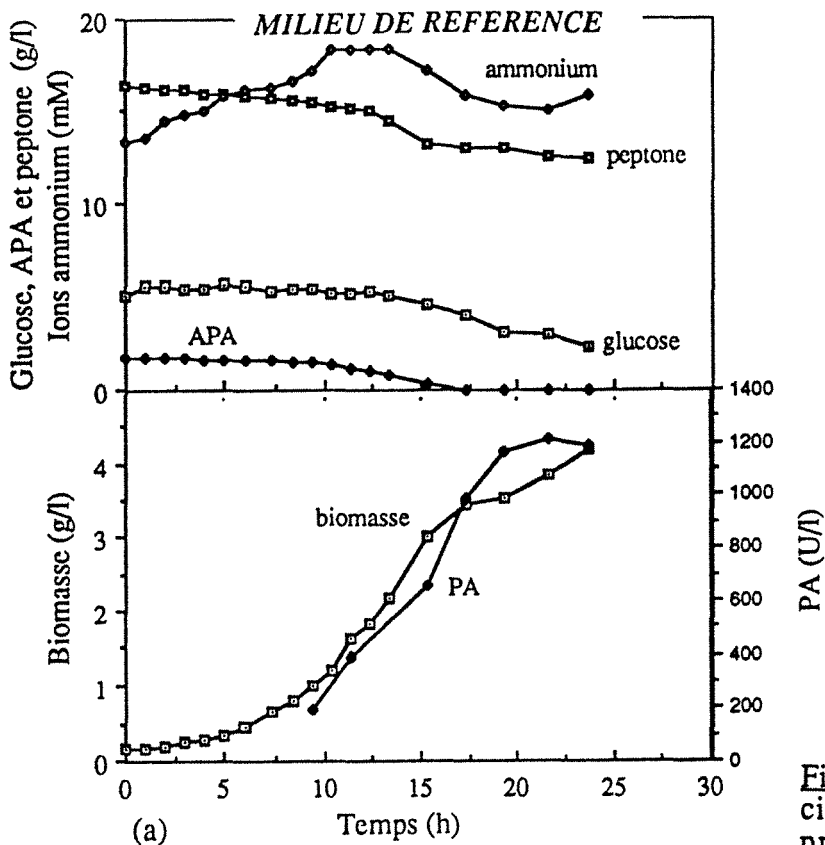




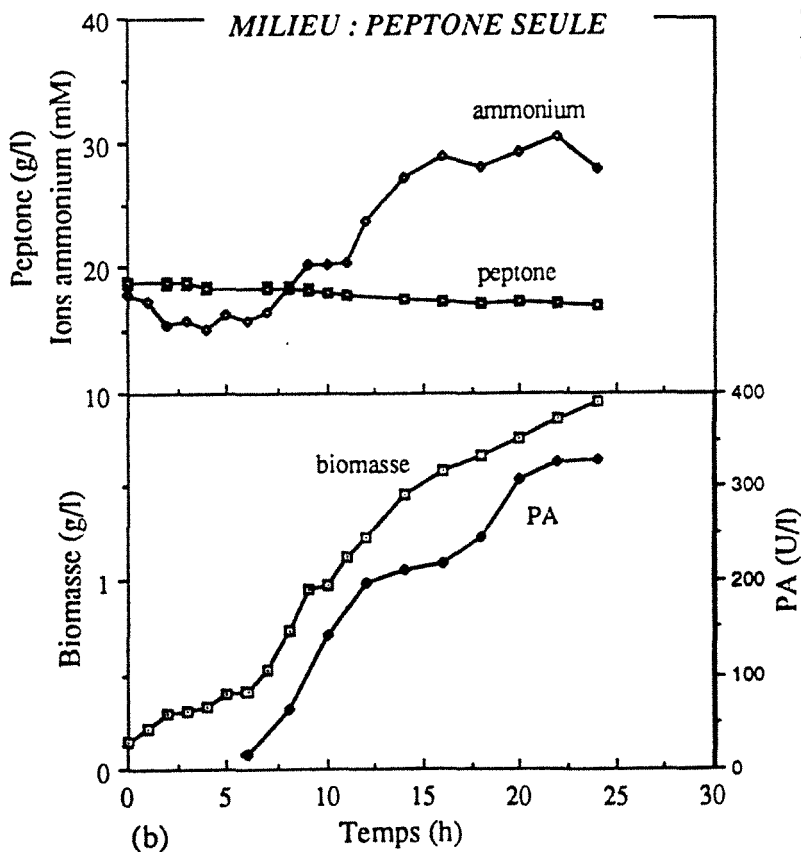
**Figure D 9 :** Influence de la concentration initiale en peptone sur le taux de croissance et la vitesse spécifique de production de la PA (cultures discontinues de *E. coli* G271).  
 ➤ concentrations initiales en peptone de 1, 5, 10 et 15 g/l.



**Figure D 10 :** Influence de la concentration initiale en peptone sur la production spécifique de PA par la souche *E. coli* G271 (réacteur discontinu).



**Figure D 11 :** Comparaison des cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats entre la culture de référence (a) et une culture réalisée sur un milieu contenant seulement de la peptone (b).



initiale en peptone. L'augmentation de la concentration initiale en peptone entraîne une augmentation de la production spécifique.

### *1.2.2. - Cinétiques et performances d'une culture réalisée avec seulement de la peptone*

Nous utilisons pour cette étude deux fermentations :

- une fermentation est réalisée sur le milieu de référence (milieu "peptone"),
- une fermentation est réalisée sur le milieu où la peptone est le seul substrat.

➔ La **figure D 11 (a et b)** permet de comparer l'allure des cinétiques entre ces deux fermentations. Les cinétiques de croissance et de consommation de la peptone sont semblables pour ces deux cultures. Les concentrations finales en biomasse et en PA sont plus faibles sur le milieu ne contenant que de la peptone. Lorsque le seul substrat disponible est la peptone (**b**), la concentration en ions ammonium augmente pendant toute la fermentation, ils ne sont pas assimilés. Lorsque le milieu est complet (**a**), les ions ammonium sont dans un premier temps produits puis ils sont consommés en même temps que le glucose.

➔ La **figure D 12** permet de comparer l'évolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps. Nous constatons que ces deux vitesses spécifiques varient de la même façon au cours du temps. la production d'enzyme est toujours associée à la croissance.

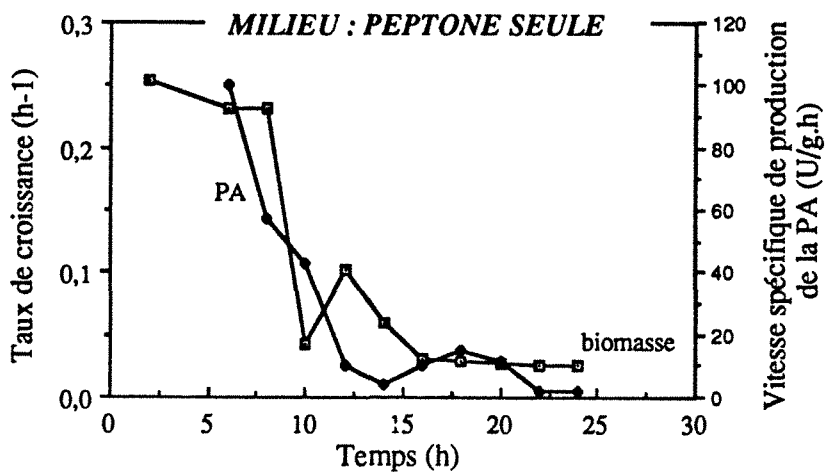
➔ La **figure D 13** rend compte de l'évolution de la vitesse spécifique de production de la PA en fonction du taux de croissance, compte tenu de l'imprécision des mesures, il apparaît dans ces conditions que ces vitesses spécifiques varient proportionnellement.

### *1.2.3. - Cinétiques et performances d'une culture réalisée sans peptone*

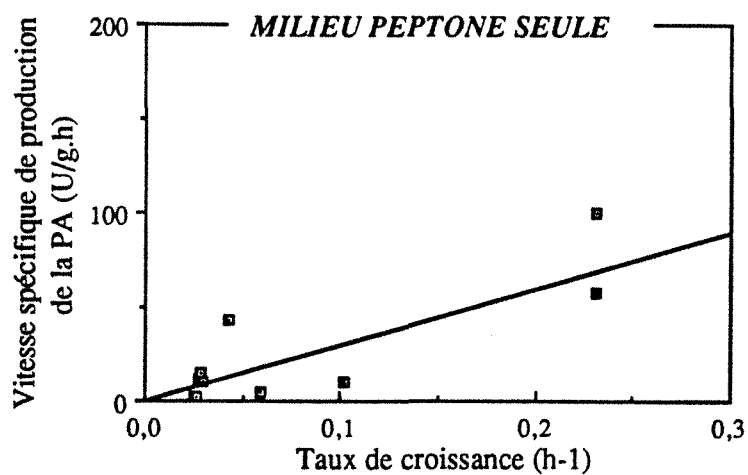
Nous utilisons toujours la même fermentation standard sur le milieu "peptone", et nous comparons les cinétiques obtenues avec celles d'une fermentation où la peptone a été remplacée par des ions ammonium (20 mM) et de l'extrait de levure (3 g/l) pour que la souche puisse croître.

➔ Les cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de la PA sont reportées sur la **figure D 14**. La concentration finale de 3,5 g/l est comparable à celle de la fermentation standard (4,5 g/l). Les taux de croissance pendant la phase exponentielle de croissance pour les fermentations sans peptone et de référence sont comparables (respectivement de 0,25 h<sup>-1</sup> et 0,2 h<sup>-1</sup>). La succession des consommations entre l'APA et le glucose n'est pas modifiée. La

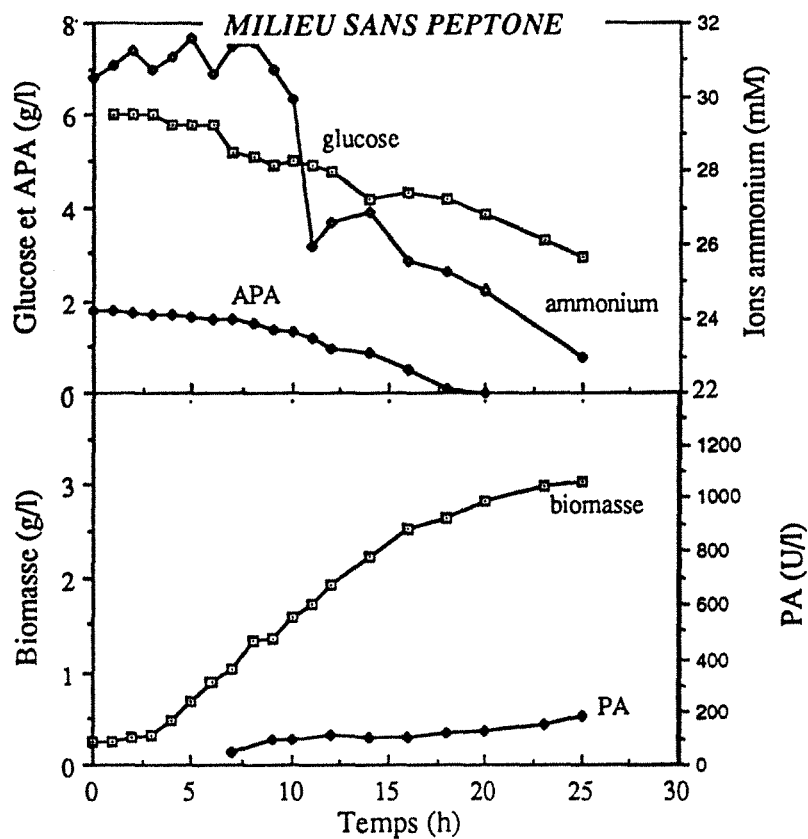




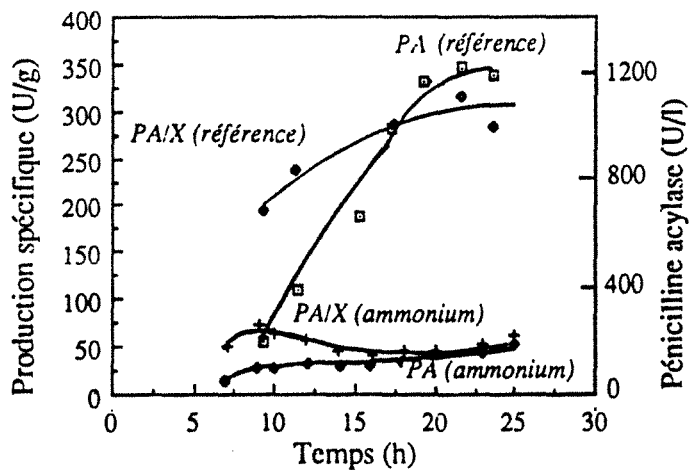
**Figure D 12 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture discontinue de *E. coli* G271 réalisée sur un milieu ne contenant que de la peptone).



**Figure D 13 :** Evolution de la vitesse spécifique de production de la PA en fonction du taux de croissance (culture discontinue de *E. coli* G271 réalisée sur un milieu ne contenant que de la peptone).



**Figure D 14:** Culture en réacteur discontinu de *E. coli* G271 sur un milieu sans peptone : cinétiques de croissance, de production de la PA et de consommation des substrats



**Figure D 15:** Comparaison des performances (concentration en PA et production spécifique) entre la culture de référence et une culture réalisée en absence de peptone (les ions ammonium représentent la source d'azote).

première phase de production des ions ammonium a disparu. La concentration finale en PA est très faible (200U/l).

➔ La figure D 15 représente les cinétiques de production de PA et l'évolution de la production spécifique en enzyme pour la fermentation sans peptone et la fermentation standard. Ce graphe met en évidence la chute des performances dues à la suppression de la peptone, aussi bien pour la concentration que la production spécifique en PA. Pour la culture sans peptone, la production d'enzyme est de 185 U/l et la production spécifique de 61 U/g. La culture sur le milieu complet permet d'obtenir 1200 U/l de PA et une production spécifique de 300 U/g.

Donc, la souche *E. coli* G271 peut croître aussi bien en utilisant les ions ammonium (et l'extrait de levure), mais dans ces conditions elle produit peu de PA : la peptone favorise la production de l'enzyme.

#### 1.2.4. - Influence de l'ajout de l'extrait de levure

➔ L'étude de l'ajout d'extrait de levure dans le milieu a fait l'objet d'un autre travail (TAHA, 1987). Le tableau D 1 permet de comparer les concentrations en biomasse et en PA ainsi que la production spécifique en enzyme obtenues en fin de culture discontinue (TAHA, 1987). Nous constatons que l'ajout d'extrait de levure permet d'améliorer les concentrations finales en biomasse et en PA. Le taux de croissance maximum est presque doublé. Par contre, la production spécifique en fin de fermentation est 1,8 fois plus faible (Tab. D 1).

	sans extrait de levure	avec extrait de levure (15g/l)
Biomasse (g/l)	4,5	12
PA (U/l)	2650	3800
PA/biomasse (U/g)	580	317

Tableau D 1 : Influence de l'extrait de levure sur les performances de la souche *E. coli* G271 : concentrations en biomasse, en enzyme et production spécifique en PA (valeurs obtenues après 24 h de culture discontinue).

#### 1.2.5. - Conclusion sur l'influence de la peptone

Notre souche, qui est auxotrophe pour de nombreux acides aminés, peut croître en utilisant de la peptone ou de l'extrait de levure comme substrat complexe, et dans ces conditions, elle assimile





les ions ammonium comme source d'azote. En accord avec HARDER et DIJKHUIZEN (1983) nous constatons que l'azote organique est consommé avant les ions ammonium. Cependant l'extrait de levure et les ions ammonium ne permettent pas d'obtenir une bonne production de PA. Les souches productrices de PA nous l'avons vu dans la partie A, sont toujours cultivées sur des milieux complexes où les sources de carbone et d'azote sont équilibrées (SHEWALE et SIVARAMAN, 1989). WOJSKOWICZ (1984), a obtenu la meilleure production de PA en utilisant la peptone comme substrat complexe.

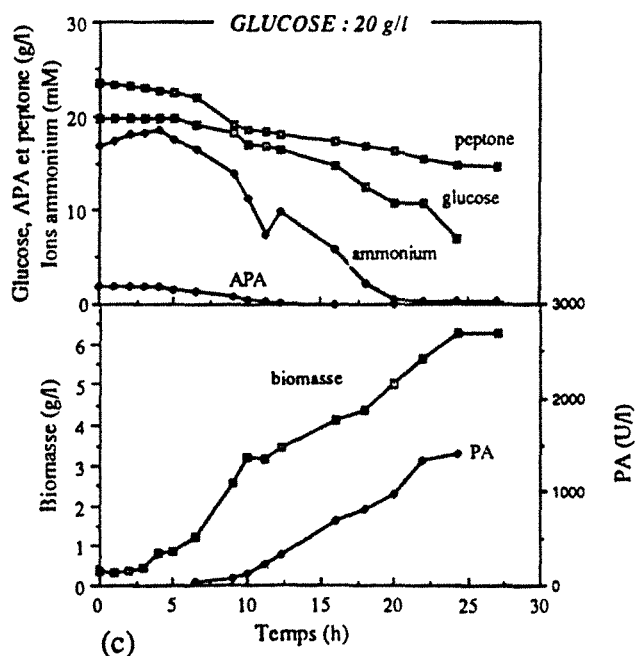
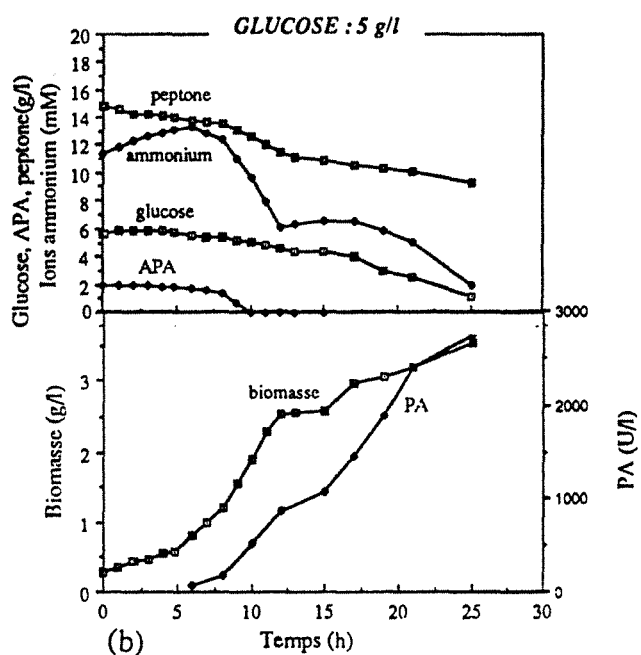
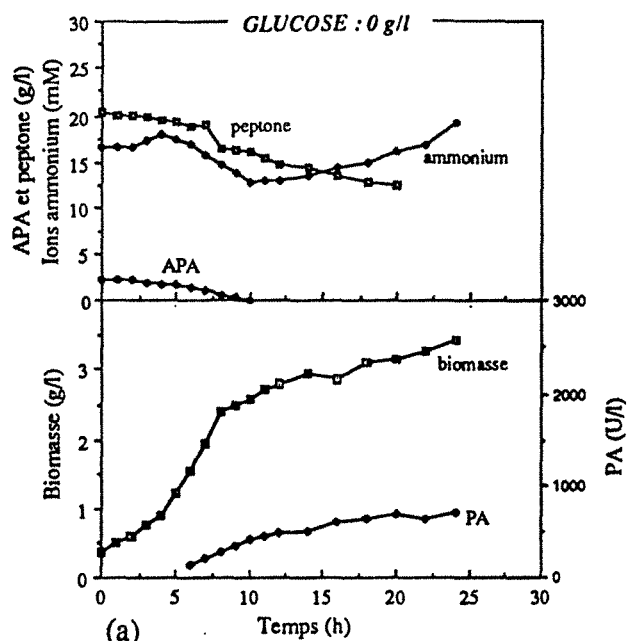
Quelle que soit la concentration initiale en peptone, l'azote de la peptone n'est pas complètement consommé. La peptone est un hydrolysate de protéines, composé d'acides aminés, de di- et tri-peptides ainsi que de polypeptides (SCHLEGEL, 1988). Elle est constituée de différentes fractions assimilables successivement (AA : acides aminés et PE : peptides) et d'une fraction non assimilable (PN). Chaque phase correspondrait à l'assimilation d'une fraction de la peptone. La consommation de la première fraction entraînerait une production d'ions ammonium. En effet, les acides aminés peuvent être utilisés comme source de carbone (partie A) et la réaction de désamination entraîne une production d'ions ammonium. La première fraction de la peptone serait donc représentée par des acides aminés qui seraient assimilés comme source de carbone et d'azote. Lorsqu'il y a pas d'autre source de carbone, les ions ammonium sont toujours produits : les autres fractions de la peptone seraient alors utilisées comme source de carbone. Lorsqu'il y a du glucose, ce substrat est consommé en même temps que les ions ammonium.

De plus nous avons mis en évidence qu'un épuisement de la source de carbone entraîne un arrêt de la consommation des ions ammonium, ce résultat est confirmé par les travaux de ROBBINS et TAYLOR (1989).

Un dosage de l'azote de la peptone ainsi que des acides aminés en début et en fin de fermentation nous a permis de calculer la quantité représentée par les peptides et donc la proportion de chacune des fractions de la peptone.

Les dosages ont été réalisés pour une culture en réacteur discontinu sur milieu "peptone" et dans les conditions standard (fermentation de référence) :

	concentrations (g/l)	
	initiale	finale
peptone	15	12
acides aminés	3	1,5



**Figure D 16 :** Influence de la concentration en glucose sur les cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats (glucose, acide phénylacétique -APA- et des ions ammonium -NH<sub>4</sub>-) : culture discontinue de la souche *E. coli* G271.  
 > courbes (a), (b) et (c) : les concentrations initiales en glucose sont respectivement de 0, 5 et 20 g/l .

Nous avons remarqué précédemment que la fraction non assimilable de la peptone représente 60 % de la concentration initiale en peptone, soit ici 9 g/l. Après 24 heures de culture il reste encore 12 g/l de peptone dans le milieu car la croissance n'est pas terminée, elle a été retardée par une longue phase de latence. La souche n'a donc consommé que 3 g de peptone, ce qui correspond d'après les dosages, à l'assimilation de 1,5 g d'acides aminés et par déduction autant de peptides (1,5 g). Pour une croissance complète, 6 g de peptone auraient été consommés (60 % de 15 g), soit en fait la totalité des acides aminés (3 g) et donc par déduction 3 g de peptides. Des dosages supplémentaires des acides aminés permettraient de vérifier les hypothèses proposées.

### I.3. - Influence du glucose :

L'influence du glucose a été abordée dans la partie C (§ I.2.), certains résultats obtenus sont repris et complétés dans cette étude.

⇒ L'influence du glucose sur la croissance, la consommation des substrats ainsi que la production de PA sont étudiées à partir de fermentations réalisées à des concentrations initiales en glucose variables.

#### *I.3.1. - Variation de la concentration initiale en glucose :*

Trois fermentations ont été réalisées dans les mêmes conditions mais avec des concentrations initiales en glucose de 0, 5 (milieu standard) et 20 g/l. Nous commençons notre étude par une description générale des cinétiques obtenues, puis nous détaillerons l'influence du glucose sur la croissance, la consommation des substrats et la production de la PA.

#### *I.3.1.1. - Description des cultures discontinues réalisées à des concentrations initiales en glucose variables*

➔ Les cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de la PA de ces 3 fermentations sont reportées sur la **figure D 16 (a, b et c)**. L'allure des cinétiques sont comparables pour ces 3 cultures. La croissance est biphasique pour les fermentations menées avec 5 et 20 g/l de glucose. Cependant, en absence de glucose l'arrêt de la croissance à la 10ème heure de culture n'intervient plus. La transition entre la consommation de l'APA et du glucose est effectivement responsable de cette arrêt de la croissance pour les fermentations réalisées en présence de glucose. Quelle que soit la concentration initiale en glucose, l'assimilation de ce substrat suit toujours celle de l'APA. Les concentrations finales en biomasse et en PA sont plus faibles en absence de glucose.

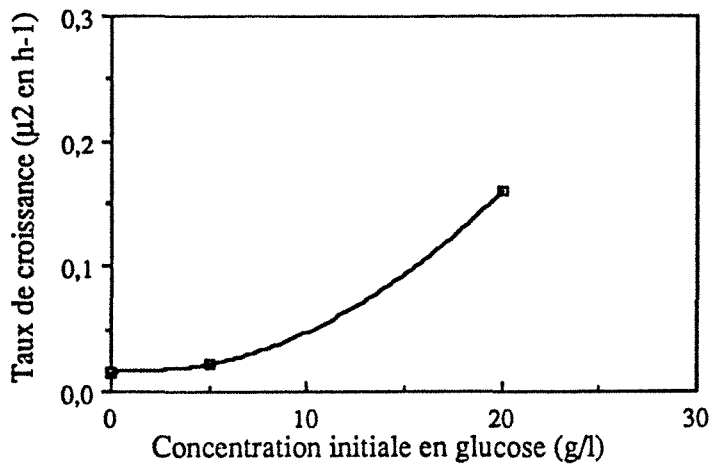


Figure D 17: Influence de la concentration initiale en glucose sur le taux de croissance (deuxième phase) de la souche *E. coli* G271 (culture en réacteur discontinu).

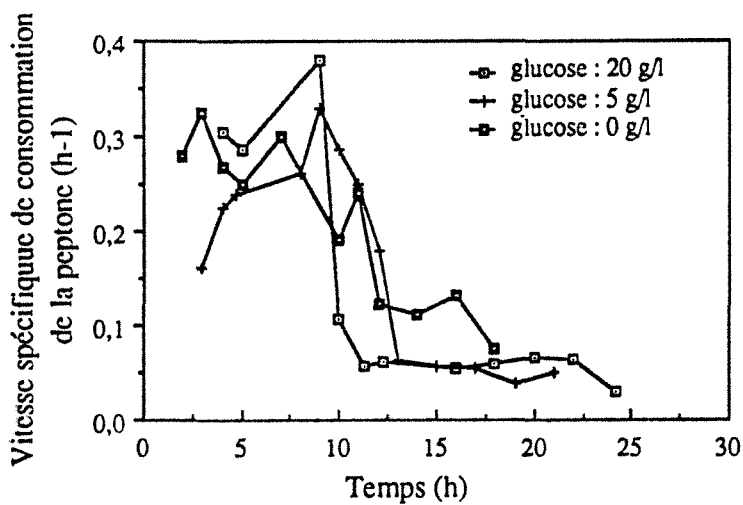


Figure D 18: Influence de la concentration initiale en glucose sur la vitesse spécifique de consommation de la peptone (culture en réacteur discontinu de la souche *E. coli* G271).  
 > les concentrations initiales en glucose sont de 0, 5 et 20 g/l .

### I.3.1.2. - Influence de la concentration initiale en glucose sur la croissance

➔ La **figure D 17** représente l'évolution du taux de croissance (calculé sur la deuxième phase de croissance, lorsque le glucose est consommé) en fonction de la concentration initiale en glucose. Le taux de croissance augmente en même temps que la concentration initiale en glucose.

### I.3.1.3. - Influence de la concentration initiale en glucose sur la consommation des substrats

#### Influence de la concentration initiale en glucose sur la consommation de la peptone :

➔ La vitesse de consommation de la peptone est reportée en fonction du temps pour ces 3 fermentations sur la **figure D 18**. Ce graphe met en évidence que la concentration initiale en glucose n'a pas d'influence sur la consommation de la peptone.

#### Influence de la concentration initiale en glucose sur la consommation de l'APA :

➔ La concentration initiale en glucose n'a pas d'influence sur la consommation de l'APA qui est toujours consommé en premier (**Fig. D 16**).

#### Influence de la concentration initiale en glucose sur la consommation des ions ammonium :

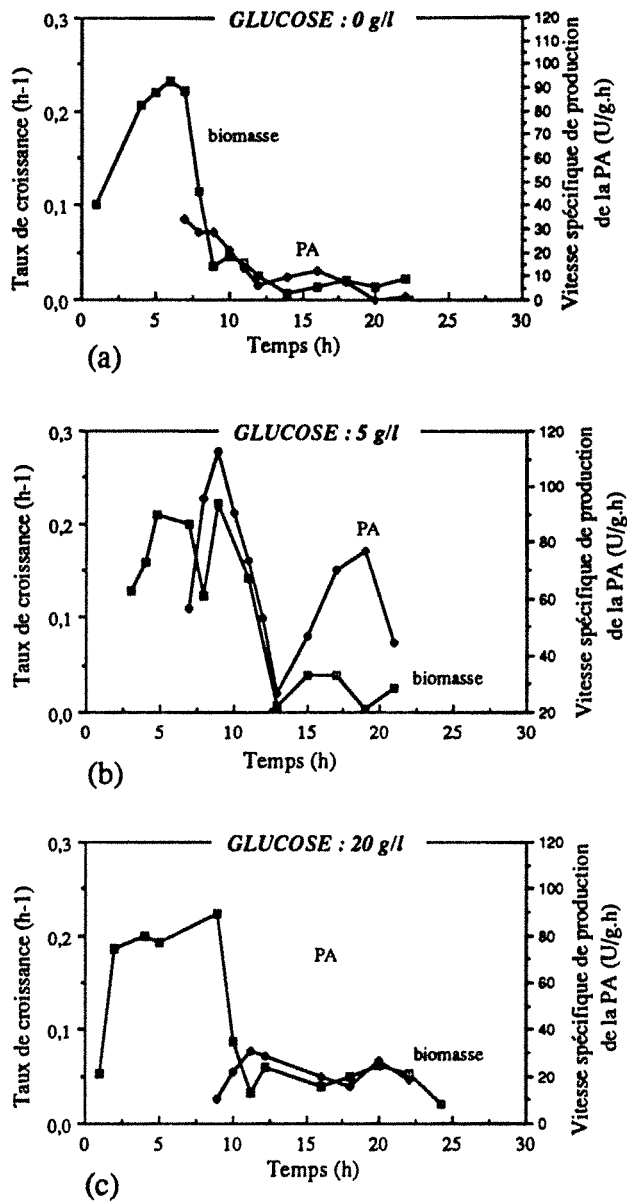
➔ En absence de glucose, dès que la concentration en APA est nulle, la consommation des ions ammonium s'arrête, et ils sont au contraire produits (**Fig. D 16 a**). Le comportement de la souche est alors identique à celui décrit pour la fermentation réalisée sur un milieu contenant que de la peptone.

### I.3.1.4. - Influence de la concentration initiale en glucose sur la production de PA

➔ La **figure D 19 (a, b et c)** représente l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de production de la PA au cours de ces 3 fermentations. La vitesse spécifique de production de la PA et le taux de croissance n'évoluent pas de la même façon en début de culture pour une concentration initiale en glucose de 20 g/l. En absence de glucose le taux de croissance chute très rapidement (dès la 6ème heure) de ce fait, la vitesse spécifique de production de l'enzyme ne présente pas de pic entre la 6ème et la 10ème heure de culture comme c'est le cas avec 5 g/l de glucose initialement. Ensuite, lorsque le taux de croissance diminue, la vitesse spécifique de production de l'enzyme varie de la même façon.

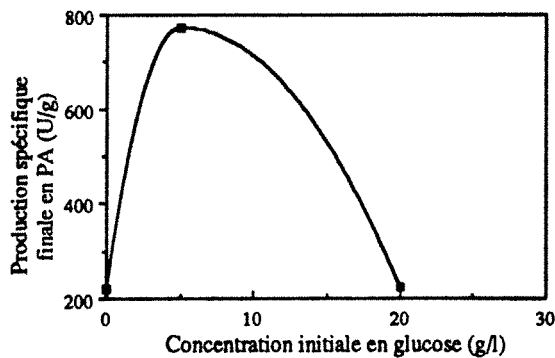
➔ La **figure D 20** décrit l'évolution de la production spécifique en PA finale en fonction de la concentration initiale en glucose. Une concentration initiale de 5 g/l en glucose semble être un optimum permettant d'obtenir la meilleure production spécifique en PA.





**Figure D 19 :** Influence de la concentration initiale en glucose sur le taux de croissance et la vitesse spécifique de production de la PA (cultures discontinues de *E. coli* G271).

➤ courbes (a), (b) et (c) : les concentrations initiales en glucose sont respectivement de 0, 5 et 20 g/l .



**Figure D 20 :** Influence de la concentration initiale en glucose sur la production spécifique de PA par la souche *E. coli* G271 (réacteur discontinu).

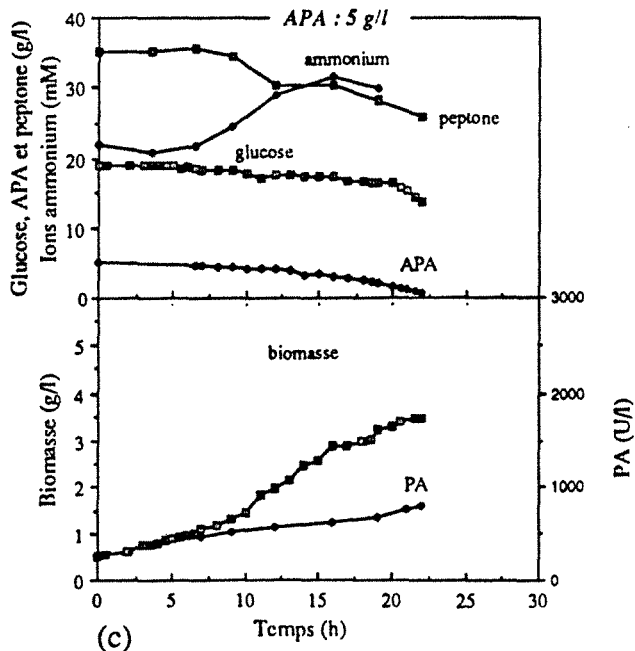
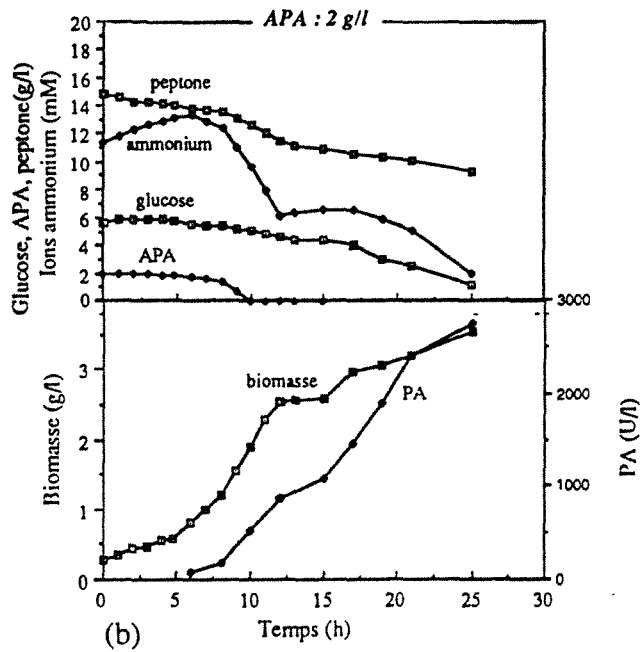
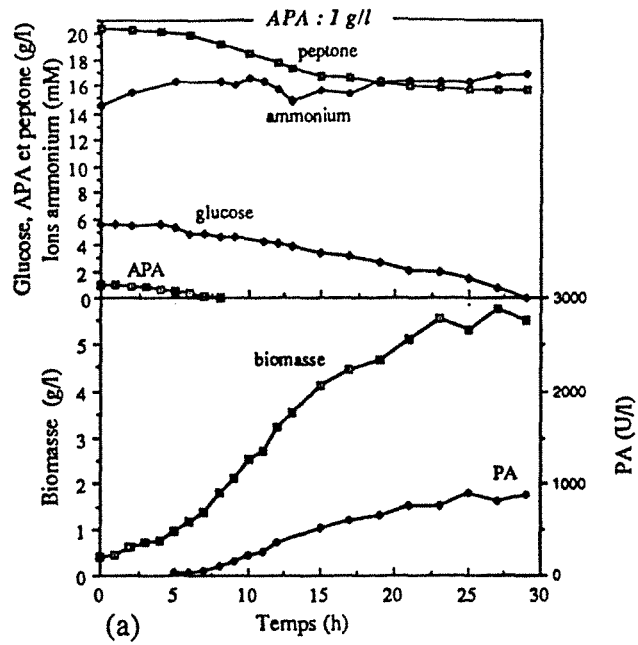


Figure D 21 : Influence de la concentration en APA sur les cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats (glucose, acide phénylacétique -APA- et des ions ammonium -NH<sub>4</sub>-) : culture discontinue de la souche *E. coli* G271.

> courbes (a), (b) et (c) : les concentrations initiales en APA sont respectivement de 1, 2 et 5 g/l.



### 1.3.2. - Conclusion sur l'influence du glucose

Une forte concentration en glucose (20 g/l) permet d'améliorer la croissance de la souche *E. coli* G271 (pendant la deuxième phase de croissance), mais en revanche les performances vis-à-vis de la production de la PA diminuent. Nous confirmons les résultats précédemment décrits, c'est-à-dire que la souche *E. coli* G271 semble être encore soumise à la répression catabolique par le glucose.

### 1.4. - Influence de l'acide phénylacétique :

L'influence de l'APA sur le comportement de la souche *E. coli* G271 est étudiée en 3 étapes.

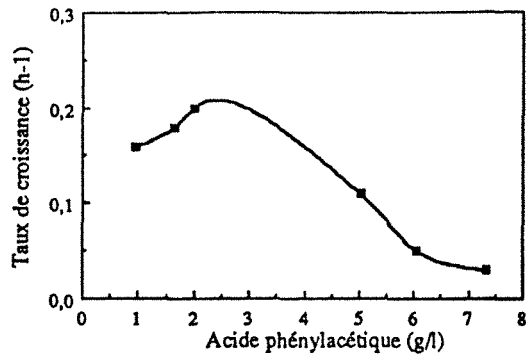
- ⇒ Cette étude débute comme précédemment par une comparaison du comportement de la souche *E. coli* G271 au cours de cultures réalisées avec des concentrations initiales en APA différentes.
- ⇒ Ensuite, nous comparerons les cinétiques obtenues au cours d'une fermentation sur milieu "peptone" sans APA avec celles d'une culture standard.
- ⇒ Finalement, nous étudierons l'influence de l'ajout de l'APA sur un milieu ne contenant que de la peptone.

#### 1.4.1. - Variation de la concentration initiale en acide phénylacétique

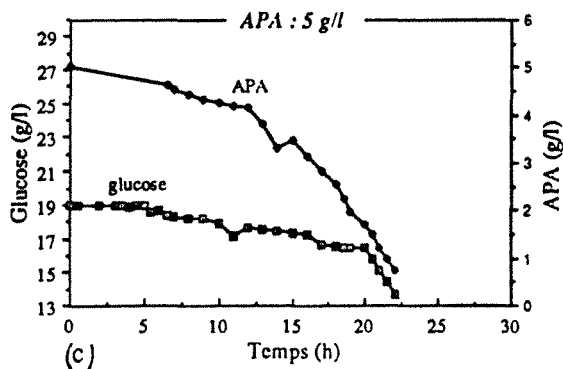
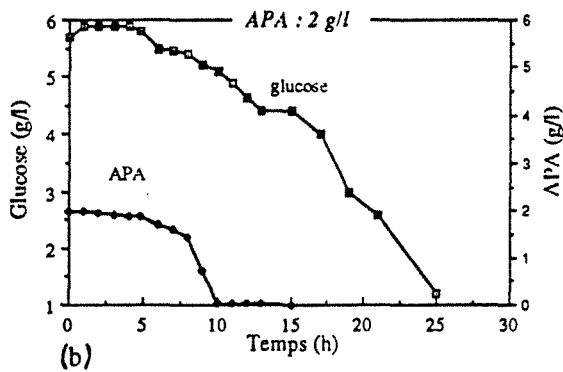
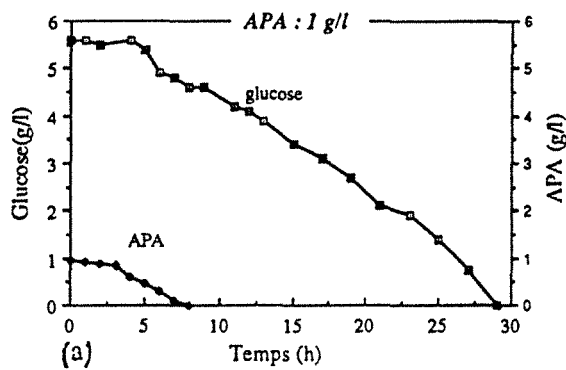
Des fermentations discontinues sont réalisées sur des milieux de cultures pour lesquels la concentration initiale en APA varie entre 1 et 5 g/l (les autres conditions sont maintenues constantes. La concentration en glucose est de 5 g/l environ sauf pour la dernière, elle est de 20 g/l. Là encore, nous décrirons tout d'abord les différentes cinétiques pour chaque fermentation, et ensuite, nous approfondirons plus en détail l'influence de la concentration initiale en APA sur la croissance, la consommation des substrats et finalement sur la production de la PA.

##### 1.4.1.1. - Description des cultures discontinues réalisées à des concentrations initiales en acide phénylacétique variables

➔ La figure D 21 (a, b et c) permet de comparer les cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de la PA en fonction de la concentration initiale en APA. Les cinétiques des fermentations avec les deux plus faibles concentrations initiales en APA (1 et 2 g/l) sont comparables (a et b). En revanche pour la fermentation réalisée avec 5 g/l d'APA (c), les concentrations finales en biomasse et en PA ne sont pas importantes (respectivement 3,5 g/l et 800 U/l). La consommation de l'APA bien que faible en début de culture précède toujours celle du glucose qui débute à la 20ème heure de la fermentation. Les ions ammonium sont produits tant que le glucose n'est pas consommé.



**Figure D 22 :** Influence de la concentration initiale en APA sur le taux de croissance de la souche *E. coli* G271 (culture en réacteur discontinu).



**Figure D 23 :** Comparaison des cinétiques de consommation du glucose et de l'APA entre 3 fermentations réalisées avec des concentrations initiales en APA différentes (1, 2 et 5 g/l).

#### I.4.1.2. - Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la croissance

➔ La **figure D 22** représentant l'évolution du taux de croissance en fonction de la concentration initiale en APA, rappelle les résultats précédemment reportés dans la partie C (§ I.4). Au delà de 2 g/l, l'APA inhibe la croissance.

#### I.4.1.3. - Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la consommation des substrats

##### Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la consommation du glucose :

➔ La **figure D 23 (a, b et c)** permet de suivre l'évolution des concentrations résiduelles en APA et en glucose pour ces 3 fermentations. Quelque soit la concentration initiale en APA, la consommation du glucose débute alors que la concentration en APA est voisine de 1 g/l.

Les consommations de la peptone et des ions ammonium sont identiques pour ces 3 fermentations.

#### I.4.1.4. - Influence de la concentration initiale en acide phénylacétique sur la production de pénicilline acylase

➔ La **figure D 24 (a, b et c)** décrit pour chaque fermentation, l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de production de la PA au cours du temps. Pour chaque fermentation, nous constatons que ces deux vitesses spécifiques varient de la même façon. Quelle que soit la concentration initiale en APA, la production de PA est associée à la croissance.

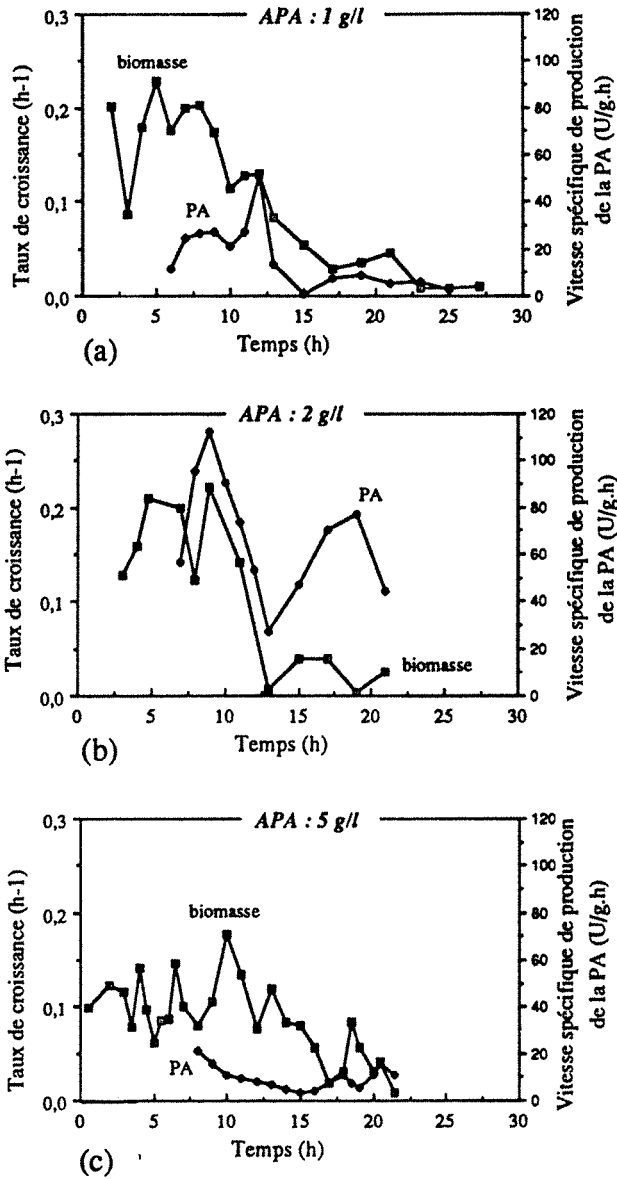
➔ La **figure D 25** permet de suivre l'évolution de la production spécifique finale en PA en fonction de la concentration initiale en APA. une concentration initiale en APA de 2 g/l permet d'obtenir les meilleures performances.

#### *I.4.2. - Cinétiques et performances d'une culture réalisée sans acide phénylacétique*

Nous comparons les cinétiques et les performances d'une fermentation réalisée sur le milieu "peptone" sans APA et d'une fermentation standard (milieu "peptone").

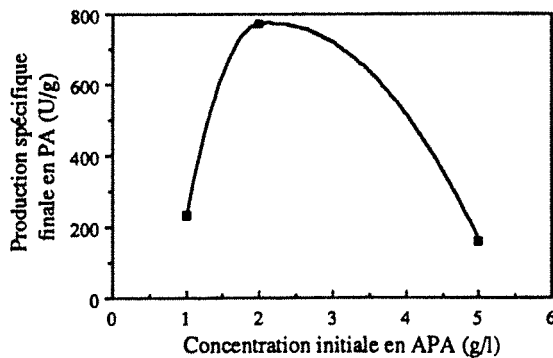
➔ La **figure D 26 (a et b)** rend compte de l'évolution des cinétiques pour ces deux fermentations. l'absence d'APA ne modifie pas la consommation des substrats. En revanche, les concentrations finales en biomasse et en PA sont plus faibles (respectivement 4g/l et 700 U/l).





**Figure D 24 :** Influence de la concentration initiale en APA sur le taux de croissance et la vitesse spécifique de production de la PA (cultures discontinues de *E. coli* G271).

➤ courbes (a), (b) et (c) : les concentrations initiales en APA sont respectivement de 1, 2 et 5 g/l .



**Figure D 25 :** Influence de la concentration initiale en APA sur la production spécifique de PA par la souche *E. coli* G271 (réacteur discontinu).

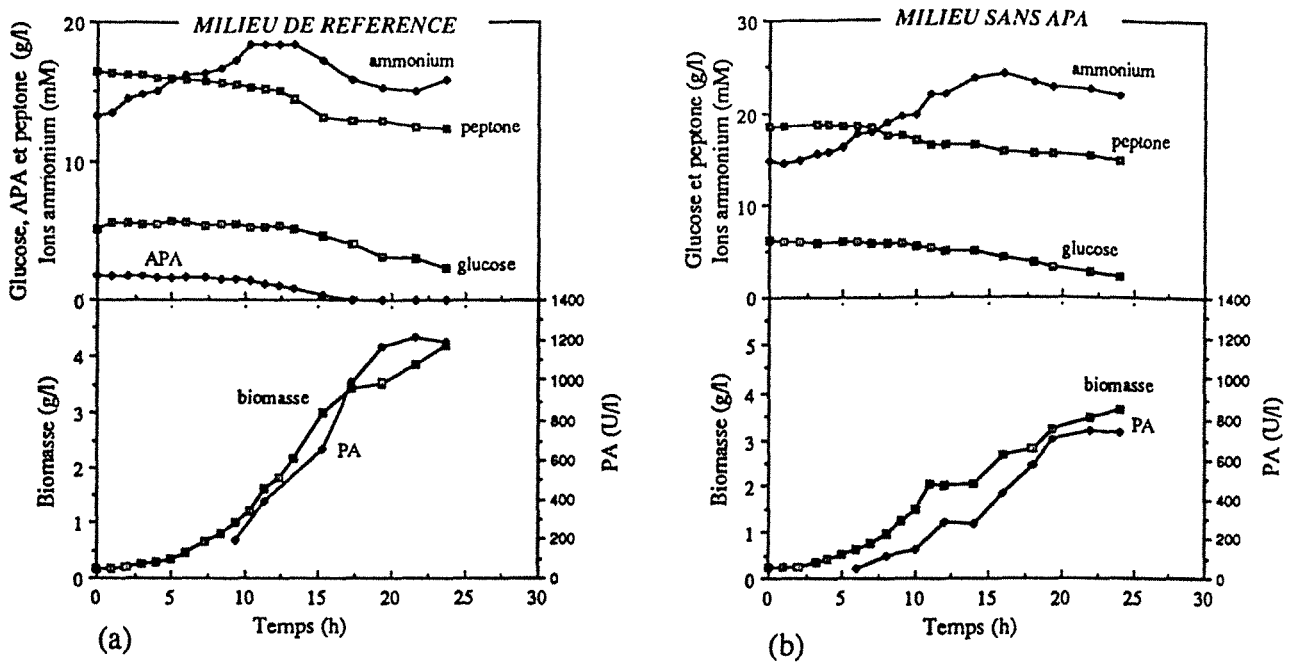


Figure D 26 : Comparaison des cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats entre la culture de référence (a) et une culture réalisée sans APA (b).

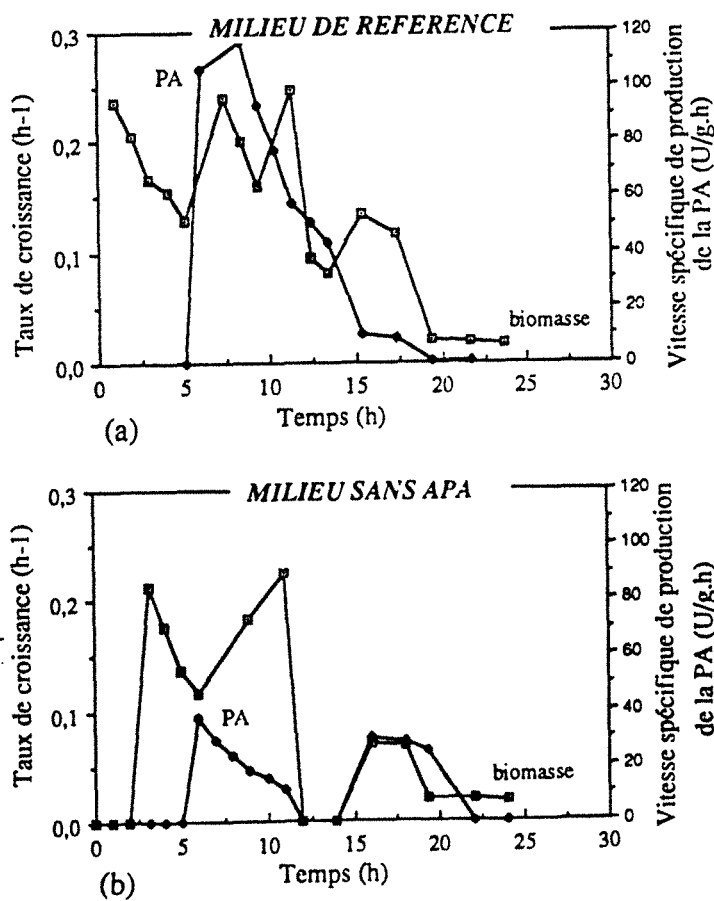


Figure D 27 : Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA : comparaison entre pour une culture de référence (a) et une culture réalisée sans APA (b).

➔ Sur la **figure D 27 (a et b)** nous avons reporté les vitesses spécifiques de croissance et de production de la PA. En absence d'APA, la vitesse spécifique de production de la PA est faible et reste associée à la croissance : la présence de l'APA permet d'améliorer la production de l'enzyme.

#### *1.4.3. - Cinétiques et performances d'une culture réalisée avec de l'acide phénylacétique et sans glucose*

Nous avons réalisé une culture sans glucose et avec de l'APA, les cinétiques et les performances de cette fermentation sont comparées avec celle d'une fermentation standard.

➔ La **figure D 28 (a et b)** regroupe les cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de la PA pour ces deux fermentations. Il n'apparaît pas de différence entre ces deux fermentations.

➔ La **figure D 29 (a et b)** décrit l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de production de la PA. Elle met en évidence que ces vitesses varient de la même façon pour ces deux fermentations. La présence de glucose dans un milieu de culture contenant de l'APA n'a pas d'influence sur la production de l'enzyme.

#### *1.4.4. - Conclusion sur l'influence de l'acide phénylacétique*

La présence d'acide phénylacétique permet d'améliorer la production d'enzyme, mais au delà de 2 g/l elle inhibe la croissance. Lorsque la concentration initiale en APA est supérieure à 1 g/l, la consommation du glucose est inhibée.

#### 1.5. - Analyse de la limitation de la densité cellulaire en culture discontinue :

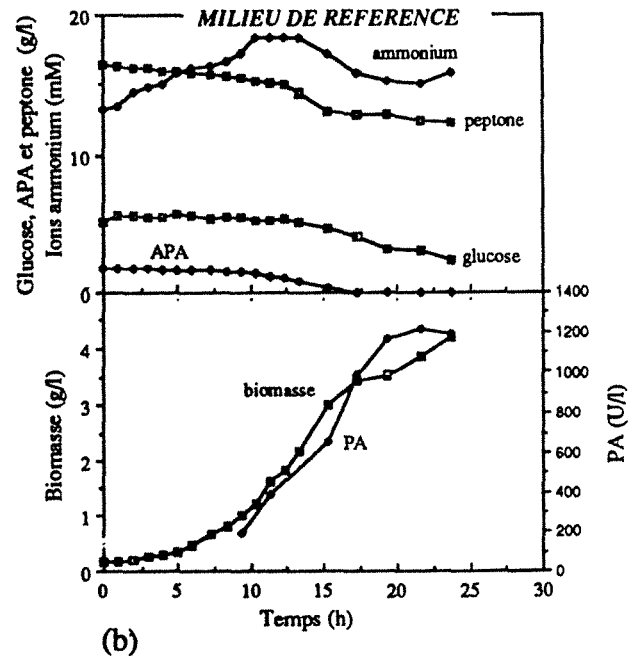
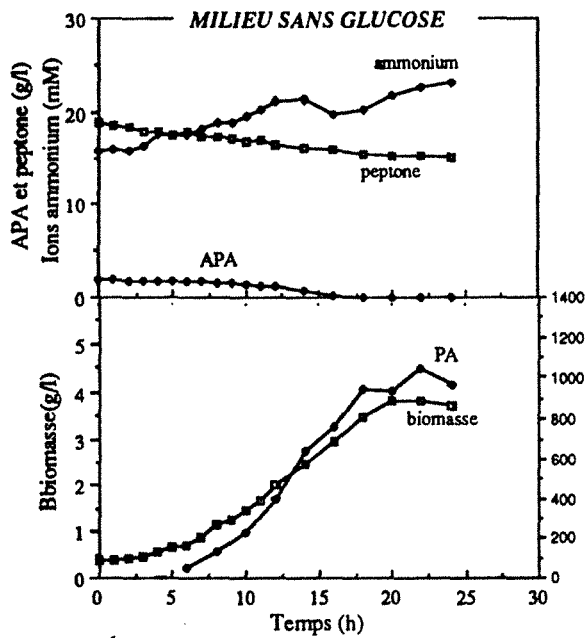
Au cours des différentes cultures en discontinu, nous constatons que la croissance de la souche *E. coli* G271 est nettement ralentie après la phase exponentielle, la production de PA liée à la croissance, est elle aussi fortement diminuée. Les concentrations finales en biomasse obtenues sont au maximum de 6 g/l. Nous essayons dans ce paragraphe d'analyser les causes responsables de la limitation de la densité cellulaire en culture discontinue. Il peut s'agir d'une limitation et/ ou d'une inhibition. Pour cela nous réalisons deux types d'expérimentations :

⇒ la première consiste en une supplémentation d'un surnageant de culture discontinue avec les différents composants du milieu,

⇒ la deuxième est une supplémentation d'un surnageant, mais avec des concentrations croissantes des nutriments.



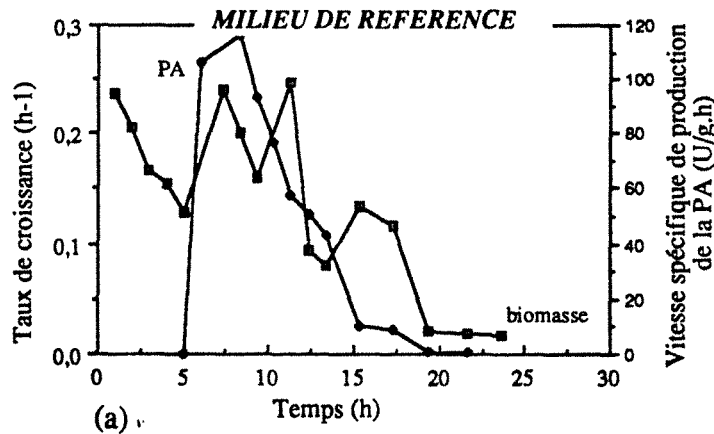




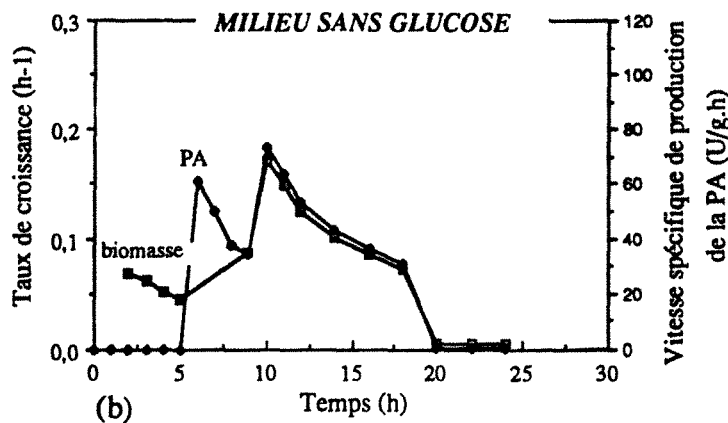
(a)

(b)

**Figure D 28 :** Comparaison des cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats entre la culture de référence (a) et une culture réalisée avec de l'APA mais en absence de glucose (b).

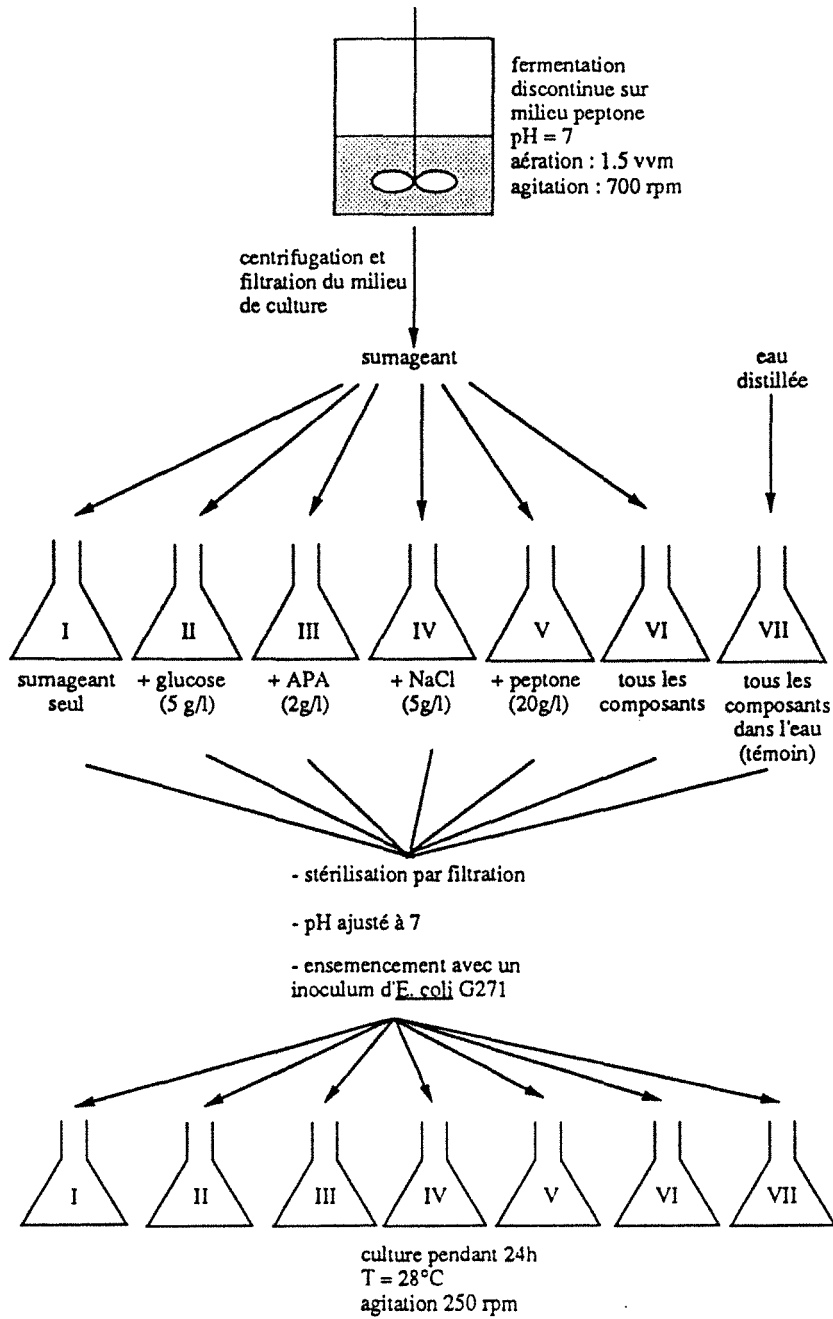


(a)



(b)

**Figure D 29 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps : comparaison entre une culture de référence (a) et une culture réalisée avec de l'APA mais en absence de glucose (b).



**Figure D 30 :** Supplémentation d'un surnageant de fin de culture avec les différents composants du milieu : schéma du protocole.

Milieu	Biomasse formée en 24 h (g/l)	écart par rapport au témoin (%)
I	0.11	97
II	0.08	98
III	0.03	99
IV	0.08	98
V	1.6	53
VI	1,86	45
VII	3,4	100

**Tableau D 2 :** Biomasse formée en 24 h de culture dans les erlenmeyers I à VII (cf. figure D 30).

### *1.5.1. - Supplémentation d'un surnageant de fin de culture avec les différents composants du milieu*

Le protocole suivi pour cette fermentation est décrit par la **figure D 30**. Le surnageant d'une culture discontinuée de 24h de la souche G271 est récupéré. Ce surnageant est filtré afin de le stériliser (le diamètre des pores du filtre est de 0,2  $\mu\text{m}$ ), puis il est utilisé à la place de l'eau distillée dans la réalisation de nouveaux milieux de culture stériles et pour lesquels le pH a été ajusté à 7. Dans chaque erlenmeyer, chacun des composants du milieu "peptone" est dilué dans du surnageant (**Fig. D 30**). Dans l'erlenmeyer 6, le milieu "peptone" est reconstitué et le 7<sup>ème</sup> erlenmeyer contient le même milieu dilué avec l'eau, il constitue le témoin. Ces nouveaux milieux sont ensemencés puis incubés pendant 24 heures à 28°C.

➔ Les productions de biomasse obtenues en 24 h de culture sont regroupées dans le **tableau D 2**. Dans les erlenmeyers I, II, III et IV, nous obtenons deux fois moins de biomasse que dans la culture témoin. La souche ne peut pas pousser dans le surnageant issu d'une culture, il y a soit une carence en un nutriment soit un inhibiteur de la croissance (**Tab. D 2, erlenmeyer I**). Or l'ajout de glucose, d'APA ou de NaCl ne permet pas à la souche de croître, il ne s'agit donc pas d'une carence en un de ces substrats (**Tab. D 2, erlenmeyers II, III et IV**). En revanche, la souche croît si nous ajoutons de la peptone et a fortiori tous les composants du milieu (**Tab. D 2, erlenmeyers V et VI**). Quelle que soit la supplémentation du surnageant, la biomasse finale atteinte est bien inférieure à celle du témoin (**Tab. D 2, erlenmeyers V, VI et VII**).

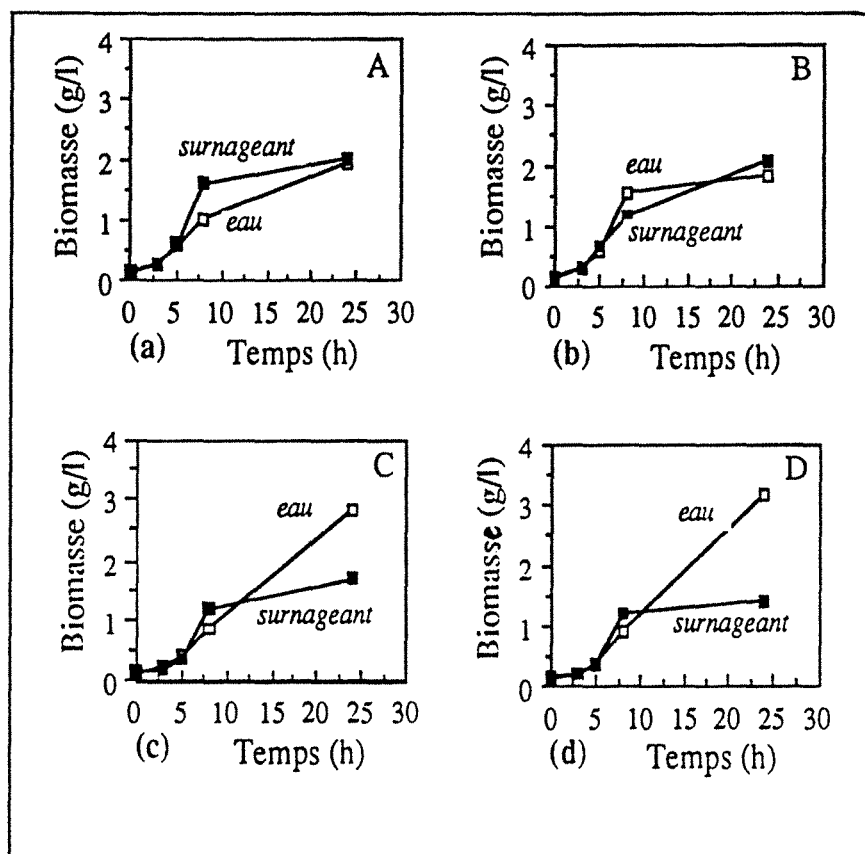
Une carence en azote serait donc responsable du ralentissement de la croissance en fin de culture discontinuée. Cependant la concentration finale en biomasse dans le témoin est toujours plus élevée, il y aurait donc un effet inhibiteur dû à un métabolite produit ou à une trop forte concentration en substrats dans le milieu (pression osmotique trop forte). Cette expérience nous permet d'affirmer que sur le milieu standard, la croissance de la souche est limitée en fin de culture discontinuée par une carence azotée.

### *1.5.2. - Supplémentation d'un surnageant de fin de culture avec des concentrations croissantes en nutriments*

Afin d'infirmer ou de confirmer la présence d'un inhibiteur, nous réalisons une fermentation pour laquelle le phénomène de carence ne masque pas l'inhibition. Des cultures en erlenmeyers sont réalisées sur des milieux "peptone" de concentrations différentes. Les composants sont dilués avec de l'eau distillée ou du surnageant obtenu à partir d'une culture réalisée dans les conditions standard. L'eau permet d'avoir une culture témoin pour chaque concentration du milieu "peptone".

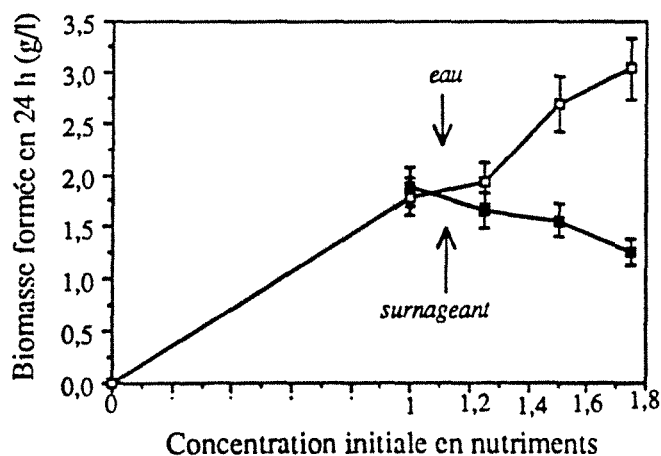
ERLENMEYER	PEPTONE (g/l)	GLUCOSE (g/l)	APA (g/l)	NaCl (g/l)	FACTEUR DE CONCENTRATION
A	20	20	2,0	5,00	x 1,00
B	25	25	2,5	6,25	x 1,25
C	30	30	3,0	7,50	x 1,50
D	35	35	3,5	8,75	x 1,75

**Tableau D 3 :** Composition des milieux de fermentation : concentration des nutriments.  
Le facteur de concentration est exprimé par rapport au milieu de l'erlemeyer A (milieu standard).



**Figure D 31 :** Supplémentation d'un surnageant de fin de culture avec des concentrations croissantes en nutriments : comparaison des cinétiques de croissance de la souche *E. coli* G271.

> courbes a, b, c, d : erlenmeyers A, B, C, D (cf. tableau D 3).



**Figure D 32 :** Influence de la concentration initiale en nutriments sur la production de biomasse en 24 h de culture : comparaison des milieux témoins (eau) et les milieux dilués dans du surnageant.

Les concentrations initiales des composants dans les différents erlenmeyers ainsi que les facteurs de concentration correspondant sont reportés dans le **tableau D 3**.

➔ La **figure D 31 (a, b, c et d)** permet de suivre l'évolution au cours du temps, des concentrations en biomasse, sur les milieux à base de surnageant et les milieux témoins pour chacun des erlenmeyers A, B, C et D.

➤ Pour les erlenmeyers de type A, le milieu n'est pas concentré (facteur de concentration égal à 1). En début de culture, la croissance de la souche G271 est la même sur les deux milieux (eau et surnageant) (**Fig. D 31 a**). A la 8ème heure de culture, la concentration en biomasse dans le milieu à base de surnageant est plus élevée que dans le milieu témoin. A la 25ème heure, les concentrations finales en biomasse dans les deux types de milieux sont identiques.

➤ Pour les erlenmeyers de type B (le milieu est 1,25 fois concentré) l'évolution des courbes de croissance entre les deux milieux est la même que précédemment (**Fig. D 31b**). Cependant, la concentration finale en biomasse dans le témoin est légèrement supérieure à celle obtenue avec le milieu à base de surnageant.

➤ Pour les erlenmeyers de type C (le milieu est 1,5 fois concentré), pendant les 8 premières heures de culture, la croissance dans le milieu à base de surnageant est meilleure que dans le milieu témoin (**Fig. D 31 c**). Mais à la fin de la culture, la concentration en biomasse dans le témoin est nettement supérieure à celle obtenue sur le milieu à base de surnageant.

➤ La tendance est accentuée pour les milieux de type D (le facteur de concentration est de 1,75) : pour le milieu à base de surnageant, à partir de la 8ème heure de culture, la souche G271 ne pousse plus ( **Fig. D 31 d**).

➔ Ces résultats sont résumés sur la **figure D 32**, qui décrit l'évolution des concentrations en biomasse obtenues en 24 h en fonction du facteur de concentration du milieu. Lorsque le facteur de concentration augmente, la biomasse finale obtenue sur les milieux témoins augmente alors qu'elle est constante sur les milieux à base de surnageant. Il faut cependant signaler que les deux expérimentations ont été réalisées indépendamment l'une de l'autre. A chaque fois une culture témoin a été mise en œuvre. Nous constatons que les concentrations finales obtenues pour chaque témoin sont différentes (3,6 g/l et 2 g/l). Cette constatation met en évidence un problème de reproductibilité pour ces deux séries de culture. Les interprétations proposées sont des hypothèses qui doivent être confirmées par d'autres expérimentations.

La souche d'*E. coli* cultivée sur les milieux à base de surnageant n'est pas inhibée durant les premières heures de la fermentation. L'augmentation de la concentration des constituants des milieux témoins se traduit par l'obtention d'une concentration finale en biomasse plus élevée. Il n'en est pas de même avec les milieux à base de surnageant, où une plus forte concentration en nutriment a plutôt tendance à faire diminuer la concentration finale en biomasse. La chute de la

croissance n'est donc pas due à une trop forte concentration du milieu ni à une carence. Nous pouvons donc en conclure qu'il y a un ou plusieurs produits dans le surnageant inhibiteurs de la croissance. Pendant les 8 premières heures, la concentration en inhibiteur est faible : sur les milieux à base de surnageant, la croissance est équivalente ou légèrement supérieure à celle obtenue sur les milieux témoins. Au cours de la fermentation, la concentration en inhibiteur augmente, entraînant un ralentissement de la croissance. Ce phénomène n'apparaît pas avec les milieux témoins qui initialement ne contiennent pas d'inhibiteur. Les résultats obtenus avec les milieux témoins confirment ceux précédemment cités : une carence nutritionnelle est responsable de l'arrêt de la croissance, en culture discontinue sur milieu "peptone".

SINCLAIR et STOKES (1962) ont étudié la croissance de *E. coli* sur des milieux qui provenaient de surnageants d'un cycle de culture précédent, complétés par du glucose comme source de carbone et des ions ammonium comme source d'azote. Au bout du 4<sup>ème</sup> cycle, le taux de croissance commence à chuter et au 5<sup>ème</sup> cycle, la croissance est nulle. Au filtrat du 6<sup>ème</sup> cycle, un ajout de phosphate et de sels minéraux en plus du glucose et des ions ammonium, permet d'obtenir une croissance normale après deux jours de latence. Les auteurs en concluent qu'il y a une carence en minéraux et que le temps de latence serait dû à une accumulation d'acides au cours des cycles précédents. L'ajout successif de constituants entraîne une augmentation de la pression osmotique du milieu qui peut entraîner une inhibition de la croissance, la présence d'un témoin réalisé avec de l'eau permet de mettre en évidence cet éventuel phénomène. Les résultats de SINCLAIR et STOKES (1962) ne sont donc pas vraiment confirmés dans la mesure où cette hypothèse n'a pas été écartée et que les acides organiques n'ont pas été dosés. LANDWALL et HOLME (1977 b) dialysent les cultures afin de retirer les métabolites produits qui inhibent la croissance. Selon ces auteurs, l'inhibition serait due à une action combinée d'acides organiques. En fin de culture discontinue non dialysée, ils détectent de l'acétate, du lactate, du pyruvate, du succinate, du propionate et de l'isobutyrate. Le rôle exact de ces acides n'a pas été étudié.

Nous avons vu dans la partie C (§ I.1.) que pour les cultures en réacteur discontinu de *E. coli* réalisées sans limitation d'oxygène, nous obtenons dans le milieu de très faibles concentrations en acétate (moins de 0,2 g/l), en lactate (moins de 4 mg/l) et en éthanol (moins de 20 mg/l). La dose létale pour *E. coli* BB est supérieure à 50 g/l d'éthanol (SAWADA et NAKAMURA, 1987). D'après les chromatogrammes obtenus avec le CPG ou l'HPLC, aucun pic ne prend de l'importance ou n'apparaît en cours de fermentation, ceci écarte l'hypothèse d'une accumulation ou d'une production d'une substance inhibitrice. Comme nous l'avons vu dans la partie C (§ I.1.), l'acétate ne serait pas responsable de l'arrêt de la croissance.

Nous avons mis en évidence que la limitation de la densité cellulaire en fin de fermentation discontinue est due à une carence nutritionnelle et à une production d'une ou plusieurs substances

inhibitrices. Lors d'une culture discontinue de 24h, la carence apparaît d'abord pouvant masquer l'inhibition. Cette inhibition de la croissance déjà décrite par certains auteurs est cependant controversée. Ces substances inhibitrices seraient représentées par des acides organiques, mais leur mode d'action n'a jamais été détaillé. Dans notre cas nous pouvons affirmer qu'il ne s'agit ni de l'éthanol, ni du lactate ni de l'acétate. Des dosages plus approfondis des acides organiques combinés à une étude de leur influence sur la croissance permettraient d'identifier la ou les substances inhibitrices.

#### I.6. - Conclusion :

Nous venons d'étudier dans cette partie les cinétiques de consommation des substrats en cultures discontinues. Leur influence sur la croissance et la production de PA a été étudiée, et des interactions entre les substrats ont été mises en évidence. Les résultats suivants ont été obtenus :

- (1) ☞ La peptone est constituée de plusieurs fractions. Une première partie est consommée comme source de carbone et d'azote, entraînant une production d'ions ammonium. En présence d'une autre source de carbone, une seconde partie est assimilée comme source d'azote. Si le milieu ne contient que de la peptone, elle est toujours assimilée comme substrat carboné. Une partie de la fraction azotée de la peptone n'est pas assimilable.
- (2) ☞ La souche utilise les ions ammonium comme source azotée.
- (3) ☞ La peptone est indispensable à la production de PA, qui dans ces conditions est associée à la croissance.
- (4) ☞ L'APA est toujours consommé avant le glucose.
- (5) ☞ La consommation du glucose est inhibée par l'APA.
- (6) ☞ Les consommations de glucose et des ions ammonium sont liées.
- (7) ☞ En culture discontinue sur milieu "peptone", une carence nutritionnelle en azote et la présence d'une substance inhibitrice entraîneraient un ralentissement puis un arrêt de la croissance.
- (8) ☞ Durant ces cultures discontinues, les cellules sauvages ne sont jamais détectées (test de résistance à la tétracycline), le plasmide pXL20 est donc stable dans ces conditions de fermentation.





## II. - Etude des cinétiques et des performances en culture semi-continue

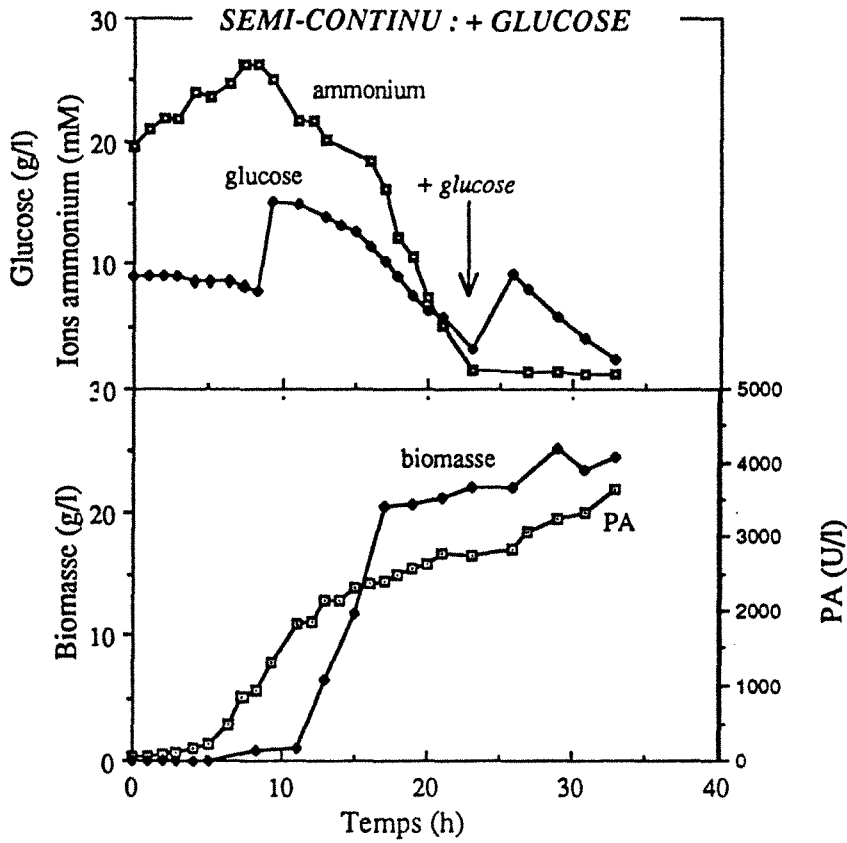
Comme dans la partie précédente, les cultures semi-continues sont maintenant analysées d'un point de vue cinétique et leur performances sont comparées.

⇒ Les cultures semi-continues sont réalisées afin d'améliorer les performances de production de la PA. En effet, le mode de culture en réacteur semi-continu permet généralement d'obtenir des concentrations cellulaires élevées et d'améliorer la productivité volumique en biomasse dans la mesure où il est possible d'agir sur une ou des concentrations en substrat dans le milieu de culture. Nous avons présenté dans la partie A, les avantages de ce mode de culture et les stratégies envisageables. Jusqu'à présent, notre approche était entièrement orientée vers la production de PA. Dans cette partie, les conditions d'alimentation seront étudiées de façon à améliorer la production de biomasse et par ce biais les performances de la souche. Nous utilisons deux critères pour comparer les performances des différents modes de culture : la productivité volumique en enzyme (U/l.h) qui est couramment utilisée et la production spécifique (U/g de biomasse). En effet, la PA est périplasmique et l'extraction d'une enzyme intracellulaire commence par une première étape de broyage des cellules. Une production spécifique élevée permet de minimiser les coûts incombants à la destruction des cellules qui représentent 15 à 20 % en moyenne du coût total de la purification d'une enzyme (HUSTED et coll., 1985). Ce pourcentage est donné à titre indicatif car il dépend du mode de purification employé. Pour l'étude du comportement de la souche, nous analyserons comme nous l'avons fait dans la partie précédente, les cinétiques de croissance, de production de la PA et de consommation des substrats.

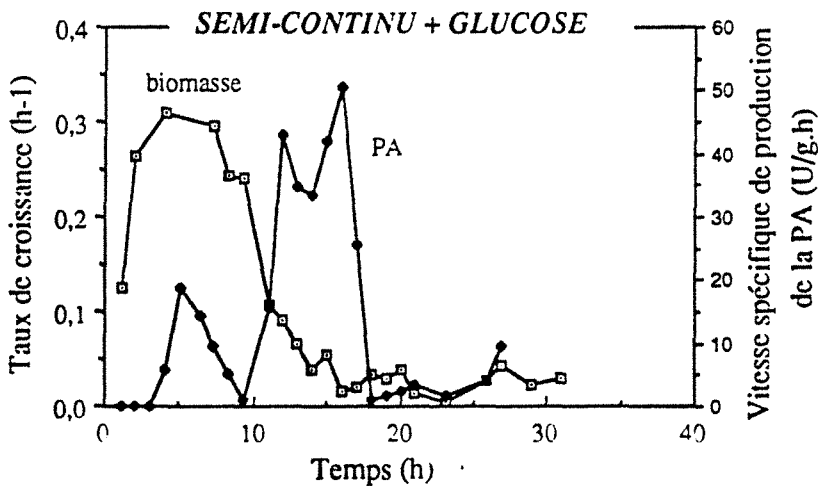
⇒ Pour l'étude du comportement de la souche, nous analyserons comme nous l'avons fait dans la partie précédente, les cinétiques de croissance, de production de la PA et de consommation des substrats en fonction du mode d'alimentation. Ainsi cette étude nous permettra de compléter voire de modifier les interprétations émises à partir des cinétiques en cultures discontinues. Ensuite, nous pourrons exploiter ces données dans un premier temps pour élaborer le modèle et dans un second temps pour le tester.

### II.1. - Etude des cinétiques et des performances en fonction du mode d'alimentation :

Nous avons réalisé plusieurs cultures semi-continues en modifiant l'alimentation de façon à améliorer les performances des fermentations. Nous avons commencé par réaliser des ajouts ponctuels de glucose ainsi que d'un mélange de glucose et de différentes sources d'azote (sulfate d'ammonium et chlorure d'ammonium). Ensuite, tenant compte des résultats précédents, nous



**Figure D 33 :** Cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats (glucose et ions ammonium) d'une culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 (FB n°1).  
 > ajout de glucose à la 10ème et la 22ème heure de culture.



**Figure D 34 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 : FB n°1).  
 > ajout de glucose à la 10ème et la 22ème heure de culture.

avons étudié l'influence d'une alimentation continue. Finalement, les performances obtenues par les précédentes cultures semi-continues nous ont mené à ajouter de l'APA au milieu d'alimentation.

Pour toutes ces fermentations semi-continues, nous utilisons les mêmes conditions de culture (température : 26°C, pH = 7, la concentration en oxygène dissous contrôlée à 40 % de la saturation) et le même milieu initial, contenant de l'extrait de levure pour favoriser la croissance (cf paragraphe D.I.1.). la composition initiale du milieu est : peptone 20 g/l, extrait de levure 15 g/l, glucose 10 g/l, NaCl 5 g/l et APA 2 g/l.

Nous allons décrire successivement pour chaque fermentation semi-continue les conditions d'alimentation et analyser les différentes cinétiques et les performances atteintes.

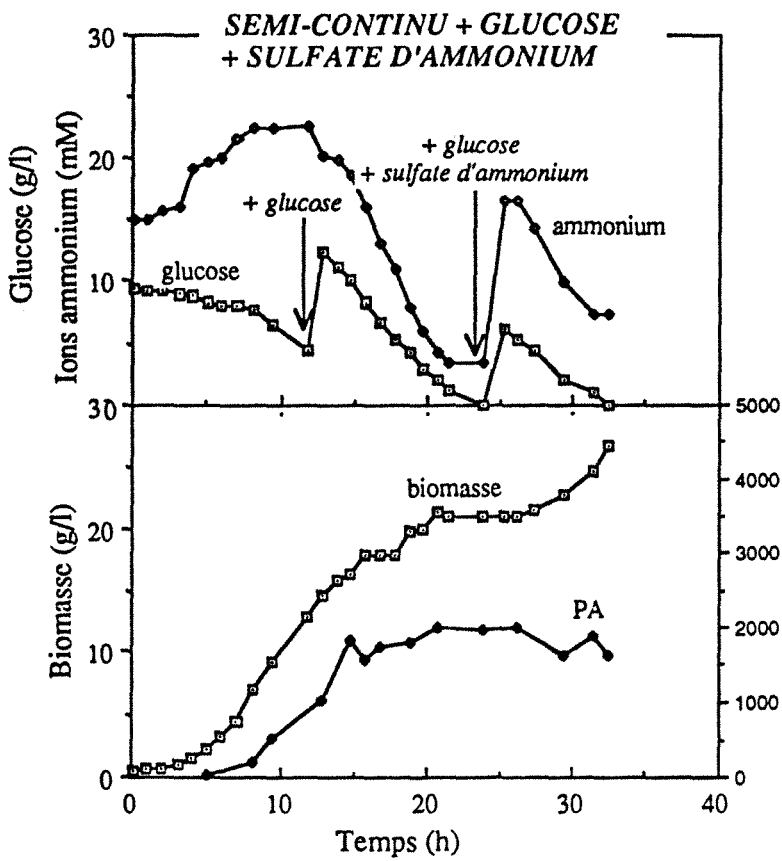
### *II.1.1. - Culture semi-continue avec un ajout de glucose*

➤ Une première fermentation semi-continue est réalisée avec deux ajouts ponctuels de glucose à la 10ème et 22ème heure de fermentation, de façon à ajuster la concentration dans le réacteur à 10 g/l.

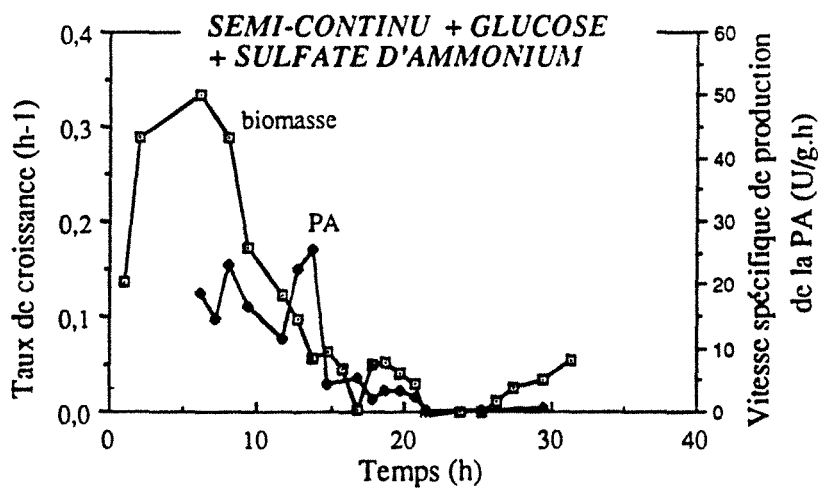
➡ La figure D 33 rend compte de l'évolution des concentrations en biomasse, PA, glucose et en ions ammonium au cours du temps. A la 22ème heure, il ne reste plus d'ions ammonium dans le milieu de culture, la croissance s'arrête. Nous obtenons en 33 h de culture 22 g/l de biomasse et 4070 U/l d'enzyme. Il n'apparaît pas de différence entre ces cinétiques et celle d'une culture discontinue.

➡ Les vitesses spécifiques de croissance et de production sont reportées en fonction du temps sur la figure D 34. Le taux de croissance diminue à partir de la 7ème heure de culture alors que la vitesse spécifique de production de la PA est maximale après la 10ème heure. Ces deux vitesses ne varient plus de la même façon contrairement aux observations faites jusqu'à présent.

La concentration finale en enzyme est supérieure à celle obtenue en culture discontinue (2500 U/l et 4 g/l de biomasse), mais la production spécifique est 3 fois plus faible. Lorsque les ions ammonium sont épuisés, la croissance s'arrête. Ces résultats nous suggèrent de réaliser la même culture mais en ajoutant une source d'azote de manière à prolonger la croissance et donc d'améliorer la production d'enzyme.



**Figure D 35:** Cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats (glucose et ions ammonium) d'une culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 (FB n°2).  
 > 13ème heure ajout de glucose, à la 15ème heure ajout d'APA, à la 25ème heure ajout de glucose et de sulfate d'ammonium.



**Figure D 36:** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 : FB n°2).  
 > 13ème heure ajout de glucose, à la 15ème heure ajout d'APA, à la 25ème heure ajout de glucose et de sulfate d'ammonium.

## II.1.2. - Culture semi-continue avec un ajout de glucose et d'une source d'azote

### II.1.2.1. - Ajout de glucose et de sulfate d'ammonium

➤ Pour cette culture en réacteur semi-continu, nous voulons prolonger la croissance en ajoutant du sulfate d'ammonium. De l'APA est aussi introduit dans le milieu de culture de façon à améliorer la production de PA. A la 25ème heure, du sulfate d'ammonium est ajouté en plus du glucose (10 g/l à la 13ème et 25ème heure), de façon à ajuster la concentration en ions ammonium à 10 mM dans le réacteur. L'APA est généralement consommé durant les 12 premières heures. L'inducteur est ajouté au milieu de culture à la 15ème heure, sa concentration dans le réacteur est ajustée à 1 g/l.

➡ La **figure D 35** permet de suivre les cinétiques de croissance de production de la PA et de consommation du glucose et des ions ammonium au cours du temps. La croissance est effectivement prolongée grâce à l'ajout du sulfate d'ammonium. Lorsque la concentration résiduelle en glucose est nulle, les ions ammonium ne sont plus assimilés. La production de PA est très faible par rapport à la fermentation précédente. Nous obtenons en 33 h 27 g/l de biomasse et la production enzymatique ne dépasse pas 1695 U/l : seule la croissance est améliorée. La production spécifique diminue, elle est 3,6 fois plus faible que précédemment. Le sulfate d'ammonium peut être responsable de cette baisse des performances entre ces deux fermentations.

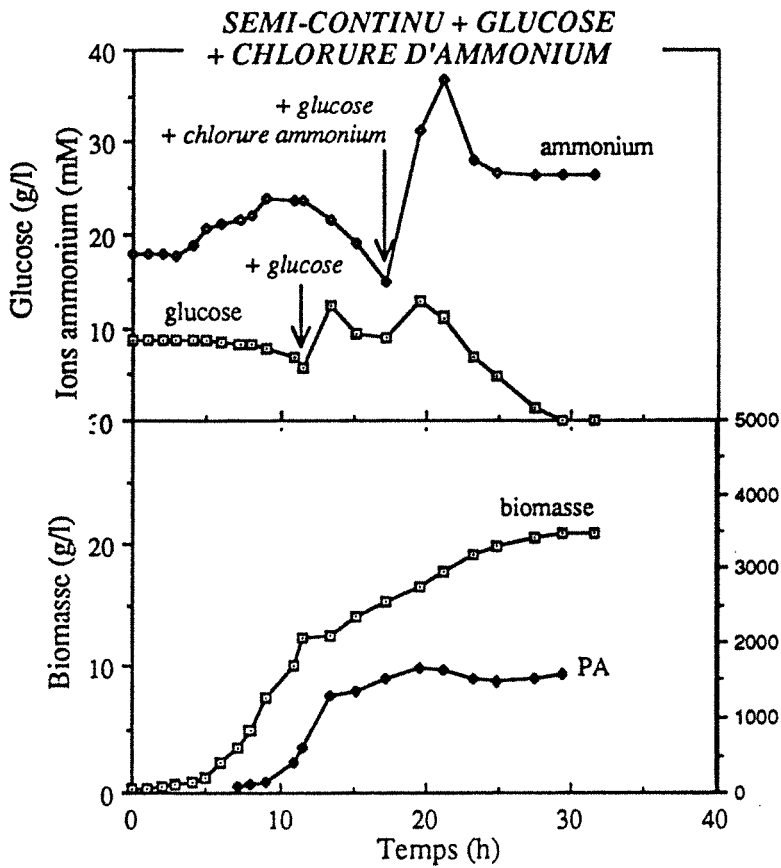
➡ D'après la **figure D 36**, nous constatons que les vitesses spécifiques de croissance et de production de l'enzyme évoluent de la même façon au cours du temps. Bien que la vitesse spécifique de production de la PA soit plus faible qu'en culture discontinue, nous retrouvons ici la même allure entre ces deux courbes.

Pour la culture semi-continue suivante, le sulfate d'ammonium est remplacé par du chlorure d'ammonium afin de tester l'influence de la source d'azote.

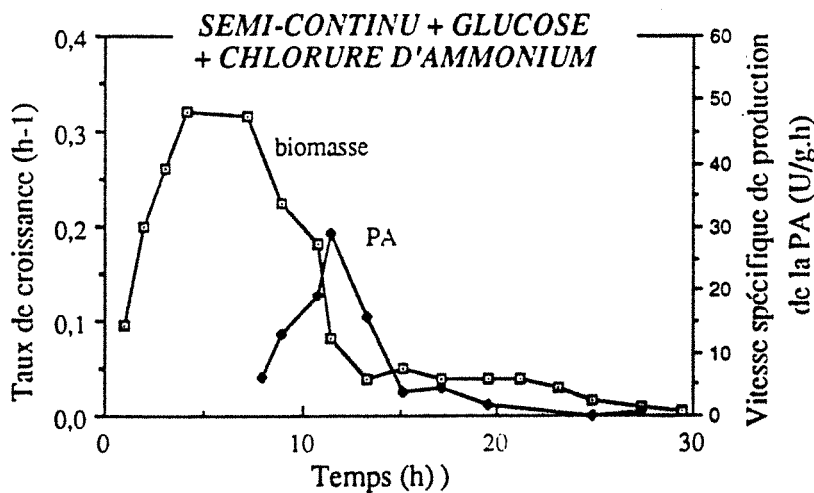
### II.1.2.2. - Ajout de glucose et de chlorure d'ammonium

➤ La concentration en glucose dans le réacteur est ajustée à 10 g/l à la 12ème heure de culture et à la 19ème heure, les concentrations en chlorure d'ammonium, en APA et en glucose dans le milieu de culture sont ajustées respectivement à 10 mM, 1 g/l et 10 g/l.

➡ Les cinétiques obtenues au cours de cette culture sont reportées sur la **figure D 37**. Nous constatons qu'il n'y a pas de différence avec la fermentation précédente. Les concentrations finales en biomasse et en PA sont respectivement de 21 g/l et 1550 U/l (en 32h).



**Figure D 37 :** Cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats (glucose et ions ammonium) d'une culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 (FB n°3).  
 > 12ème heure ajout de glucose, à la 19ème heure ajout de glucose de l'APA et de chlorure d'ammonium.



**Figure D 38 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 : FB n°3).  
 > 12ème heure ajout de glucose, à la 19ème heure ajout de glucose de l'APA et de chlorure d'ammonium.

➔ Comme précédemment, nous constatons d'après la **figure D 38** que le taux de croissance et la vitesse spécifique de production de la PA varient de la même façon et sont du même ordre de grandeur.

### II.1.2.3. - Influence de la source d'azote ajoutée sur les performances des cultures semi-continues

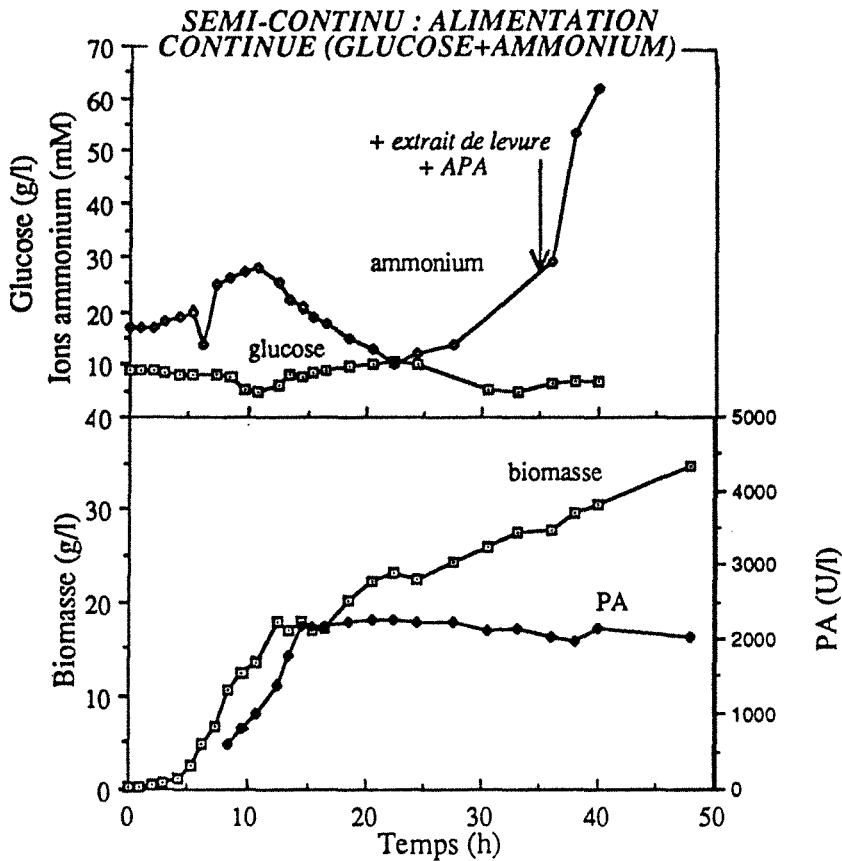
➔ Les performances finales des fermentations avec ajout de sulfate d'ammonium et de chlorure d'ammonium sont regroupées dans le **tableau D 4**. La densité cellulaire finale ainsi que la productivité en biomasse sont légèrement plus élevées pour la première fermentation. Il en est de même pour la concentration finale en PA, alors que la production spécifique en enzyme est légèrement meilleure pour la deuxième fermentation.

	+ sulfate d'ammonium (FB n°2)	+ chlorure d'ammonium (FB n°3)
Biomasse (g/l)	27	21
PA (U/l)	1695	1550
PA/X (U/g)	52	75
productivité (g de X/l.h)	0,81	0,65

**Tableau D 4** : Influence de la source d'azote (sulfate ou chlorure d'ammonium) sur les performances de la souche *E. coli* G271 (FB n°2 et FB n°3) : comparaison des concentrations finales en biomasse, PA, de la production spécifique en PA et de la productivité volumique en enzyme.

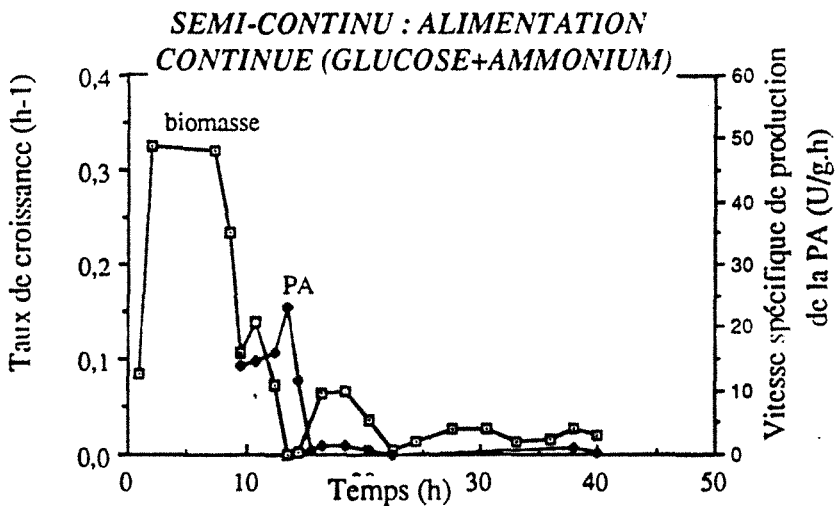
Le changement de la source d'azote n'a pas donc pas entraîné d'importantes modifications de la croissance ni de la production d'enzyme. Nous gardons pour les fermentations suivantes le sulfate d'ammonium dans la mesure où cette source d'azote est en générale celle qui est ajoutée en cours de fermentation pour la production de PA (SHEWALE et SIVARAMAN, 1989).

Pendant la phase de production de la PA du premier semi-continu, le rapport de la concentration en ions ammonium sur la concentration en glucose est de  $2.10^{-3}$  mole/g. Afin d'améliorer les résultats obtenus au cours du premier semi-continu, nous réalisons une 4ème culture en réacteur semi-continu en alimentant en continu, avec une solution contenant des ions ammonium et du glucose dans un rapport de  $2.10^{-3}$  mole/g.



**Figure D 39 :** Cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats (glucose et ions ammonium) d'une culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 (FB n°4).

➤ alimentation continue contenant du glucose et du sulfate d'ammonium, ajout d'extrait de levure à la 36ème heure.



**Figure D 40 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 : FB n°4).

➤ alimentation continue contenant du glucose et du sulfate d'ammonium, ajout d'extrait de levure à la 36ème heure.



### II.1.3. - Culture semi-continue avec une alimentation continue en glucose et en sulfate d'ammonium

➤ L'alimentation du réacteur débute à la 10<sup>ème</sup> heure de culture, le débit est de 30 ml/h et le rapport entre les concentrations en ions ammonium et en glucose dans le milieu d'alimentation est de  $2 \cdot 10^{-3}$  mole/g. A la 36<sup>ème</sup> heure, de l'extrait de levure et de l'APA sont ajoutés dans le fermenteur de façon à ajuster leur concentration respectivement à 15 g/l et 1 g/l. Nous étudions l'influence de l'ajout des deux substrats sur la production de PA.

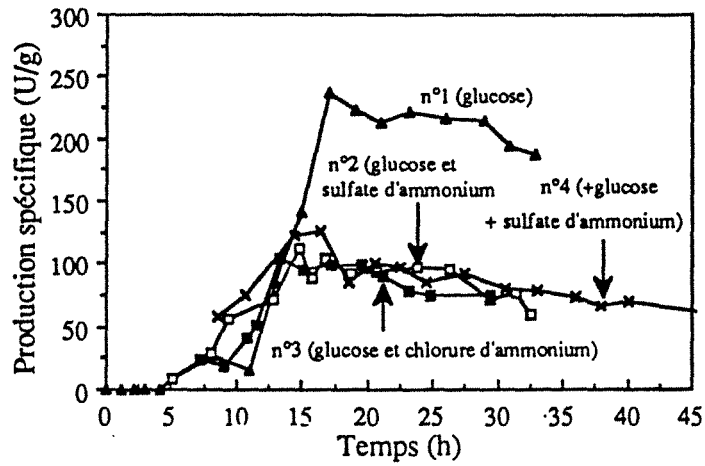
➡ Les cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation du glucose et des ions ammonium reportées sur la **figure D 39** sont comparables aux courbes précédemment décrites. Nous obtenons en 40 heures de fermentation 35 g/l de biomasse et 2030 U/l de PA. L'ajout ponctuel d'extrait de levure et d'APA provoque une reprise de la croissance et une production d'ions ammonium car le glucose est complètement épuisé, la production de PA, stabilisée depuis la 20<sup>ème</sup> heure de culture, n'est pas perturbée.

➡ La **figure D 40** représente l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de production de l'enzyme en fonction du temps. Ce graphe met en évidence que pour cette fermentation, les variations du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA sont concomitantes.

L'alimentation continue ne permet pas d'atteindre la concentration finale en PA ni la production spécifique obtenues avec la première fermentation semi-continue. D'après les cinétiques de consommation de l'APA en culture discontinue, nous savons que ce substrat est complètement consommé avant la 15<sup>ème</sup> heure de fermentation, de ce fait, la concentration en APA est restée nulle jusqu'à la 36<sup>ème</sup> heure. D'après la bibliographie, nous savons que pour obtenir une meilleure induction il faut ajouter l'APA le plus tôt possible. Or, pour cette fermentation l'inducteur a été ajouté vraisemblablement trop tard. D'autre part, comme nous l'avons constaté en culture discontinue, l'extrait de levure n'améliore que la croissance.

### II.1.4. - Comparaison des performances entre les fermentations semi-continues réalisées en ajoutant du glucose et/ou une source d'azote

➡ Les performances atteintes en cultures semi-continues sont rassemblées dans le **tableau D 5**. Une alimentation avec du glucose comme source de carbone et des ions ammonium comme source d'azote est suffisante pour prolonger la croissance (**Tab. D 5** : FB n° 2, 3 et 4). Une alimentation



**Figure D 41** : Evolution au cours du temps des productions spécifiques en PA : comparaison entre les fermentations semi-continues FB n° 1 à FB n°4 .

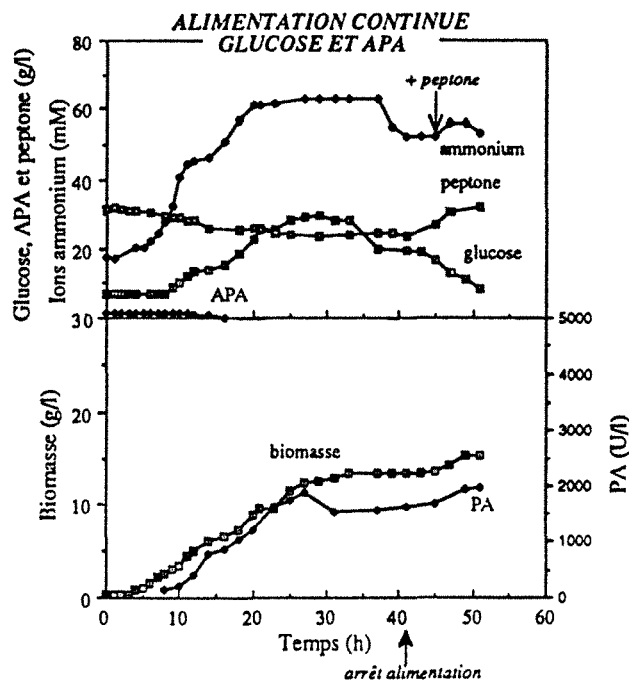
continue permet d'obtenir 33 g/l de biomasse (Tab. D 5 : FB 4). Pour la première fermentation, les performances concernant la production de biomasse sont comparables aux autres cultures, en revanche, la concentration finale en PA, la productivité volumique en enzyme et la production spécifique sont très élevées (Tab. D 5).

	Biomasse finale (g/l)	PA finale (U/l)	PA/biomasse final (U/g)	productivité en biomasse (g de X/l.h)	productivité en PA (U/l.h)
FB n°1 + glucose à 10 et 22 h	22	4070	187	0,66	123
FB n°2 + glucose à 13 et 25 h + APA à 15 h + ammonium à 25 h	27	1695	52	0,81	53
FB n°3 + glucose à 12 et 19 h + ammonium et APA à 19h	21	1550	75	0,65	49
FB n°4 alimentation continue (30ml/h) glucose (500g/l) ammonium (800mM) + APA à 36 h + extrait de levure à 36 h	30	2030	66	0,76	51

**Tableau D 5 :** Comparaison des performances des fermentations semi-continues FB n° 1 à FB n°4 .

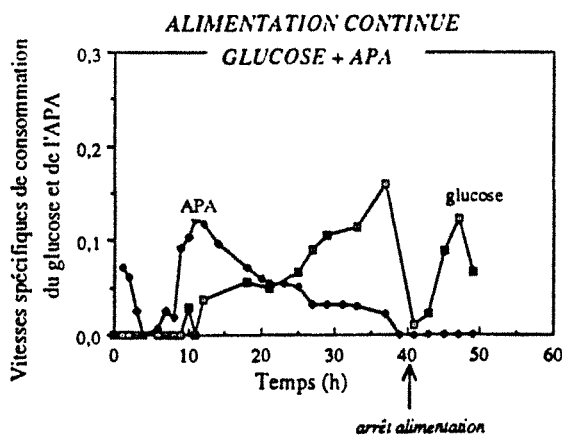
➔ La figure D 41 permet de comparer les productions spécifiques des différentes fermentations semi-continues. La production spécifique en PA se stabilise dès la 15ème heure de fermentation, pour toutes les cultures réalisées en réacteur semi-continu sauf pour la première. Les performances atteintes par cette première culture n'ont pas été reproduites. La seule différence avec la deuxième fermentation réside dans l'ajout d'ions ammonium à la 25ème heure. Or dès la 15ème heure de fermentation, la productivité spécifique de la première culture est déjà nettement supérieure. La différence entre les performances atteintes n'est donc pas due à l'ajout des ions ammonium. Les concentrations initiales en biomasse, en glucose, en peptone et en ions ammonium sont identiques pour ces deux fermentations. La différence de comportement peut donc provenir de la préculture, ou d'une concentration initiale plus élevée en APA dans le milieu de culture du premier semi-continu ou encore d'une erreur de dosage d'un des composants du milieu.

La production spécifique en fermentation discontinue augmente durant toute la durée de la culture (Fig. D 15). En revanche, pour les fermentations semi-continues la production spécifique se stabilise à partir de la 15ème heure. La production de PA et la croissance sont toujours associées mais la vitesse spécifique de production de l'enzyme est plus faible. D'autre part, nous constatons



**Figure D 42 :** Cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats (glucose, APA, peptone et ammonium) d'une culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 (FB n°5).

> alimentation continue contenant du glucose, du sulfate d'ammonium et de l'APA, ajout de peptone à la 45ème heure.



**Figure D 43 :** Evolution des vitesses spécifiques de consommation du glucose et de l'APA au cours d'une culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 (FB n°5).

> alimentation continue de glucose et de sulfate d'ammonium, ajout d'extrait de levure à la 36ème heure.

que les cellules sauvages n'ont pas été détectées au cours de ces fermentations semi-continues. Cette baisse de performance ne peut donc pas être attribuée a priori à une diminution du contenu plasmidique. Seul un dosage de l'ADN plasmidique permettrait de mettre en évidence une éventuelle instabilité du vecteur. Les ajouts d'APA réalisés pour les cultures semi-continues ont souvent été tardifs et toujours faibles par rapport à la concentration en biomasse dans le réacteur. Afin d'améliorer la production spécifique, nous allons étudier plus en détail l'ajout de l'inducteur. Une alimentation contenant du glucose et des ions ammonium permet d'obtenir une bonne croissance. A partir de ce résultat, nous souhaitons améliorer la production en ajoutant au milieu d'alimentation (glucose et sulfate d'ammonium) de l'APA.

## II.2. - Etude de l'ajout de l'acide phénylacétique :

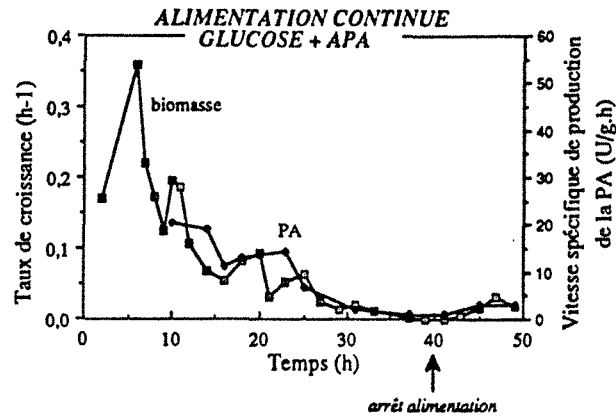
Nous avons réalisé une première fermentation semi-continue en alimentant avec le même milieu que la précédente culture semi-continue mais en ajoutant de l'APA dans le milieu d'alimentation. Les résultats obtenus nous ont conduits à modifier la composition du milieu d'alimentation : l'APA est le seul substrat ajouté.

### *II.2.1. - Alimentation du réacteur avec du glucose et de l'acide phénylacétique*

➤ Pour cette culture, le milieu d'alimentation contient donc, du glucose et des ions ammonium (le rapport est toujours de  $2 \cdot 10^{-3}$  mole/g) et de l'APA (80g/l). L'alimentation de la fermentation semi-continue débute à la 9ème heure de culture et s'arrête à la 39ème heure (débit 42 ml/h).

➡ La **figure D 42** permet de suivre les cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats au cours de cette fermentation. La croissance et la production d'enzyme sont faibles, en 39 heures de culture, nous obtenons 15 g/l de biomasse et 1960 U/l d'enzyme. La concentration résiduelle en APA est nulle à partir de la 15ème heure de culture : l'APA est complètement consommé. Le glucose et les ions ammonium s'accumulent dans le milieu de culture et atteignent à la 30ème heure, des concentrations respectivement de 30 g/l et 60 mM. Dès que l'alimentation est stoppée (39ème heure), les concentrations résiduelles de ces deux substrats diminuent. Suite à un ajout de peptone dans le réacteur (à la 45ème heure), les ions ammonium sont produits alors que le glucose est toujours consommé : les consommations de ces deux substrats ne sont plus concomitantes.

➡ Nous avons reporté sur la **figure D 43**, les vitesses spécifiques de consommation du glucose et de l'APA. En début de fermentation (11 premières heures), la vitesse spécifique de consommation du glucose est nulle alors que celle de l'APA est maximale. Puis la vitesse



**Figure D 44 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 : FB n°5).  
 ➤ alimentation continue de glucose et de sulfate d'ammonium, ajout d'extrait de levure à la 36ème heure.

spécifique de consommation de l'APA diminue et parallèlement celle du glucose augmente, ceci confirmant l'inhibition de la consommation du glucose par l'APA.

➔ La figure D 44 décrit l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de production de la PA au cours du temps. Le taux de croissance chute très rapidement dès la 10<sup>ème</sup> heure de culture et il n'est plus que de 0,008 h<sup>-1</sup> à partir de la 20<sup>ème</sup> heure. A la 20<sup>ème</sup> heure de fermentation, les concentrations en glucose et en ions ammonium sont respectivement de 20 g/l et 60 mM (Fig. D 41). La vitesse spécifique de production en PA est également peu élevée. Ces deux vitesses évoluent néanmoins de la même façon.

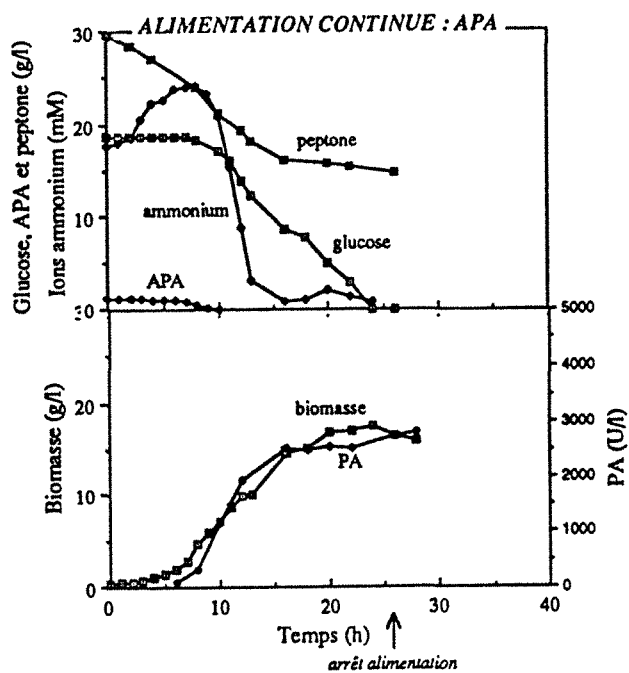
Une alimentation contenant du glucose, du sulfate d'ammonium et de l'APA ne favorise pas la croissance, il y a accumulation de glucose et des ions ammonium dans le milieu de culture. KOLE et coll. (1985) ont montré qu'entre 1 et 100 mM la concentration en ions ammonium n'avait pas d'influence sur le taux de croissance d'*E. coli*. Le ralentissement de la croissance observé dès la 20<sup>ème</sup> heure de la fermentation semi-continue alimentée simultanément avec du glucose et de l'APA, serait dû soit à la présence d'une ou des substances inhibitrices soit à l'accumulation du glucose. La baisse de la vitesse spécifique de production est en accord avec les observations précédentes : la souche *E. coli* G271 serait encore soumise à la répression catabolique.

D'autre part, nous devons modifier les hypothèses précédemment émises, à savoir que les consommations de glucose et d'ammonium ne sont pas toujours liées. D'après KOLE et coll. (1985), les ions ammonium ne stimulent pas la glycolyse, ils sont utilisés pour la synthèse de protéines actives dans le transport du glucose : ces deux substrats ne sont pas obligatoirement assimilés simultanément. D'autre part, nous constatons comme ROBBINS et TAYLOR (1989), que l'assimilation des substrats carbonés ne s'arrête pas lorsque la source d'azote (et notamment les ions ammonium) est épuisée.

Afin de confirmer ces précédentes observations, la culture semi-continue suivante est réalisée en alimentant seulement avec de l'APA de façon à éviter l'accumulation du glucose et des ions ammonium.

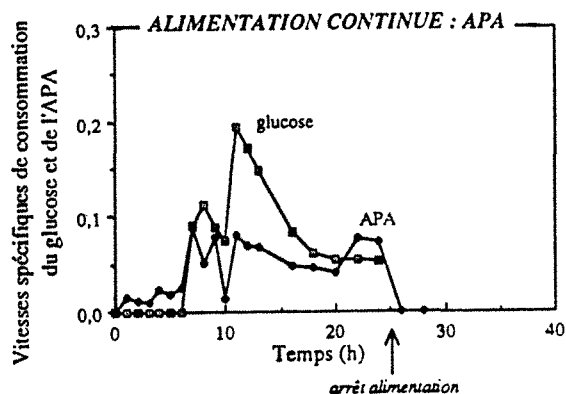
### *II.2.2. - Alimentation du réacteur avec de l'acide phénylacétique*

➤ L'alimentation de cette fermentation semi-continue contient de l'APA (80 g/l), et le débit d'alimentation est de 69 ml/h, à la 25<sup>ème</sup> heure l'alimentation est arrêtée.



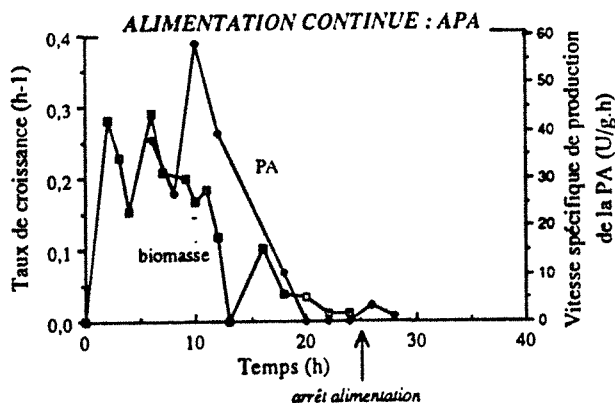
**Figure D 45 :** Cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats (glucose, APA, peptone et ammonium) d'une culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 (FB n°6).

➤ alimentation continue contenant de l'APA et du sulfate d'ammonium.



**Figure D 46 :** Evolution des vitesses spécifiques de consommation du glucose et de l'APA au cours du temps (culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 : FB n°6).

➤ alimentation continue contenant de l'APA et du sulfate d'ammonium.



**Figure D 47 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA cours du temps (culture semi-continue de la souche *E. coli* G271 : FB n°6).

➤ alimentation continue contenant de l'APA et du sulfate d'ammonium.



➔ La **figure D 45** permet de suivre les cinétiques de croissance, de production de l'enzyme et de consommation des substrats. Ces cinétiques ont une allure comparable aux précédentes. A partir de la 15<sup>ème</sup> heure de fermentation, la concentration en ions ammonium est nulle, la croissance s'arrête et le glucose est toujours consommé. Nous obtenons en 24 h 18 g/l de biomasse et 2800 U/l d'enzyme.

➔ Les vitesses spécifiques de consommation de l'APA et du glucose sont comparées sur la **figure D 46**. La vitesse spécifique de consommation de l'APA est constante tant que le réacteur est alimenté. En revanche, le glucose étant dans ce cas absent du milieu d'alimentation, sa vitesse spécifique de consommation diminue durant la fermentation.

➔ La **figure D 47** qui représente l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de production de PA, montre que la croissance est très fortement ralentie à partir de la 15<sup>ème</sup> heure c'est-à-dire, lorsque les ions ammonium sont épuisés (**Fig. D 45**). Comparée à la précédente fermentation, la vitesse spécifique de production de PA est dans ce cas plus élevée. Ces deux vitesses spécifiques évoluent toujours dans le même sens.

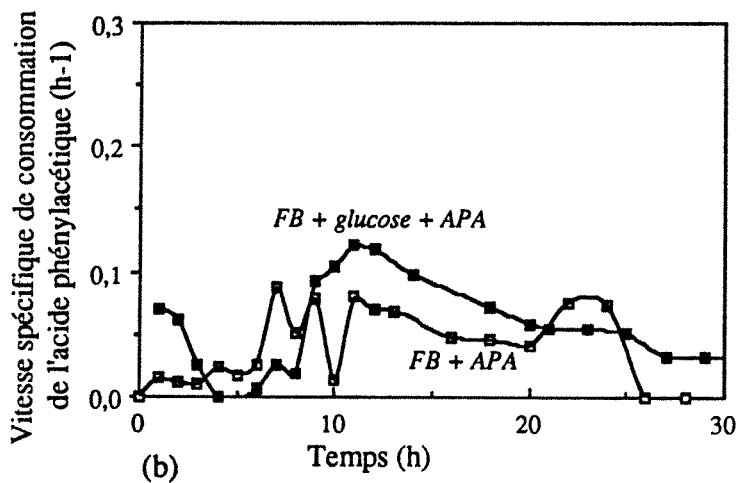
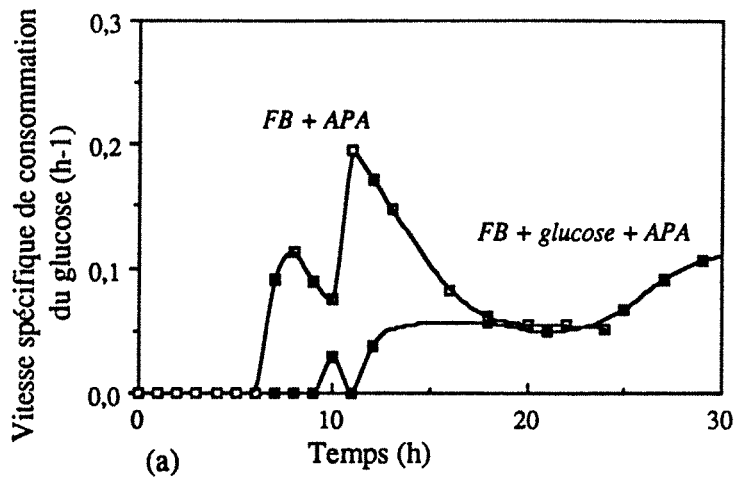
### *II.2.3. - Comparaison des cultures semi-continues réalisées avec une alimentation mixte glucose et acide phénylacétique et une alimentation ne contenant que de l'acide phénylacétique*

➔ La **figure D 48 (a et b)** permet de comparer l'évolution des vitesses spécifiques de consommation du glucose (a) et de l'APA (b) entre les deux précédentes cultures semi-continues (l'alimentation contient de l'APA). Nous constatons que l'APA est consommé de façon similaire. Le glucose est consommé plus lentement lorsque l'alimentation est mixte. Mise à part l'inhibition de la consommation du glucose par l'APA, ces fermentations ne révèlent aucun autre type d'interaction entre les deux substrats.

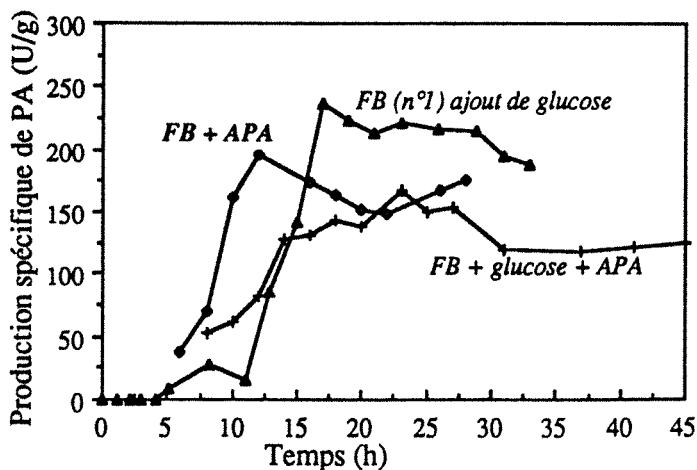
➔ Les productions spécifiques en PA de ces fermentations ainsi que celle de la première culture semi-continue (ajout ponctuel de glucose) sont reportées sur la **figure D 49**. Une alimentation en APA permet d'obtenir une production spécifique en PA plus élevée qu'une alimentation mixte, et de retrouver les performances obtenues lors de la première culture semi-continue.

➔ Les valeurs des taux de croissance successivement atteints au cours des fermentations FB n°4 (alimentation en glucose) FB n°5 (alimentation en glucose et APA) et FB n°6 (alimentation en APA) sont reportées sur le **tableau D 6**. L'ajout d'APA dans l'alimentation des fermentations FB n°5 (alimentation en glucose et APA) et FB n°6 (alimentation en APA), permet d'améliorer la croissance





**Figure D 48:** Evolution des vitesses spécifiques de consommation du glucose (a) et de l'APA (b) cours du temps : comparaison entre une alimentation mixte glucose et APA (FB n°5) et une alimentation ne contenant que de l'APA (FB n°6).



**Figure D 49:** Evolution des productions spécifiques en PA au cours du temps : comparaison entre un ajout ponctuel de glucose (FB n°1), une alimentation mixte glucose et APA (FB n°5) et une alimentation ne contenant que de l'APA (FB n°6).



durant la première phase de la culture ( $\mu_1$ ). Lorsque l'APA est utilisé comme seule source de carbone, le taux de croissance de la deuxième phase ( $\mu_2$ ) est plus élevé. Le taux de croissance de la troisième phase ( $\mu_3$ ) est très faible pour la fermentation FB n°6 (alimentation en APA) car l'azote est limitant.

	FB n°4 glucose	FB n°5 glucose+APA	FB n°6 APA
$\mu_1$ (h <sup>-1</sup> )	0,26	0,37	0,35
$\mu_2$ (h <sup>-1</sup> )	0,04	0,06	0,14
$\mu_3$ (h <sup>-1</sup> )	0,02	0,008	0,003

**Tableau D 6 :** Taux de croissance de la souche *E. coli* G271 calculés pendant la phase exponentielle ( $\mu_1$ ), la phase suivante de ralentissement de la croissance ( $\mu_2$ ) et la 3ème phase où la croissance est très faible ( $\mu_3$ ) : comparaison entre une alimentation ne contenant que du glucose (FB n°4), une alimentation mixte glucose et APA (FB n°5) et une alimentation ne contenant que de l'APA (FB n°6).

Une alimentation contenant seulement de l'APA permet d'améliorer la production spécifique par rapport à une alimentation mixte contenant du glucose et de l'APA. Cependant, la première fermentation semi-continue (alimentation ponctuelle en glucose) permet d'atteindre la production spécifique en enzyme la plus élevée. La croissance est meilleure lorsque l'APA n'est pas ajouté avec le glucose.

### II.3: - Conclusion

En conclusion à cette étude sur la fermentation semi-continue de *E. coli* G271, résumons d'une part les contributions cinétiques apportées par ce mode de culture, et comparons d'autre part les performances atteintes en fonction du mode d'alimentation.

☞ La souche *E. coli* G271 se comporte en culture semi-continue de la même façon qu'en culture discontinue. L'analyse des cultures semi-continues permet de confirmer voire modifier certaines observations :

- la consommation du glucose est inhibée par l'APA,
- l'extrait de levure permet d'améliorer la croissance mais il n'a pas d'influence sur la production enzymatique,

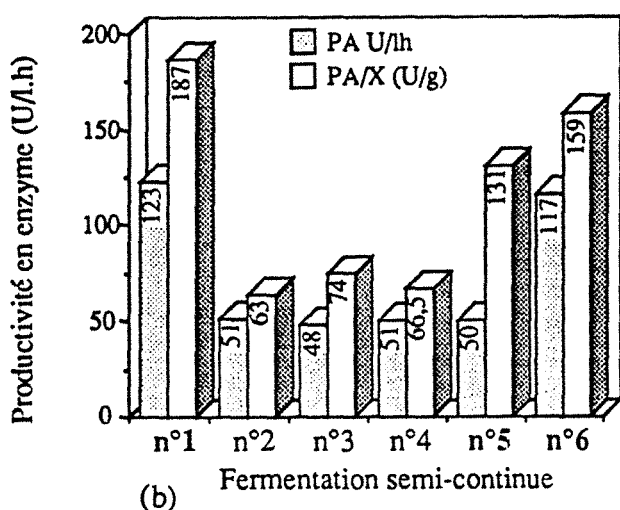
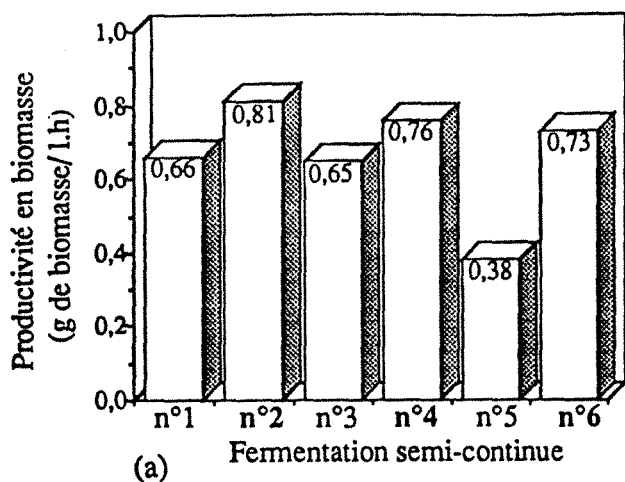


Figure D.50 : Comparaison des productivités volumiques en biomasse (a), des productivités volumiques et des productions spécifiques en enzyme (b) entre les différentes cultures semi-continues (souche *E. coli* G271).

> FB n°1 ajout ponctuel de glucose, FB n°2 ajout ponctuel de glucose et de sulfate d'ammonium, FB n°3 ajout ponctuel de glucose et de chlorure d'ammonium, FB n°4 alimentation contenant que du glucose, FB n°5 alimentation mixte glucose et APA et FB n°6 alimentation ne contenant que de l'APA.

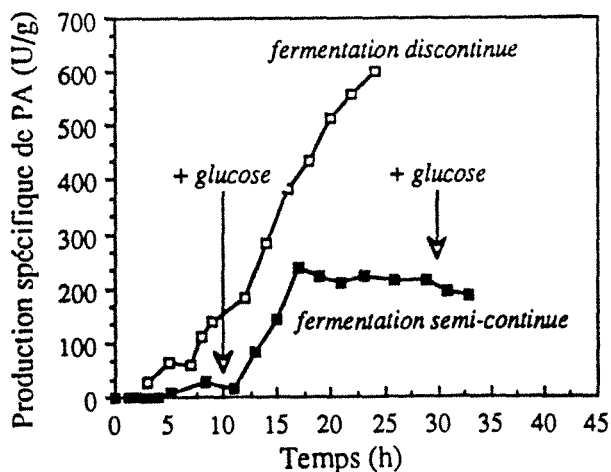


Figure D.51 : Comparaison des productions spécifiques en PA entre une culture discontinue et semi-continue (FB n°1 : ajout ponctuel de glucose).

- la croissance et la production de PA sont toujours associées,
- la souche serait partiellement soumise à la répression catabolique par le glucose,
- les ions ammonium et le glucose ne sont pas obligatoirement consommés simultanément,
- le glucose est toujours assimilé même en absence d'ions ammonium,
- la consommation des ions ammonium est stoppée dès que les concentrations résiduelles en APA et en glucose sont nulles.

👁 Les performances des cultures semi-continues :

➡ La **figure D 50 (a et b)** permet de comparer les performances atteintes entre toutes les fermentations semi-continues réalisées. Sur la **figure D 50 (a)** sont reportées les productivités volumiques en biomasse tandis que la **figure D 50 (b)** montre les productions spécifiques finales en PA et les productivités volumiques en enzyme. Nous obtenons une meilleure productivité en biomasse en alimentant avec du glucose ou de l'APA comme source de carbone et des ions ammonium comme source d'azote (FB n° 2, 4 et 6). Cependant dès que nous utilisons une alimentation mixte contenant à la fois du glucose et de l'APA (FB n° 5), la compétition entre les consommations de ces deux substrats entraîne une diminution de la productivité spécifique en biomasse (FB n° 5). CUTAYAR et POILLON (1989) atteignent une productivité volumique en biomasse de 9 g/l.h en utilisant une souche sauvage de *E.coli* et en aérant avec de l'air enrichi en oxygène. Nous obtenons une productivité volumique en biomasse 10 fois plus faible (0,8 g/l.h), mais il faut tenir compte du taux de croissance maximum de la souche G271 qui est très faible pour une souche de *E. coli* (0,3 h<sup>-1</sup>). Mise à part la première culture semi-continue, une alimentation contenant seulement de l'APA permet d'améliorer la production spécifique et la production volumique en PA (FB n° 6). Avec une alimentation mixte, une bonne production spécifique est atteinte, mais la productivité volumique en PA est très faible (FB n° 5). Une alimentation en APA seule permet d'obtenir des performances intéressantes. Une alimentation séparée entre le glucose et l'APA permettrait de tester si une alimentation mixte nuit effectivement à la production de la PA ou si cette baisse de production n'est pas simplement due à la répression catabolique.

➡ La **figure D 51** représente l'évolution de la production spécifique en PA pour une culture discontinue et pour la première fermentation semi-continue qui a permis d'obtenir les meilleures performances. A partir de la 15ème heure de fermentation, la production spécifique en PA pour la culture semi-continue se stabilise, alors qu'elle augmente toujours pour la culture discontinue. Nous constatons donc que quelles que soient les conditions opératoires des fermentations semi-continues, les productions spécifiques obtenues ne dépassent jamais celles des cultures discontinues. Cette baisse de performance en culture semi-continue n'est pas liée à une carence en inducteur ni en glucose ni même en ions ammonium. Durant ces fermentations semi-continues nous avons toujours eu 100 % de cellules recombinées. Le plasmide pXL20 est stable pendant ces





cultures. Cependant, bien qu'il n'y ait pas de cellules sensibles à la tétracycline dans le réacteur, le contenu plasmidique des cellules peut diminuer. La diminution de la production spécifique entre ces deux modes de culture pourrait être due à une diminution du nombre de copies de plasmides par cellule ou/et à une carence en peptone (seul composant absent du milieu d'alimentation). Nous compléterons cette première étude comparative des performances entre les différents modes de culture dans une partie suivante (paragraphe IV).

### III. - Etude des cinétiques et des performances en cultures continues

Après avoir mis en œuvre des cultures discontinues et semi-continues et exploité les résultats obtenus, le mode de culture continue est utilisé afin de compléter nos connaissances sur le comportement de la souche *E. coli* G271, et d'étudier les performances et la stabilité du vecteur dans ces conditions de fermentation.

Nous avons constaté que le plasmide pXL20, issu du plasmide pBR322, est stable en cultures discontinues et semi-continues. Le plasmide pBR322 est décrit comme étant stable pendant 50 générations (SAN et WEBER, 1989). La stabilité est un problème majeur dans la mesure où les cellules sauvages qui apparaissent dans le milieu de culture se développent plus rapidement que les cellules recombinées. Finalement, la population du réacteur n'est composée que de cellules mères. La stabilité d'un vecteur dans la souche hôte est sensible à différents paramètres qui sont entre autres, le taux de dilution et la composition du milieu de culture. Le mode de culture en réacteur continu est l'outil adéquat pour étudier la stabilité du plasmide. Nous ne prenons pas en compte dans ce travail l'instabilité structurale. L'instabilité d'un couple hôte vecteur est définie par deux paramètres :

- ⇒ la probabilité de perte d'un plasmide pour une cellule,
- ⇒ la différence des taux de croissance de la souche recombinée et de la souche sauvage.

Nous allons donc faire varier le taux de croissance et la composition du milieu d'alimentation et étudier successivement :

⇒ les cinétiques de croissance, de production de la PA et de consommation des substrats ainsi que les performances,

⇒ la stabilité du contenu plasmidique. En effet, ces cultures seront surtout utilisées pour étudier les cinétiques de disparition des cellules recombinées afin de déterminer l'influence du taux de croissance et de la composition du milieu d'alimentation sur la stabilité du vecteur.

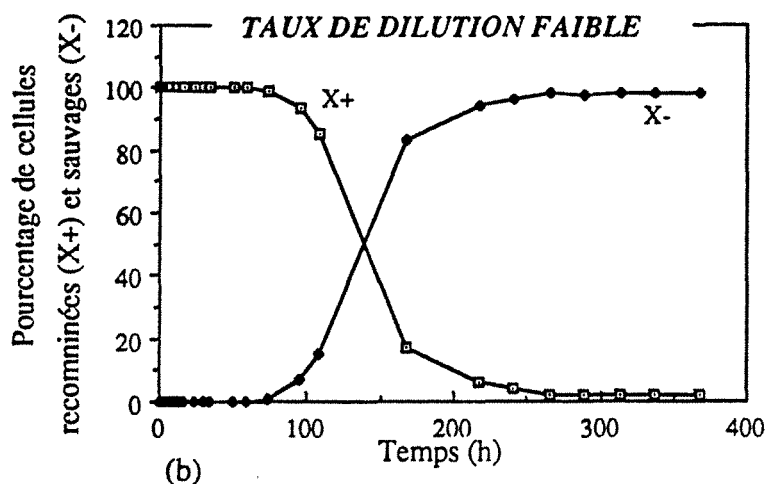
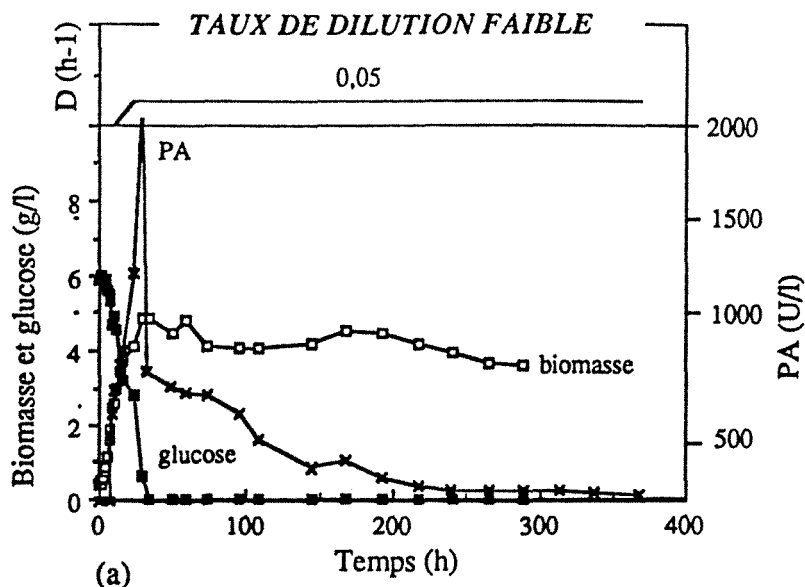


Figure D 52 : Culture continue C1 :

(a) Cinétiques de croissance, de production de PA, de consommation des substrats (glucose et ions ammonium).

(b) Evolution des populations de cellules sauvages (X-) et recombinées (X+) au cours du temps.

▷ taux de dilution (D) : 0,05 h<sup>-1</sup>.

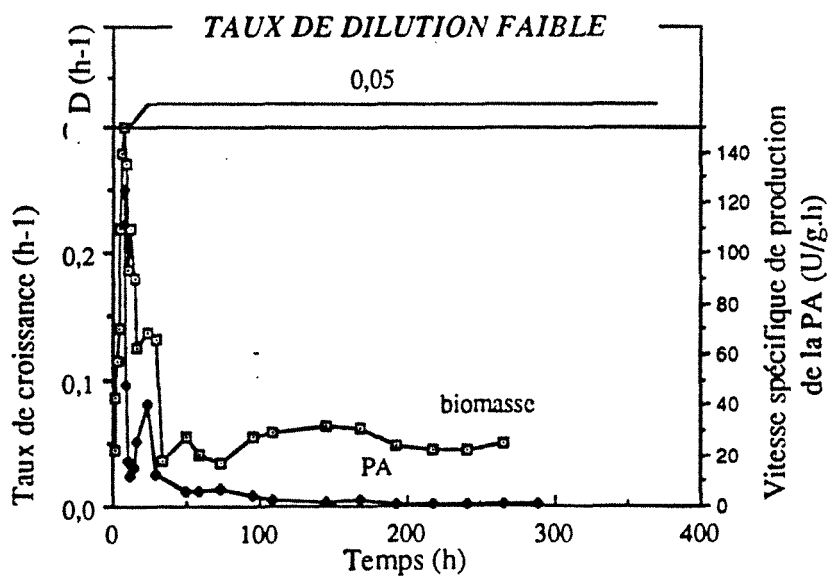


Figure D 53 : Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture continue C1).

▷ taux de dilution (D) : 0,05 h<sup>-1</sup>.

### III.1. - Etude des cinétiques et des performances en culture continue :

Nous étudions dans cette partie l'influence des conditions de culture sur les performances et surtout sur les cinétiques de croissance de production de la PA et de consommation des substrats. Quatre fermentations continues ont été réalisées dans des conditions différentes :

- ⇒ à un faible taux de croissance,
- ⇒ à un taux de croissance moyen,
- ⇒ à un fort taux de croissance,
- ⇒ à un faible taux de croissance et une forte concentration en peptone dans le milieu d'alimentation.

La culture discontinue initiale est effectuée sur le milieu "peptone". Les conditions de température, d'aération et de pH sont les mêmes que pour les cultures précédentes.

#### III.1.1. - *Faible taux de dilution*

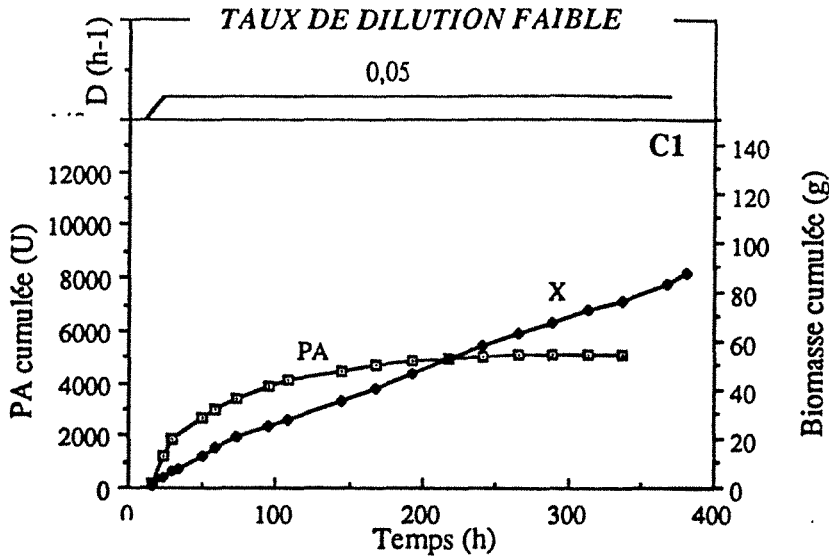
➤ Nous réalisons une première culture continue (C1) avec un faible taux de dilution de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  (le taux de croissance maximum de la souche est de  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ). La composition du milieu d'alimentation est la suivante :

- Peptone : 20 g/l
- Glucose : 9 g/l
- APA : 2 g/l

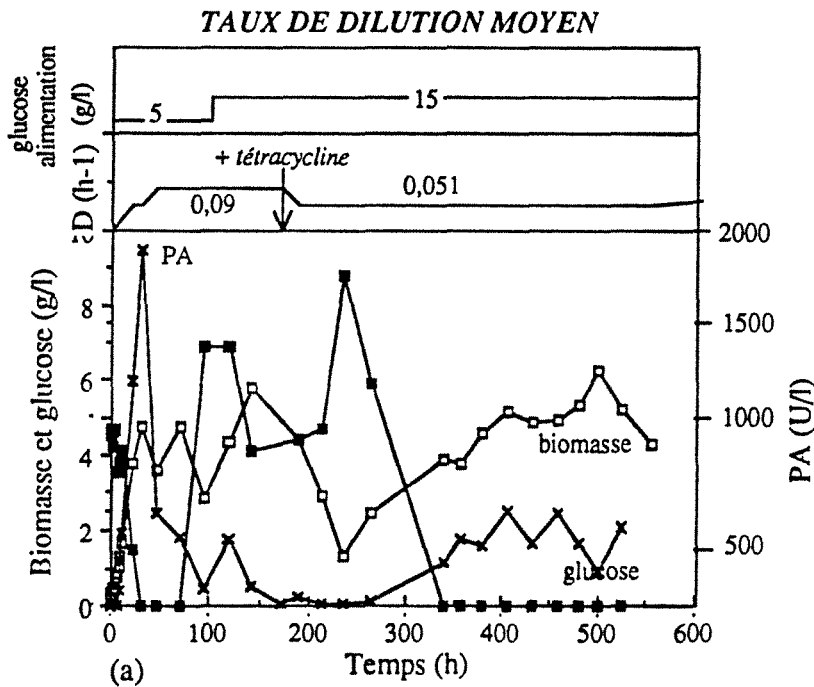
Les concentrations en peptone et en APA sont théoriques car ces deux substrats n'ont pas pu être dosés.

➡ La figure D 52 (a et b) permet de suivre l'évolution des concentrations en biomasse, PA et glucose ainsi que le pourcentage de cellules recombinées et sauvages au cours de la culture continue C1. L'état stationnaire est atteint à la 100ème heure de culture, la concentration en biomasse est de 4 g/l et la quantité de glucose résiduel est nulle. Cette quantité de biomasse correspond à une concentration cellulaire de  $7 \cdot 10^9$  cellules/ml. La production de PA chute dès que l'alimentation est mise en route, elle se stabilise à 100 U/l. Les cellules sauvages apparaissent dans le réacteur à partir de la 100ème heure, mais cette modification de la composition de la population ne modifie pas l'état stationnaire pour la biomasse et le glucose résiduel reste nul. A la 200ème heure de culture le pourcentage de cellules recombinées est négligeable.

➡ Les vitesses spécifiques de croissance et de production de la PA sont reportées figure D 53. Alors que le taux de croissance se stabilise, la vitesse spécifique de production de la PA chute de



**Figure D 54 :** Evolution des productions cumulées de biomasse et de PA au cours du temps (culture continue C1).  
 > taux de dilution (D) : 0,05 h-1.

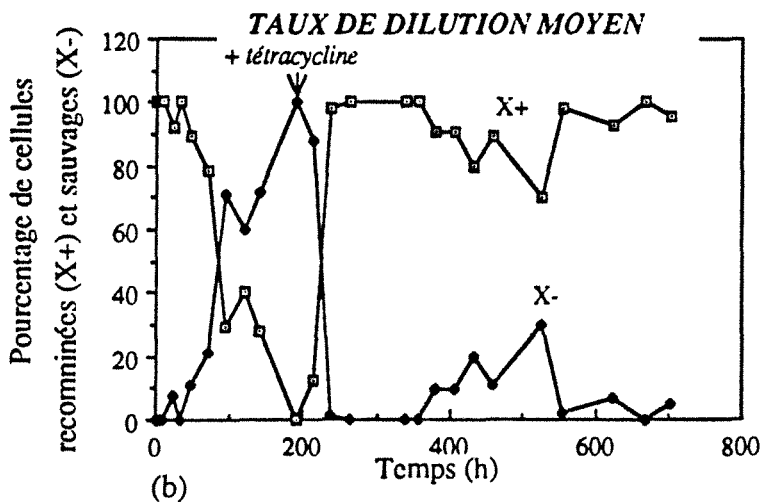


**Figure D 55 :** Culture continue C2 :

(a) Cinétiques de croissance, de production de PA, de consommation des substrats (glucose et ions ammonium).

(b) Evolution des populations de cellules sauvages (X-) et recombinées (X+) au cours du temps.

> taux de dilution (D) : 0,09/0,051 h-1 (189ème h), concentration en glucose dans l'alimentation : 5/15 g/l (95ème h), ajout de tétracycline à la 189ème h.



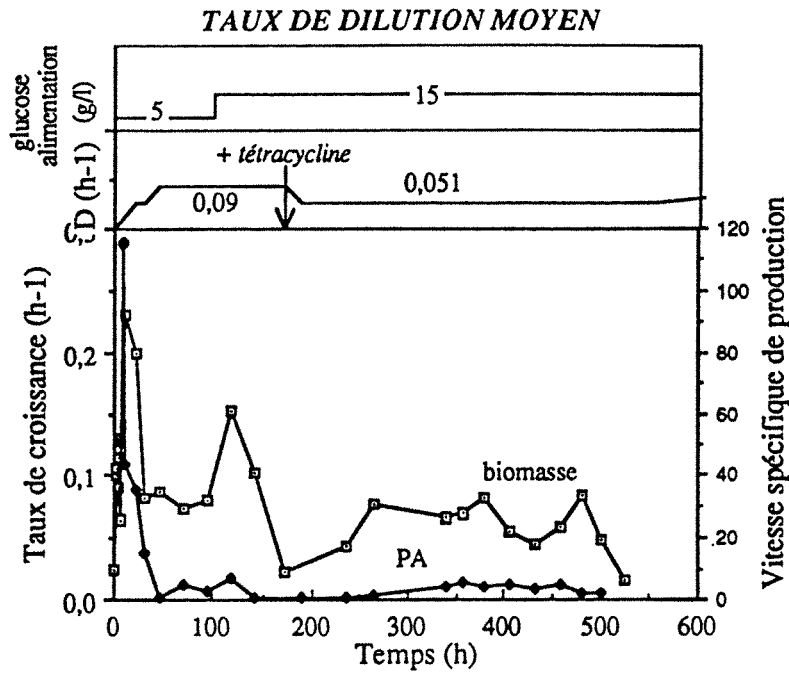
120 U/g.h à 10 U/g.h dès que le réacteur est alimenté. A la 100<sup>ème</sup> heure, lorsque les cellules sauvages apparaissent, la vitesse spécifique de production de PA diminue encore, et atteint environ 1 U/g.h.

➔ La figure D 54 représente l'évolution des quantités cumulées en biomasse et de PA au cours temps. Ce graphe confirme le résultat précédent, la biomasse est toujours produite après la 100<sup>ème</sup> heure alors que la production d'enzyme stagne.

### *III.1.2. - Taux de dilution intermédiaire*

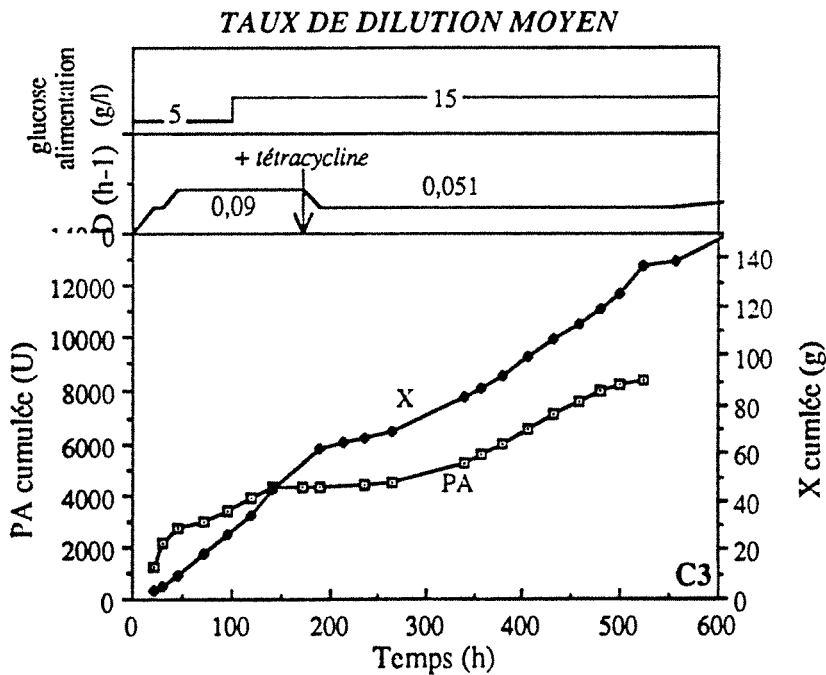
➤ La deuxième culture continue est réalisée en même temps que la fermentation C1, mais le taux de dilution est augmenté à  $0,09 \text{ h}^{-1}$ . Afin d'éviter toute accumulation de glucose dans le milieu, la concentration en glucose dans le réservoir d'alimentation est ajustée à 5 g/l. Cependant, les tests de glucose en cours de fermentation (bandelettes réactives) révèlent que le glucose est complètement épuisé. A la 95<sup>ème</sup> heure de fermentation, le réservoir est remplacé et la concentration en glucose dans l'alimentation est augmentée à 15 g/l. De la tétracycline est ajoutée au réacteur à la 189<sup>ème</sup> heure de culture et le taux de dilution est alors baissé à  $0,051 \text{ h}^{-1}$ . Les concentrations en peptone et APA sont maintenues (théoriquement) à 20 et 2 g/l respectivement.

➔ Les concentrations en biomasse, en PA, en glucose et les pourcentages de cellules recombinées et sauvages sont reportés en fonction du temps sur la figure D 55 (a et b) pour la fermentation C2. A la 95<sup>ème</sup> heure, la concentration en biomasse dans le réacteur augmente lorsque la concentration en glucose dans l'alimentation est modifiée (5 g/l à 15 g/l). Comme pour la précédente culture continue, la production enzymatique chute dès que le réacteur est alimenté, et l'augmentation de la concentration en glucose dans l'alimentation n'a pas d'influence sur la production de PA. Pendant les 95 premières heures de culture, la concentration en biomasse fluctue : l'état stationnaire n'est pas atteint. Théoriquement, il faut 5 temps de passage soit ici 55 heures pour atteindre cet état. Dès que l'alimentation est mise en route, le pourcentage de cellules recombinées diminue rapidement. L'évolution des pourcentages entre ces deux populations retarde l'établissement d'un état stationnaire. A la 189<sup>ème</sup> heure de culture, ce pourcentage de cellules recombinées n'est plus que de 2 %, la tétracycline est ajoutée dans le milieu d'alimentation (15 mg/l). Immédiatement après l'ajout de l'antibiotique, la concentration en biomasse chute : les cellules non recombinées meurent. La concentration en cellules recombinées étant alors faible, le taux de dilution est diminué à  $0,051 \text{ h}^{-1}$  pour éviter un lessivage du réacteur. Après environ 10 temps de passage (200h) nous obtenons un état stationnaire correspondant à une concentration de 5 g/l en biomasse. D'autre part, nous constatons que la concentration en PA dans le milieu de culture augmente à partir de la 260<sup>ème</sup> heure de fermentation, c'est-à-dire lorsque les cellules sauvages



**Figure D 56 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture continue C2).

▼ taux de dilution (D) : 0,09/0,051 h-1 (189ème h), concentration en glucose dans l'alimentation : 5/15 g/l (95ème h), ajout de tétracycline à la 189ème h.



**Figure D 57 :** Evolution des productions cumulées de biomasse et de PA au cours du temps (culture continue C2).

▼ taux de dilution (D) : 0,09/0,051 h-1 (189ème h), concentration en glucose dans l'alimentation : 5/15 g/l (95ème h), ajout de tétracycline à la 189ème h.

sont complètement éliminées du milieu de culture. La concentration en PA se stabilise à 500 U/l.

➔ La figure D 56 permet de suivre l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de production de la PA. Nous observons que la vitesse spécifique de production de la PA chute très rapidement dès le début de la fermentation en continue et qu'elle est nulle à la 200ème heure. Durant cette première phase de la culture, ces deux vitesses spécifiques ne varient pas de la même façon. Après l'ajout de tétracycline la vitesse spécifique de production de la PA se stabilise à 5 U/g.h, le taux de croissance et cette vitesse spécifique évoluent parallèlement.

➔ La figure D 57 représentant les quantités cumulées de biomasse et de PA au cours du temps, confirme que les productions de biomasse et d'enzyme ne sont pas associées avant l'ajout de l'antibiotique et qu'elles le sont après.

La phase transitoire (entre les deux états stationnaires) est longue, dans la mesure où il est généralement admis que 5 temps de passage (100 h) suffisent pour atteindre un état stationnaire. La tétracycline permet de recouvrir en 60 h soit environ 3 temps de passage, 100 % de cellules recombinées. L'antibiotique a un effet négatif sur la croissance, mais il permet d'éliminer très rapidement les cellules sauvages. En effet, la tétracycline perturbe instantanément la synthèse protéique des cellules non recombinées qui ne vont donc plus pouvoir croître.

### III.1.3. - Taux de dilution élevé

➤ Pour la fermentation C3, nous imposons un taux de dilution élevé de  $0,15 \text{ h}^{-1}$ , proche du taux de croissance maximum ( $0,2 \text{ h}^{-1}$ ), correspondant à un temps de passage de 6,7 h. Suite aux résultats obtenus précédemment, la concentration en glucose dans le milieu d'alimentation a été augmentée. La composition du milieu d'alimentation est la suivante (à la 200ème heure de fermentation, le réservoir d'alimentation est remplacé et les concentrations des composants du milieu sont légèrement modifiées) :

- Peptone : 19 / 22 g/l
- Glucose : 34 / 33 g/l
- APA : 1,5 / 1,9 g/l
- $\text{NH}_4^+$  : 11/16 mM

➔ La figure D 58 (a et b) représente les cinétiques de croissance, de production de PA de consommation des substrats et l'évolution des pourcentages de cellules recombinées et sauvages. Pendant les 100 premières heures de cette fermentation C3 l'état stationnaire est atteint, la concentration en biomasse est de 4 g/l. La quantité résiduelle en APA est nulle et la concentration en





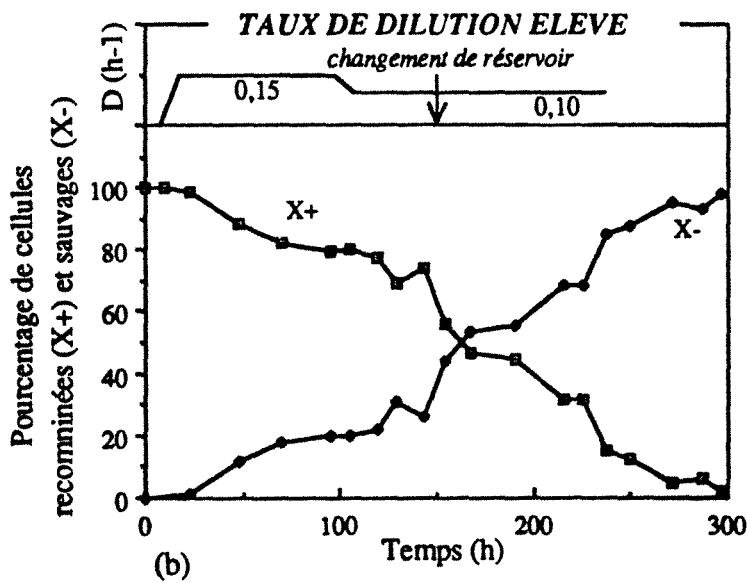
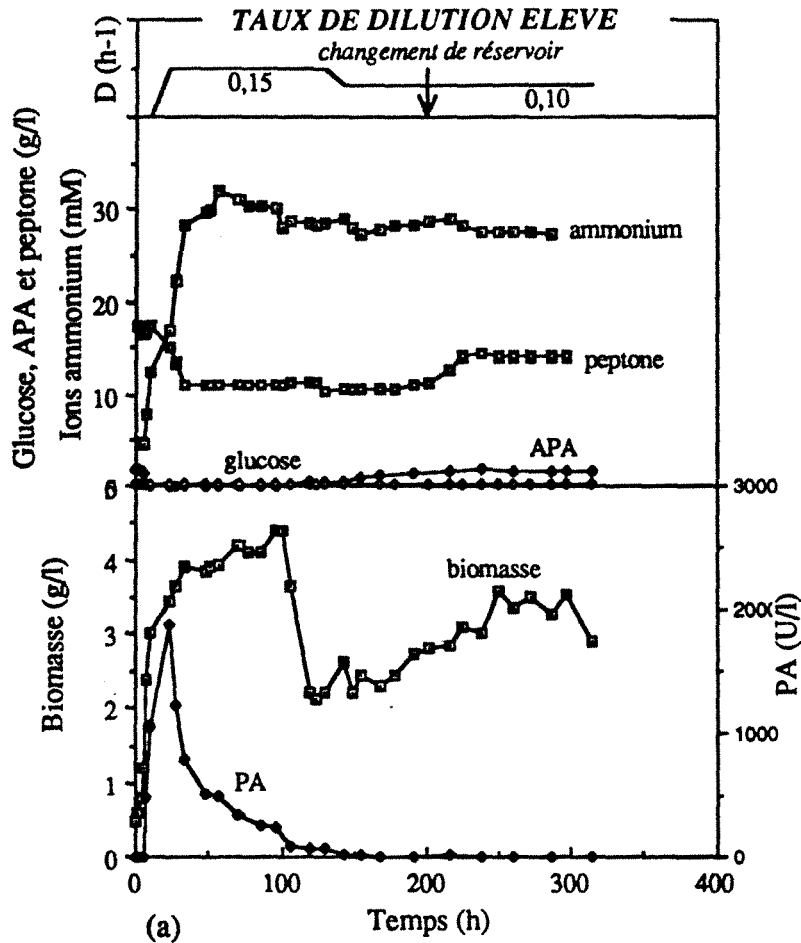
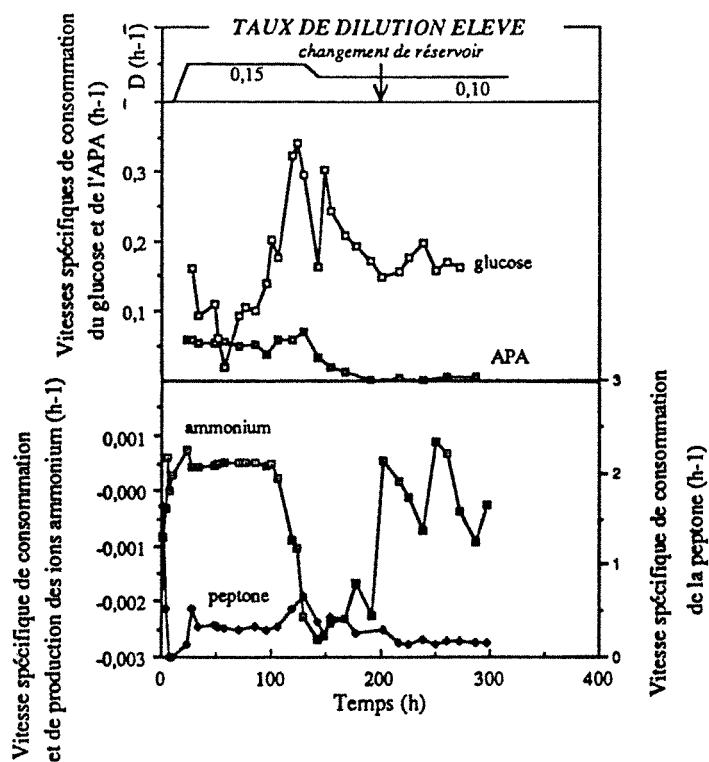


Figure D 58 : Culture continue C3 :

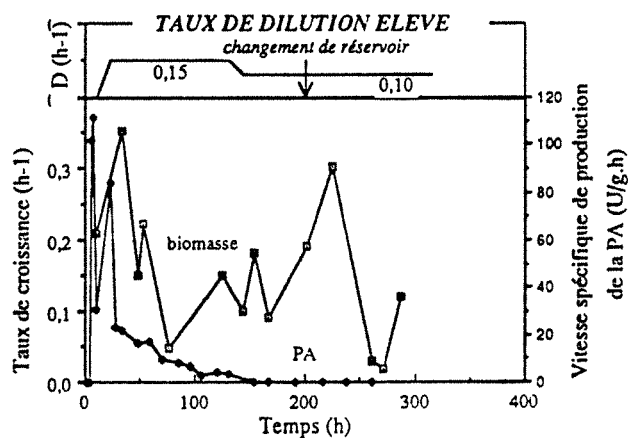
(a) Cinétiques de croissance, de production de PA, de consommation des substrats (glucose, APA, peptone et ammonium).

(b) Evolution des populations de cellules sauvages (X-) et recombinées (X+) au cours du temps.

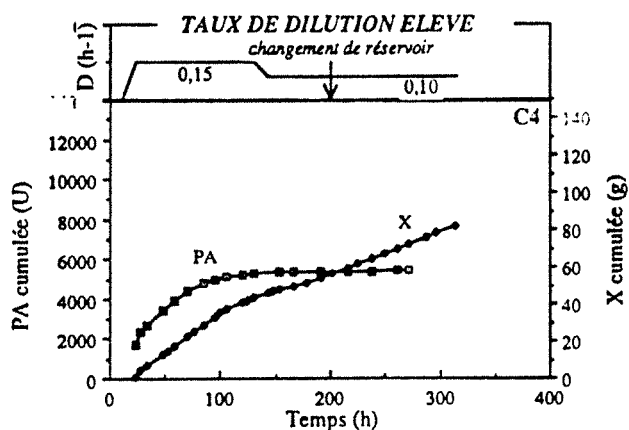
➤ taux de dilution ( $D$ ) : 0,15/0,1 h<sup>-1</sup> (100<sup>ème</sup> h), changement de réservoir d'alimentation à la 200<sup>ème</sup> h.



**Figure D 59 :** Evolution des vitesses spécifiques de consommation du glucose, de l'APA, de la peptone et des ions ammonium (néгатif : production, positif : consommation) au cours du temps (culture continue C3).  
 > taux de dilution (D) : 0,15/0,1 h<sup>-1</sup> (100ème h), changement de réservoir d'alimentation à la 200ème h.



**Figure D 60 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture continue C3).  
 > taux de dilution (D) : 0,15/0,1 h<sup>-1</sup> (100ème h), changement de réservoir d'alimentation à la 200ème h.



**Figure D 61 :** Evolution des productions cumulées de biomasse et de PA au cours du temps (culture continue C3).  
 > taux de dilution (D) : 0,15/0,1 h<sup>-1</sup> (100ème h), changement de réservoir d'alimentation à la 200ème h.

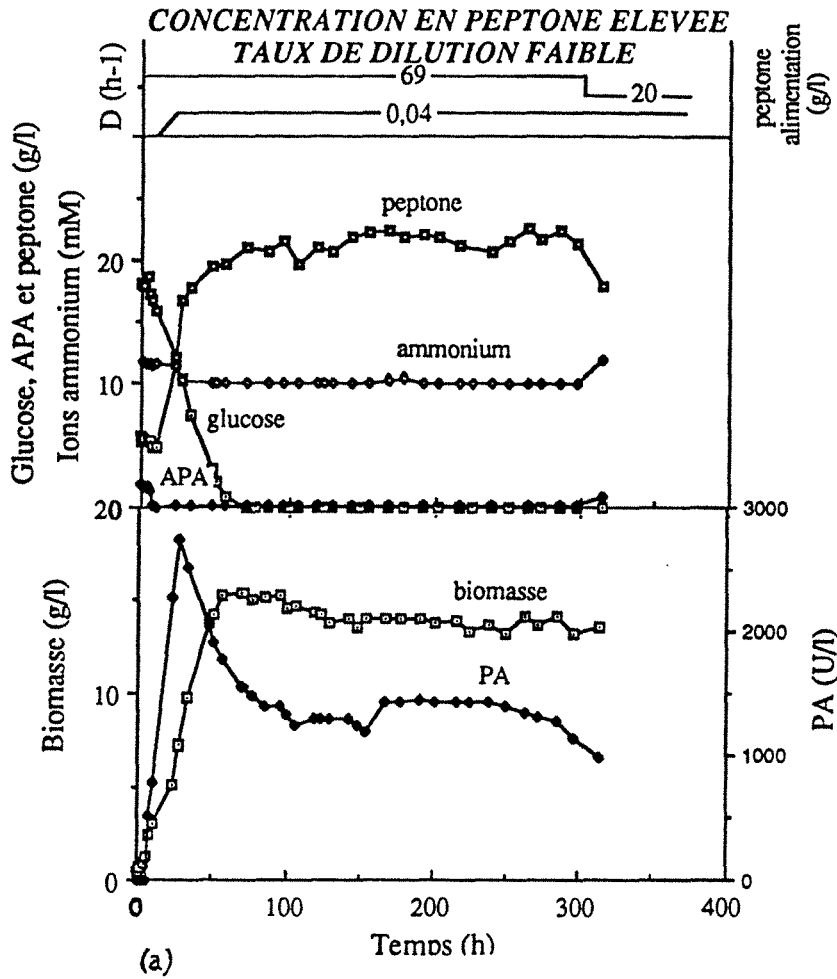
peptone dans le réacteur est inférieure à la concentration utilisée dans l'alimentation : l'APA et la peptone sont consommés. En revanche, la concentration résiduelle en glucose augmente dès que l'alimentation est mise en route. A l'état stationnaire elle est de 30 g/l, c'est à dire qu'elle est voisine de la concentration utilisée dans le milieu d'alimentation : ce substrat est très faiblement assimilé. A partir de la 100<sup>ème</sup> heure de fermentation, nous constatons un lessivage de la biomasse, le taux de dilution est alors diminué à  $0,1 \text{ h}^{-1}$  de façon à enrayer la chute de la concentration cellulaire. Au bout de 10 temps de passage l'état stationnaire est atteint, nous n'obtenons pour ce taux de dilution qu'une concentration en biomasse de 3 g/l. Suite au changement du réservoir d'alimentation, les concentrations du milieu en ions ammonium et en APA sont légèrement modifiées respectivement de 11 à 16 mM et de 1,5 à 1,9 g/l. A partir de la 100<sup>ème</sup> heure de la culture, les concentrations en ions ammonium et en APA dans le milieu d'alimentation et dans le réacteur sont identiques. L'APA et les ions ammonium ne sont pas assimilés. En revanche, les concentrations résiduelles en peptone et en glucose sont inférieures à celle du milieu d'alimentation. Les bactéries assimilent la peptone et le glucose. Les cellules sauvages apparaissent très tôt dans le fermentation mais il faut attendre la 300<sup>ème</sup> heure de culture pour que la population de cellules recombinées disparaisse complètement.

➔ La modification du comportement de la souche est illustrée sur la **figure D 59** qui représente l'évolution des vitesses spécifiques de consommation du glucose, de l'APA, de la peptone et des ions ammonium. A partir de la 100<sup>ème</sup> heure de culture, la vitesse spécifique de consommation de l'APA chute à zéro, alors que celle du glucose augmente et ensuite se stabilise. De même, les ions ammonium ne sont plus consommés mais produit alors que la peptone elle est assimilée. C'est le seul cas rencontré, où le glucose est consommé avant l'APA.

Le métabolisme décrit pour un temps de passage de 7 h ( $0,15 \text{ h}^{-1}$ ) correspond à la phase exponentielle d'une culture en discontinue. C'est-à-dire une consommation d'APA, de peptone, avec une production d'ions ammonium et, un début d'assimilation du glucose dans la mesure où la concentration en inducteur est faible. La croissance n'est pas limitée par la source de carbone ni par la source d'azote. A la 100<sup>ème</sup> heure de culture, le métabolisme de la souche G271 change : l'APA est assimilé après le glucose. La concentration en APA dans le réacteur reste inférieure à la concentration inhibitrice de 2 g/l. Nous constatons sans parvenir à l'expliquer, qu'à la 100<sup>ème</sup> heure de culture, la souche change de métabolisme.

➔ La **figure D 60** montre l'évolution des vitesses spécifiques de production de PA et de croissance. Là encore, la vitesse spécifique de production de l'enzyme chute très rapidement dès la mise en route de l'alimentation. Le taux de croissance varie et la production de PA reste nulle.

➔ La **figure D 61** permet de suivre la quantité cumulée en biomasse et en PA. L'allure de ces

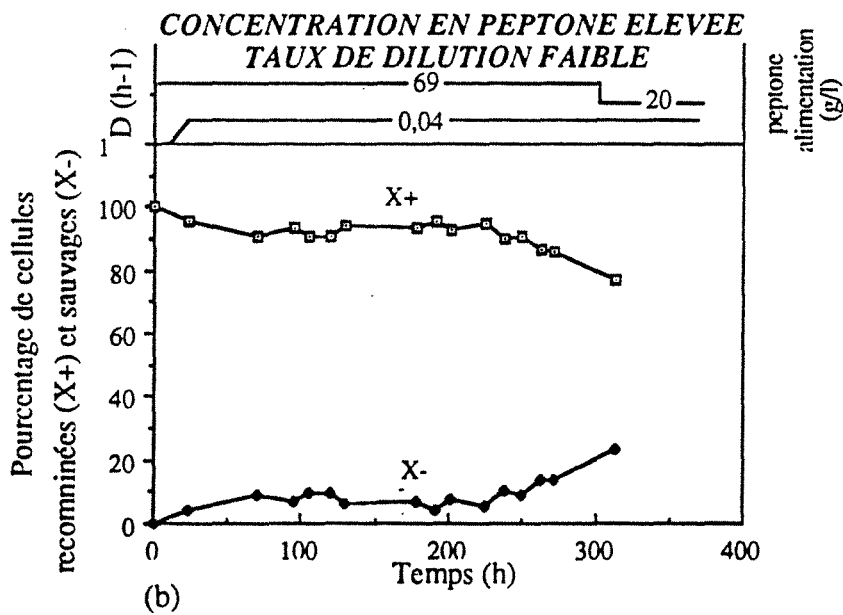


**Figure D62 :** Culture continue C4 :

(a) Cinétiques de croissance, de production de PA, de consommation des substrats (glucose, APA, peptone et ammonium).

(b) Evolution des populations de cellules sauvages (X-) et recombinées (X+) au cours du temps.

▷ taux de dilution (D) : 0,04 h-1, concentration en peptone dans l'alimentation : 69/20 g/l (300ème h).



courbes confirme que la production d'enzyme et la croissance sont dissociées.

#### *III.1.4. - Faible taux de dilution et forte concentration en peptone dans l'alimentation*

➤ Pour la fermentation C4, le taux de dilution imposé est de  $0,04 \text{ h}^{-1}$ , il est proche de celui de la fermentation C1, mais le milieu d'alimentation est très différent. Sa composition est la suivante :

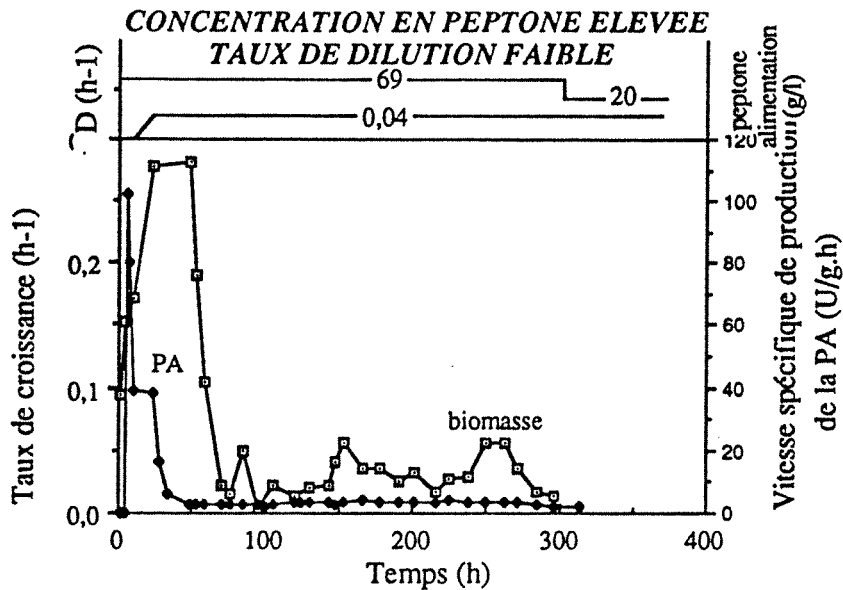
- Peptone : 69 g/l
- Glucose : 30 g/l
- APA : 2,95 g/l

A la 300ème heure de fermentation, le réservoir d'alimentation est remplacé et la composition du milieu est modifiée :

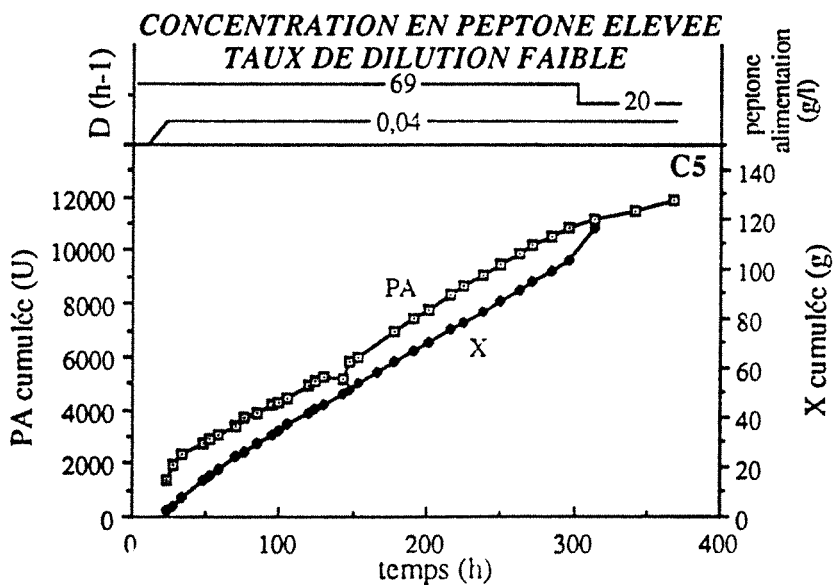
- Peptone : 20 g/l
- Glucose : 35 g/l
- APA : 2 g/l

Durant cette étude nous comparerons les cultures C1 et C4 car leur taux de dilution sont voisins.

➡ La figure D 62 (a et b) permet de comparer l'évolution des concentrations en biomasse en PA, en substrats ainsi que les pourcentages des cellules recombinées et sauvages. L'état stationnaire est atteint après 100 heures de culture (comme pour la culture C1), et la quantité de biomasse est de 14 g/l ce qui correspond à une concentration cellulaire de  $2 \cdot 10^{10}$  cellules/ml (résultats fournis par les comptages réalisés sur des boîtes de Pétri). Les concentrations en glucose et en peptone du milieu d'alimentation de la fermentation C4 sont supérieures à celles de la fermentation C1. Les concentrations en biomasse à l'état stationnaire sont respectivement de 15 et 4 g/l, la production de biomasse, pour la fermentation C4 est donc 4 fois plus élevée. Ce rapport n'est plus que de 3 si nous comparons les concentrations cellulaires obtenues par dénombrement ( $2 \cdot 10^{10}$  cellules/ml et  $7 \cdot 10^9$  cellules/ml respectivement pour C1 et C4). La densité optique mesure la turbidité due à toutes les cellules, vivantes, mortes ainsi que les débris cellulaires. Pour un temps de passage important de 28 h ( $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ , fermentation C4) les cellules mortes présentes dans le réacteur entraînent une surestimation de la biomasse vivante évaluée par étalement sur boîtes de Pétri. A l'état stationnaire, il n'y a plus de glucose ni d'APA dans le milieu de culture et les concentrations résiduelles en peptone et en ions ammonium se stabilisent respectivement à 20 g/l et 10 mM. La concentration en PA chute dès que le réacteur est alimenté mais elle se stabilise à 1500 U/l. A la 300ème heure, la concentration en peptone dans l'alimentation est fortement diminuée,



**Figure D 63 :** Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production de la PA au cours du temps (culture continue C4)  
 ▽ taux de dilution (D) : 0,04 h-1, concentration en peptone dans l'alimentation : 69/20 g/l (300ème h).



**Figure D 64 :** Evolution des productions cumulées de biomasse et de PA au cours du temps (culture continue C4).  
 ▽ taux de dilution (D) : 0,04 h-1, concentration en peptone dans l'alimentation : 69/20 g/l (300ème h).

c'est à ce moment que la concentration en PA commence à chuter. Au bout de 300 heures de culture, la population de cellules sauvages représente seulement 20 %. La population de cellules recombinées est stable.

➡ Les vitesses spécifiques de production de la PA et de croissance sont reportées sur la **figure D 63**. La vitesse spécifique de production de la PA et le taux de croissance se stabilisent à partir de la 100<sup>ème</sup> heure de culture. Nous constatons que ces vitesses évoluent de la même façon durant la fermentation.

➡ Ce résultat est confirmé par la **figure D 64** représentant les quantités de biomasse et de PA formées au cours du temps. Ces deux courbes restent parallèles tant que la concentration en peptone dans le milieu d'alimentation n'est pas diminuée : la production de PA et la croissance sont associées.

Nous allons maintenant étudier plus en détail la stabilité du contenu plasmidique et notamment analyser l'influence du taux de croissance et de la composition du milieu de culture sur la stabilité du plasmide pXL20.

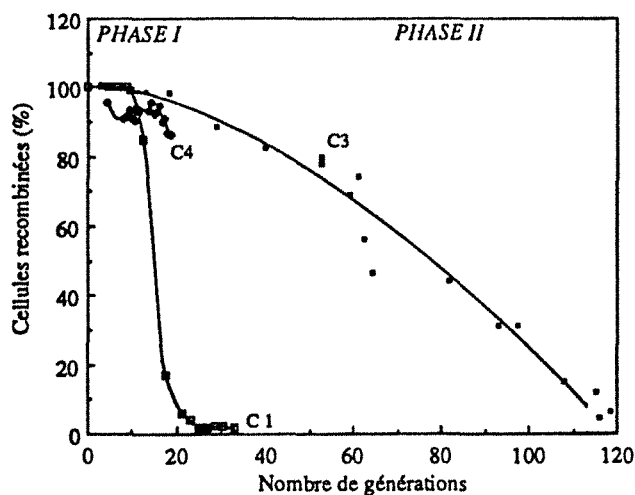
### III.2. - Etude de la stabilité plasmidique :

#### *III.2.1 - Influence du taux de croissance et de la composition du milieu d'alimentation sur la stabilité du contenu plasmidique*

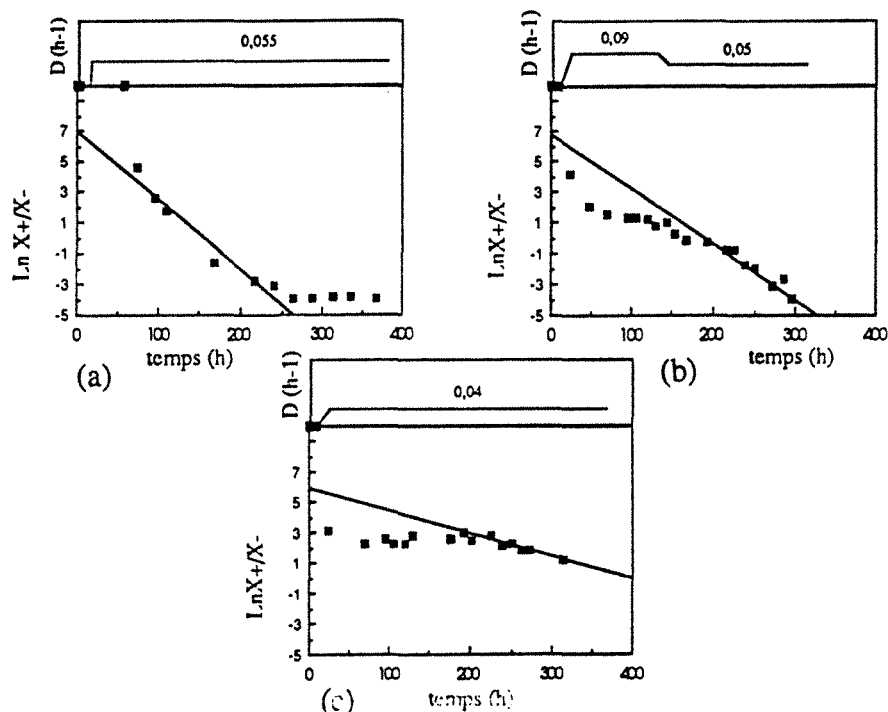
La perte du contenu plasmidique est due à une mauvaise répartition des plasmides entre la cellule fille et la cellule mère au moment de la division. Nous prenons ici comme échelle des temps le nombre de générations que nous définissons comme :

$$\text{temps de génération} = \ln 2 / (\text{taux de croissance})$$

D'autre part, nous utilisons la méthode graphique de SAN et WEBER (1989), décrite dans la partie B, pour calculer  $p$  (la probabilité de perte du plasmide) et  $\delta\mu$  (la différence entre les taux de croissance des cellules recombinées et sauvages). Ces 2 paramètres clés définissent la dynamique du réacteur.



**Figure D 65 :** Influence du taux de dilution et de la composition du milieu d'alimentation sur la cinétique de disparition des cellules recombinées (*E. coli* G271) : comparaison entre les cultures continues C1, C3 et C4.  
 > C1 : taux de dilution faible (0,05 h<sup>-1</sup>), C3 : taux de dilution élevé (0,15 h<sup>-1</sup>), C4 : taux de dilution faible (0,04 h<sup>-1</sup>) et concentration en peptone dans le milieu d'alimentation élevée (69 g/l).



**Figure D 66 :** Calcul d'après la méthode graphique de SAN et WEBER (1989) de la valeur des paramètres  $p$  (probabilité de perte du plasmide) et  $\delta m$  (différence entre les taux de croissance des cellules recombinées  $X^+$  et sauvages  $X^-$ ) pour les fermentations continues C1 (a), C3 (b) et C4 (c).

> C1 : taux de dilution faible (0,05 h<sup>-1</sup>), C3 : taux de dilution élevé (0,15 h<sup>-1</sup>), C4 : taux de dilution faible (0,04 h<sup>-1</sup>) et concentration en peptone dans le milieu d'alimentation élevée (69 g/l).



↳ La figure D 65 permet de suivre l'évolution du pourcentage des cellules recombinées en fonction du nombre de générations pour les cultures C1, C3 et C4. Les conditions de ces fermentations sont reportées sur le tableau D 7. Nous constatons que la perte du plasmide est plus rapide pour les cultures C1 et C4 que pour la fermentation C3. Lors des deux premières fermentations C1 et C4, les cellules sauvages apparaissent après 15 générations. Nous ne comptons pas la quinzaine de générations de la phase de propagation qui est la même pour toutes les cultures. Pour le continu C3 les cellules sauvages sont détectées à partir de la 22ème génération. D'autre part, nous constatons qu'il y a aussi une différence entre les fermentations C1, C3 et C4 dans la deuxième partie de la cinétique de disparition des cellules recombinées (Fig. D 65, phase II). La phase I correspond aux nombres de générations qu'il faut pour détecter la présence des cellules sauvages. La deuxième phase rend compte de la vitesse à laquelle les cellules non recombinées prennent le dessus par rapport aux cellules recombinées. A priori nous avons donc une stabilité du système qui est meilleure à un taux de dilution élevé (phase I et phase II plus longues).

	Taux de dilution D (h <sup>-1</sup> )	Alimentation (g/l)			Modification alimentation (heure)
		glucose	APA	peptone	
C1	0,05	9	2 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	
C3	0,15 / 0,1	34 / 33	1,5 / 1,9	19 / 22	200
C4	0,04	30 / 35	2,95 / 2	69 / 20	300

**Tableau D 7** : Taux de dilution et composition de l'alimentation des différents continus (a : valeurs théoriques)

Les valeurs des paramètres  $p$  et  $\delta\mu$  sont calculées pour les cultures C1, C3 et C4. Pour la fermentation C3, nous faisons ce calcul après la 100ème heure, c'est-à-dire après avoir diminué le taux de dilution. Les valeurs des paramètres sont obtenues à partir des courbes  $\ln(X^+/X^-) = f(t)$  qui sont représentées sur la figure D 66 (a, b et c). Les résultats sont récapitulés dans le tableau D 8.

	C1	C3	C4
$\delta\mu$ (h <sup>-1</sup> )	-45.10 <sup>-3</sup>	-36.10 <sup>-3</sup>	-15.10 <sup>-3</sup>
$p\mu+$ (h <sup>-1</sup> )	0,41.10 <sup>-4</sup>	0,4.10 <sup>-4</sup>	0,37.10 <sup>-4</sup>

**Tableau D 8** : Valeurs obtenues pour  $p\mu+$  et  $\delta\mu$  des différents continus.

Nous vérifions que nous avons bien  $p\mu^+/\delta\mu \ll 1$  (hypothèse de calcul).

➔ Dans un premier temps nous ne tenons pas compte du continu C4 car les conditions de culture sont différentes des autres fermentations. Nous constatons que l'augmentation du taux de dilution entre C1 et C3, se traduit par une diminution de  $\delta\mu$  ( $\mu^+ - \mu^-$ ) : l'avantage de croissance des cellules sauvages par rapport aux cellules recombinées est plus faible (Tab. D 8). C'est-à-dire que le système est plus stable lorsque le taux de dilution est plus élevé.

➔ Pour le continu C4, la différence entre les taux de croissance des cellules recombinées et sauvages est la plus faible (Tab. D 8), or le taux de dilution de cette fermentation est le moins élevé ( $0,04 \text{ h}^{-1}$ ). Ceci infirme l'hypothèse précédemment émise à partir des deux fermentations C1 et C3 sur la relation entre le taux de croissance et la stabilité du système.

Le paramètre  $\delta\mu$ , qui rend compte de l'instabilité du système hôte/vecteur, diminue lorsque le taux de dilution augmente, cependant, une modification de la composition de l'alimentation peut inverser cette relation. La probabilité de perte du plasmide n'a pas été modifiée par le changement des taux de dilution ou la modification de la composition de l'alimentation.

### III.2.2 - Discussion

Généralement, une augmentation du taux de croissance se traduit par une amélioration de la stabilité (GODWIN et SLATER, 1979, PARKER et DIBIASO, 1987, KLEINMAN et coll., 1986 et SEO et BAILEY, 1986). REINIKAINEN et coll. (1989), CAUNT et coll. (1988) ainsi que WOUTERS et coll. (1980) pensent que la stabilité du système augmente lorsque le contenu plasmidique est élevé. En revanche, AIBA et coll. (1982) ainsi que IMANAKA et AIBA (1981) montrent qu'un nombre de copies de plasmides par cellule trop élevé augmente l'instabilité. AIBA et KOIZUMI (1984) montrent qu'à  $44^\circ\text{C}$ , le contenu plasmidique de *Bacillus stearothermophilus* reste constant alors que le taux de croissance est modifié. Il n'existe pas d'explications formulées clairement sur la relation existant entre le taux de croissance et l'instabilité. Il est généralement admis qu'une diminution du contenu plasmidique consécutive à une augmentation du taux de croissance, entraîne une augmentation de la probabilité de perte du plasmide et une diminution de l'avantage de croissance des cellules sauvages par rapport aux cellules recombinées. En effet, lorsque le contenu plasmidique est faible, le fardeau énergétique que représente le vecteur pour son hôte est moins important. L'importance relative de ces deux effets antagonistes en fonction des systèmes hôte/vecteur utilisés est peut-être responsable de la grande variété des résultats qui sont décrits dans la littérature.

Pour la souche G271, une augmentation du taux de dilution permet d'améliorer la stabilité du système. Nous montrons que cette élévation du taux de croissance permet de diminuer l'avantage de croissance de la souche G133 par rapport à la souche G271. SAN et WEBER (1989) montrent pour le même type de système (*E. coli* contenant un plasmide pBR 322) qu'une augmentation du taux de dilution de  $0,31 \text{ h}^{-1}$  à  $0,46 \text{ h}^{-1}$  se traduit essentiellement par une faible augmentation de  $\delta\mu$  de 0,023 à 0,025. Nous soulignons ici encore la difficulté de généralisation des interactions entre le taux de dilution et la stabilité dans la mesure où il faut aussi prendre en compte les conditions de culture. Pour le continu C4, l'apparition des cellules sauvages est retardée par rapport à la fermentation C1 pour laquelle le taux de dilution est pourtant plus élevé. JONES et MELLING (1984) ont mis en évidence qu'une limitation en phosphate entraînait une augmentation de l'instabilité du système hôte/vecteur cultivé. Pour la culture C3, le nombre de copies de plasmides par cellule est maintenu constant par un ajout d'antibiotique. La résistance à la tétracycline dépend du nombre de copies de plasmides par cellules (SAN et WEBER, 1989). Nous montrons ici que le comportement du couple hôte/vecteur peut être considérablement modifié par les conditions de cultures.

Actuellement, la stabilité du contenu plasmidique n'est pas un phénomène parfaitement compris. Des études sont entreprises de façon à faire la distinction entre les interactions hôte/vecteur et l'influence des paramètres opératoires sur le comportement des microorganismes recombinés et plus précisément la stabilité du contenu plasmidique. Ce problème représente le principal handicap qui limite le développement industriel de cette technologie.

### III.3. - Conclusion :

Nous allons séparer dans cette conclusion d'une part les contributions apportées à une meilleure compréhension du comportement de la souche *E. coli* G271 et les observations concernant les performances, et d'autre part les résultats obtenus sur la stabilité du contenu plasmidique.

⇒ Le comportement de la souche *E. coli* G 271 en culture continue n'est généralement pas différent de celui que nous avons observé en culture discontinue et semi-continue. Pour des faibles taux de dilution (C1 et C4), tous les substrats sont consommés. Lorsque le taux de dilution est plus élevé (C3) le glucose est faiblement assimilé, comme en début de culture discontinue. En culture continue, la souche G271 a un comportement comparable à celui qu'elle a en culture discontinue pour un temps de fermentation correspondant au temps de passage dans le réacteur. Cependant, le comportement de la souche G271 pour un taux de dilution de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  ne correspond plus à celui d'une culture en réacteur discontinu à la 10ème heure : l'APA contrairement au glucose n'est pas consommé. La diminution du taux de dilution permet d'obtenir une plus forte concentration en

biomasse qui correspond à une accumulation de cellules mortes. Il faudrait balayer une gamme plus large de taux de dilution afin de mettre en évidence le taux de dilution maximum toléré par la souche.

⇒ Pour les fermentations C1 et C3, la concentration en PA à l'état stationnaire est de 100 U/l. Les cellules ne sont pas performantes, la production de PA est équivalente à celle de la souche sauvage. Pour les fermentations C4 et C2 après l'ajout de tétracycline, la production spécifique est plus élevée. Une forte concentration en peptone dans le milieu d'alimentation et un ajout de tétracycline ont donc un effet positif sur la production de PA, permettant ainsi d'atteindre un état stationnaire en PA de 1500 U/l. Une augmentation de la concentration en glucose dans le milieu d'alimentation n'a pas d'influence sur la production de PA.

⇒ La stabilité du contenu plasmidique dépend du taux de croissance mais aussi de la composition du milieu d'alimentation. Aussi, la production de PA et la croissance ne sont pas dans tous les cas associées. La production spécifique diminue fortement avant même de détecter des cellules sauvages, le nombre de copies de plasmides par cellule diminuerait dès le début d'une fermentation continue. La présence de peptone permettrait d'améliorer la production de PA grâce à un apport supplémentaire de nutriments qui favoriseraient sa synthèse et/ou le maintien du nombre de copies de plasmides par cellule. La tétracycline agit sur la stabilité du contenu plasmidique. Il est intéressant de mettre en évidence ce rôle de la peptone, car dans l'optique d'un développement industriel, un ajout d'antibiotique est non seulement coûteux mais en plus gênant pour l'étape de purification.

#### **IV. - Comparaison des cinétiques et des performances de la souche *E. coli* G271 dans les trois modes de culture**

##### **IV.1. - Comparaison des cinétiques de la souche *E. coli* G271 dans les trois modes de culture**

L'étude des cinétiques de la souche G271 sur milieu complexe dans différentes conditions de cultures, nous a permis d'acquérir des connaissances et ainsi de mieux comprendre son comportement ainsi que les interactions entre les substrats présents dans le milieu.

##### ***IV.1.1. - Croissance et production de la pénicilline acylase***

Quelle que soit le mode de culture, la croissance de la souche G271 est contrôlée de la même façon. La croissance est biphasique : la première phase correspond à une croissance rapide

(pendant les 12 premières heures), pendant la 2ème phase la croissance est plus faible. La cellule a besoin pour croître d'une source carbonée et d'une source azotée.

Le système hôte vecteur que nous utilisons est stable mais cependant, en culture continue des cellules sauvages apparaissent après 50 générations. L'augmentation du taux de dilution stabilise le contenu plasmidique. Cette affirmation doit toutefois être nuancée dans la mesure où une concentration élevée en peptone dans le milieu d'alimentation peut inverser ce résultat.

La production de PA est associée à la croissance lorsque le contenu plasmidique est maintenu constant en utilisant de la tétracycline ou de la peptone.

#### *IV.1.2. - Consommation de la peptone*

La peptone est décomposée en 3 fractions : les acides aminés (20 %), les peptides (20 %) et l'azote non assimilable (60 %). La consommation de la peptone entraîne dans un premier temps une production d'ions ammonium, correspondant à l'assimilation des acides aminés de la peptone comme source de carbone et d'azote. Ensuite, la peptone est consommée comme source d'azote exclusivement sauf s'il n'y a pas une autre source de carbone disponible dans le milieu (glucose ou acide phénylacétique).

#### *IV.1.3. - Consommation du glucose et de l'APA*

La consommation de l'APA précède toujours celle du glucose. La consommation du glucose est inhibée par des concentrations en APA supérieures à 1 g/l. La source de carbone est donc représentée par les acides aminés, l'APA, le glucose et éventuellement les peptides. En culture semi-continue, le glucose, l'APA et les ions ammonium sont consommés alors que la croissance est très faible. Dans ces conditions la bactérie assimile des nutriments pour satisfaire les besoins énergétiques nécessaires à sa survie ; cette consommation est non associée à la croissance.

#### *IV.1.4. - Consommation des ions ammonium*

Les ions ammonium sont consommés comme source d'azote, seuls ou/et en même temps que la fraction peptidique de la peptone. Si la peptone est le seul substrat dans le milieu de culture, elle est consommée pendant toute la fermentation comme source de carbone et d'azote ; dans ces conditions, les ions ammonium ne sont pas assimilés.

	Discontinus	standard	Discont.+EL	FB n°1	FB n°2	FB n°3	FB n°4	FB n°5	FB n°6
Coût du batch (F/l)	2,9	2,2	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
Coût du batch (F)	2,9	2,2	3,4	34	34	34	34	34	34
Glucose ajouté (g)	0	0	0	185	110	105	750	500	0
Gluc. ajouté (F)	0,00	0,00	0,00	1,02	0,61	0,58	4,13	2,75	0,00
APA ajouté 12,2F/kg (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	10,0	100,0	100,0
APA ajouté	0	0	0	0	0,122	0	0,122	1,22	1,22
(NH4)2SO4 ajouté (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0	8,7	11,1	35,2	52,9	0,0
(NH4)2SO4 ajouté	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,04	0,00
peptone ajoutée (g/l)	0	0	0	0	0	0	0	100	0
peptone ajoutée 115F/kg (F)	0	0	0	0	0	0	0	14	0
Y.E. ajouté (g/l)	0	0	0	0	0	0	50	0	0
Y.E. ajouté (F) (34F/Kg)	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0
Coût de l'alimentation (F)	0,00	0,00	0,00	1,02	0,74	0,59	5,98	18,01	1,22
Coût de la fermentation (F)	2,9	2,2	3,4	35,0	34,7	34,6	40,0	52,0	35,2
durée de la fermentation (h)	24	24	24	33	33	32	40	39	24
volume final (l)	1,0	1,0	1,0	10,6	10,5	10,3	11,9	11,2	11,0
enzyme fin (U/l)	2 653	2 743	3 800	4 072	1 695	1 547	2 028	1 960	2 800
biomasse fin (g/l)	4,5	3,5	12,0	21,8	26,8	20,8	30,5	15,0	17,6
enzyme (U)	2 653	2 743	3 800	43 163	17 798	15 934	24 133	21 952	30 800
prod. vol. finale en PA(U/lh)	111	114	158	123	51	48	51	50	117
prod. spécifique (U/g de X)	590	784	317	187	63	74	66	131	159
coût en mat.première(cts/U)	0,11	0,08	0,09	0,08	0,19	0,22	0,17	0,24	0,11

Tab D 9

	C1	C3	C3 +TET	C4	C5
Taux de dilution (h-1)	0,055	0,09	0,09/0,051	0,15/0,1	0,04
Coût du batch (F)	3	3	3	2	2
Volume ajouté (l)	18	14	32	26	8
Coût de l'alimentation (F)	51	40	93	114	69
durée du continu (h)	337	189	524	314	314
Coût de la ferm (F)	54	43	96	116	71
PA produite (U)	8749	4391	8442	5418	11862
X produite (g)	80	66	137	82	116
prod. vol. finale en PA(U/lh)	1,37	1,55	0,49	0,65	4,34
prod spécifique (U/g)	109	67	62	66	102
coût en mat.première(cts/U)	0,62	0,98	1,14	2,14	0,60

Tab D 10

**Tableaux D 9 et 10 :** Calculs des performances obtenues pour les fermentations discontinues, semi-continues (Tab. D 10) et continues (Tab. D11) de la souche *E. coli* G271.

➤ Fermentations discontinues :

➤ 2 cultures discontinues sur milieu standard, et 1 culture discontinue avec un ajout d'extrait de levure.

➤ Fermentations semi-continues :

➤ FB n°1 ajout ponctuel de glucose, FB n°2 ajout ponctuel de glucose et de sulfate d'ammonium, FB n°3 ajout ponctuel de glucose et de chlorure d'ammonium, FB n°4 alimentation ne contenant que du glucose, FB n°5 alimentation mixte glucose et APA et FB n°6 alimentation ne contenant que de l'APA.

➤ Fermentations continues :

➤ C1 : taux de dilution faible (0,05 h-1), C2 : taux de dilution moyen (0,09 h-1), C3 : taux de dilution élevé (0,15 h-1), C4 : taux de dilution faible (0,04 h-1) et concentration en peptone dans le milieu d'alimentation élevée (69 g/l).

## V.2. - Comparaison des performances de la souche *E. coli* G271 dans les trois modes de culture

Les cultures discontinues, semi-continues et continues ont permis d'obtenir diverses performances que nous avons comparées dans cette partie. Nous voulons ainsi mettre en évidence quel est le mode de culture le plus performant.

- ⇒ Dans un premier temps, nous comparerons les 3 modes de culture.
- ⇒ Dans un deuxième temps, nous détaillerons l'étude des performances obtenues en cultures discontinues et semi-continues.

Afin de comparer les différents modes de culture trois critères sont utilisés :

- i - la productivité volumique en enzyme : quantité totale de PA obtenue / (volume total x temps)
- ii - la production spécifique : quantité totale de PA obtenue / quantité totale de biomasse obtenue
- iii - le coût en matière premières pour la production d'une unité d'enzyme : coût des matières premières en franc / quantité totale de PA obtenue

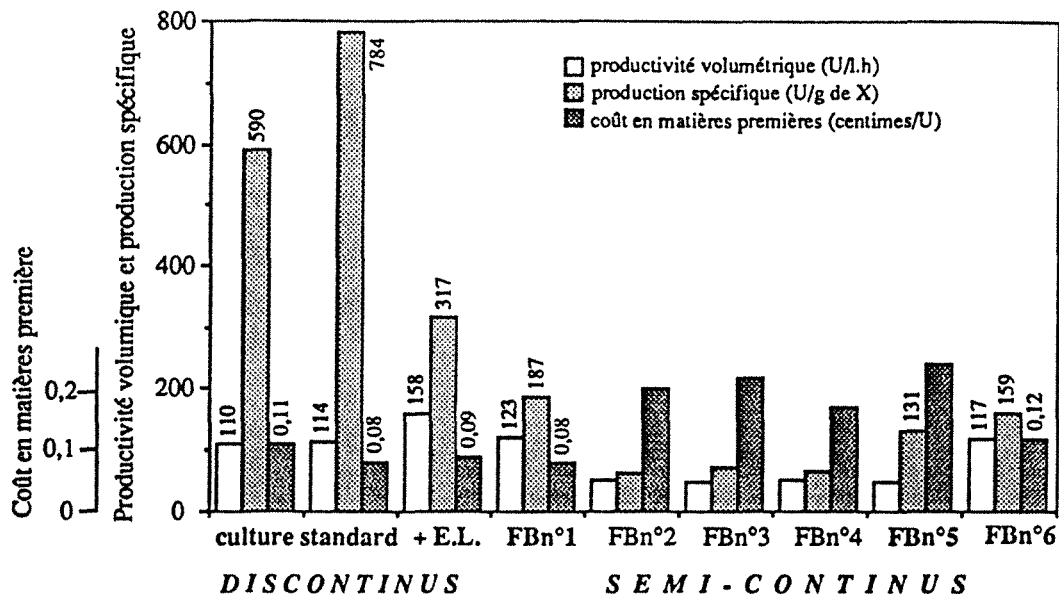
Une forte productivité volumique est toujours recherchée de manière à obtenir la plus grande quantité d'enzyme possible en un minimum de temps. La PA étant périsplasmique, nous cherchons à obtenir une production spécifique élevée qui permette de diminuer les frais liés à la destruction des cellules et donc plus globalement, les frais de purification. Le calcul complet du coût de production de l'enzyme est complexe. Nous utilisons le coût en matières premières qui permet d'avoir un ordre de grandeur de celui-ci (BEISMAN, 1988).

➡ Pour chaque culture, nous reportons **tableaux D 9 et D 10** le détail des calculs de ces trois critères.

Les prix de chaque des constituants du milieu sont :

Peptone :	140	F/kg
Extrait de levure :	34	F/kg
NaCl :	1	F/kg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	0,80	F/kg
APA :	12,20	F/kg
Glucose :	5,50	F/kg
Tétracycline :	632	F/kg

N.B. : Les chiffres indiqués sont des "prix industriels".



**Figure D 67 :** Comparaison des performances obtenues entre les fermentations discontinues et semi-continues de la souche *E. coli* G271.

➔ **Fermentations discontinues :**

➤ 2 cultures discontinues sur milieu standard, et 1 culture discontinue avec un ajout d'extrait de levure.

➔ **Fermentations semi-continues :**

➤ FB n°1 ajout ponctuel de glucose, FB n°2 ajout ponctuel de glucose et de sulfate d'ammonium, FB n°3 ajout ponctuel de glucose et de chlorure d'ammonium, FB n°4 alimentation ne contenant que du glucose, FB n°5 alimentation mixte glucose et APA et FB n°6 alimentation ne contenant que de l'APA.



⇒ Comparaison des trois modes de culture (Tab. D 9 et 10) :

Les productivités volumiques en enzyme pour les fermentations continues sont très faibles, même pour la culture C2 qui est pourtant la plus performante (Tab. D 10). Pour les fermentations C1 et C2, la production spécifique globale reste faible par rapport aux fermentations discontinues, mais elle est comparable à celle obtenue en culture semi-continue (Tab. D 9 et 10). L'ajout de peptone aux milieux d'alimentation pour les cultures continues se traduit par des coûts de production en enzyme très élevés, supérieurs à ceux des fermentations semi-continues (Tab. D 9 et 10). Il apparaît donc que les fermentations continues sont beaucoup moins performantes que celles réalisées en réacteurs discontinu et semi-continu. Elles représentent surtout un excellent moyen d'étude de la stabilité du contenu plasmidique.

⇒ Comparaison des cultures discontinues et semi-continues (Tab. D 9) :

➔ En réacteur discontinu, la production spécifique en PA est en moyenne de 120 U/l.h, et les productions spécifiques sont supérieures à 300 U/g et, elle est moins élevée en présence d'extrait de levure. Les coûts en matières premières sont de l'ordre de 0,09 centime par unité d'enzyme.

➔ En réacteur semi-continu, les résultats sont beaucoup moins homogènes. Les productions volumiques en PA varient entre 120 U/l.h (pour les fermentations n° 1, ajout de glucose et n° 6, alimentation en APA) à 50 U/l.h. La production spécifique maximum est de 187 U/g pour la fermentation n° 1 (ajout de glucose) et pour les cultures n° 5 (alimentation en glucose et APA) et n° 6 (alimentation en APA), les performances atteintes sont respectivement de 130 et 159 U/g. Pour les autres cultures semi-continues (n° 2, ajout de glucose et de sulfate d'ammonium, n° 3, ajout de glucose et de chlorure d'ammonium et n° 4, alimentation en glucose), la production spécifique oscille entre 60 et 70 U/g. Le coût en matières premières des cultures n° 2 (ajout de glucose et de sulfate d'ammonium), 3 (ajout de glucose et de chlorure d'ammonium) et 5 (alimentation en glucose et APA) est en moyenne de 0,2 centime par unité de PA et il diminue à 0,17 et 0,12 pour les fermentations n° 4 (alimentation en glucose) et n° 6 (alimentation en APA). Pour la première culture semi-continue (fermentation n° 1, ajout de glucose), le coût en matières premières est le plus faible (0,08 cts/U).

➔ Afin de comparer les performances entre les cultures discontinues et semi-continues, nous avons reporté figure D 67 les valeurs finales de ces trois critères pour les fermentations discontinues et semi-continues. Le mode de culture discontinue permet incontestablement d'obtenir les meilleures productivités spécifiques. En revanche, pour la production volumique en enzyme, les cultures semi-continues n° 1 (ajout de glucose) et n° 6 (alimentation en APA) sont aussi sinon plus performantes que les fermentations discontinues. Le coût en matières premières est plus élevé pour les cultures semi-continues, sauf pour les fermentations n° 1 (ajout de glucose) et n° 6 (alimentation en APA).

D'après les critères utilisés, le discontinu (avec ou sans extrait de levure) n'apparaît pas être clairement le mode de culture le plus performant, il permet surtout d'obtenir les meilleures productions spécifiques. En fermentation semi-continue, la productivité volumique en PA et le coût en matières premières sont dans certains cas aussi élevés qu'en culture discontinue. Une alimentation en APA comme seule source de carbone permet d'obtenir des performances intéressantes. Ici, le coût en matières premières donne une estimation du coût de production. Pour une culture semi-continue, les investissements en matériel sont plus élevés qu'en culture discontinue alors que les coûts liés au nombre d'opérations sont au contraire plus faibles. D'autre part, en culture discontinue, les productions spécifiques sont très élevées, ce qui permet de diminuer les coûts incombants à l'extraction de l'enzyme. Seule une étude économique plus complète, qui prendrait en compte tous les frais liés à la fermentation et à l'extraction, nous permettrait de choisir entre ces deux modes de culture.

*PARTIE E*

---

*M O D E L I S A T I O N*

---



## PARTIE E : MODELISATION

<b>I - Elaboration du modèle</b>	p 229
<b>I.1. - <u>Hypothèses du modèle</u></b>	p 229
<i>I.1.1. - Croissance de la souche E. coli G271</i>	p 231
<i>I.1.2. - Consommation des substrats</i>	p 234
<i>I.1.3. - Production de pénicilline acylase</i>	p 235
<b>I.2. - <u>Lois cinétiques</u></b>	p 235
<i>I.2.1. - Consommation de la peptone</i>	p 236
<i>I.2.2. - Consommation de ions ammonium</i>	p 236
<i>I.2.3. - Consommation de l'acide phénylacétique</i>	p 237
<i>I.2.4. - Consommation du glucose</i>	p 238
<i>I.2.5. - Cinétique de croissance</i>	p 240
<i>I.2.6. - Production de pénicilline acylase</i>	p 241
<i>I.2.7. - Equations des bilans de matière</i>	p 242
<b>II - Identification des paramètres du modèle</b>	p 244
<b>II.1. - <u>Première estimation des paramètres</u></b>	p 246
<i>II.1.1. - Paramètres évalués directement à partir des résultats expérimentaux</i>	p 246
<i>II.1.2. - Paramètres estimés</i>	p 248
<b>II.2. - <u>Analyse de la sensibilité des variables d'état aux paramètres du modèle</u></b>	p 251
<i>II.2.1. - Explication de la méthode</i>	p 251
<i>II.2.2. - Exemples de résultats bruts issus de l'analyse de sensibilité</i>	p 254
<i>II.2.3. - Etude qualitative de l'influence générale des paramètres du modèle sur les variables d'état</i>	p 256
<i>II.2.4. - Analyse de la sensibilité de la croissance aux paramètres du modèle</i>	p 256
II.2.4.1. - Modification de la méthode précédente	p 258
II.2.4.2. - Résultat de l'analyse de la sensibilité de la croissance aux paramètres du modèle en fermentation discontinue	p 262

II.2.4.3. - Résultat de l'analyse de la sensibilité de la croissance aux paramètres du modèle en fermentation semi-continue	p 266
II.2.5. - Conclusion	p 270
<b>II.3. - <u>Application de l'analyse de sensibilité : deuxième estimation des paramètres</u></b>	p 271
II.3.1 - <i>Correction des cinétiques de consommation des substrats</i>	p 271
II.3.1.1 - En réacteur discontinu	p 273
II.3.1.2 - En réacteur semi-continu	p 277
II.3.2 - <i>Analyse des cinétiques de croissance</i>	p 278
II.3.2.1 - Modifications des paramètres du modèle et résultats des simulations en fermentations discontinue et semi-continue	p 278
II.3.2.2. - Modifications des paramètres du modèle	p 278
II.3.2.3. - Résultats des simulations en fermentations discontinue et semi-continue	p 280
II.3.3 - <i>Modifications du modèle et résultats des simulations en fermentations discontinue et semi-continue</i>	p 283
II.3.3.1. - Modifications du modèle	p 283
II.3.3.2. - Résultats des simulations en fermentations discontinue et semi-continue	p 286
II.3.4 - <i>Résultats des simulations de la production d'enzyme</i>	p 289
<b>II.4 - <u>Résultats des simulations des fermentations continues</u></b>	p 291
<b>II.5 - <u>Discussion</u></b>	p 295
<b>III - Application du modèle : optimisation des conditions d'alimentation pour une fermentation semi-continue</b>	p 299
<b>III.1. - <u>Etude de l'influence du contrôle des concentrations en substrat dans le milieu de culture sur la croissance et la production de pénicilline acylase</u></b>	p 301
III.1.1. - <i>Etude de l'influence du contrôle de la concentration en ions ammonium dans le milieu de culture sur la croissance et la production de pénicilline acylase</i>	p 301

<i>III.1.2. - Etude de l'influence du contrôle de la concentration en acide phénylacétique dans le milieu de culture sur la croissance et la production de pénicilline acylase</i>	p 303
<i>III.1.3. - Etude de l'influence du contrôle de la concentration en glucose dans le milieu de culture sur la croissance et la production de pénicilline acylase</i>	p 303
<i>III.1.4. - Conclusion</i>	p 305
<b><u>III.2. - Résultats des simulations de cultures semi-continues avec un contrôle des concentrations en substrats dans le milieu de fermentation</u></b>	p 305
<b><u>III.3. - Conclusion : détermination des conditions optimales d'alimentation</u></b>	p 308
<i>III.3.1. - Comparaison des performances obtenues expérimentalement et théoriquement</i>	p 308
<i>III.3.2. - Conclusion : détermination des conditions optimales d'alimentation</i>	p 310





## PARTIE E : MODELISATION

### I - Elaboration du modèle

Suite à l'analyse des cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de PA, nous allons construire un modèle mathématique qui nous permettra de structurer nos connaissances sur le comportement de la souche. Les simulations en cultures discontinue, semi-continue et continue nous permettront de vérifier les hypothèses sur lesquelles repose le modèle. Par ailleurs ce modèle nous permettra de tester de nouvelles conditions expérimentales afin d'améliorer les performances des fermentations semi-continues. Le modèle mathématique élaboré dans cette partie est non structuré, le métabolisme intracellulaire n'étant pas pris en compte.

⇒ Dans une première partie, nous allons construire le modèle. A partir des hypothèses précédemment émises sur le comportement de la souche G271 en milieu complexe, les cinétiques de croissance, de production de PA et de consommation des substrats sont exprimées sous forme mathématique. Ainsi, nous obtenons un système d'équations différentielles dont l'intégration permet de simuler l'évolution des concentrations en biomasse, PA et en substrats au cours des fermentations.

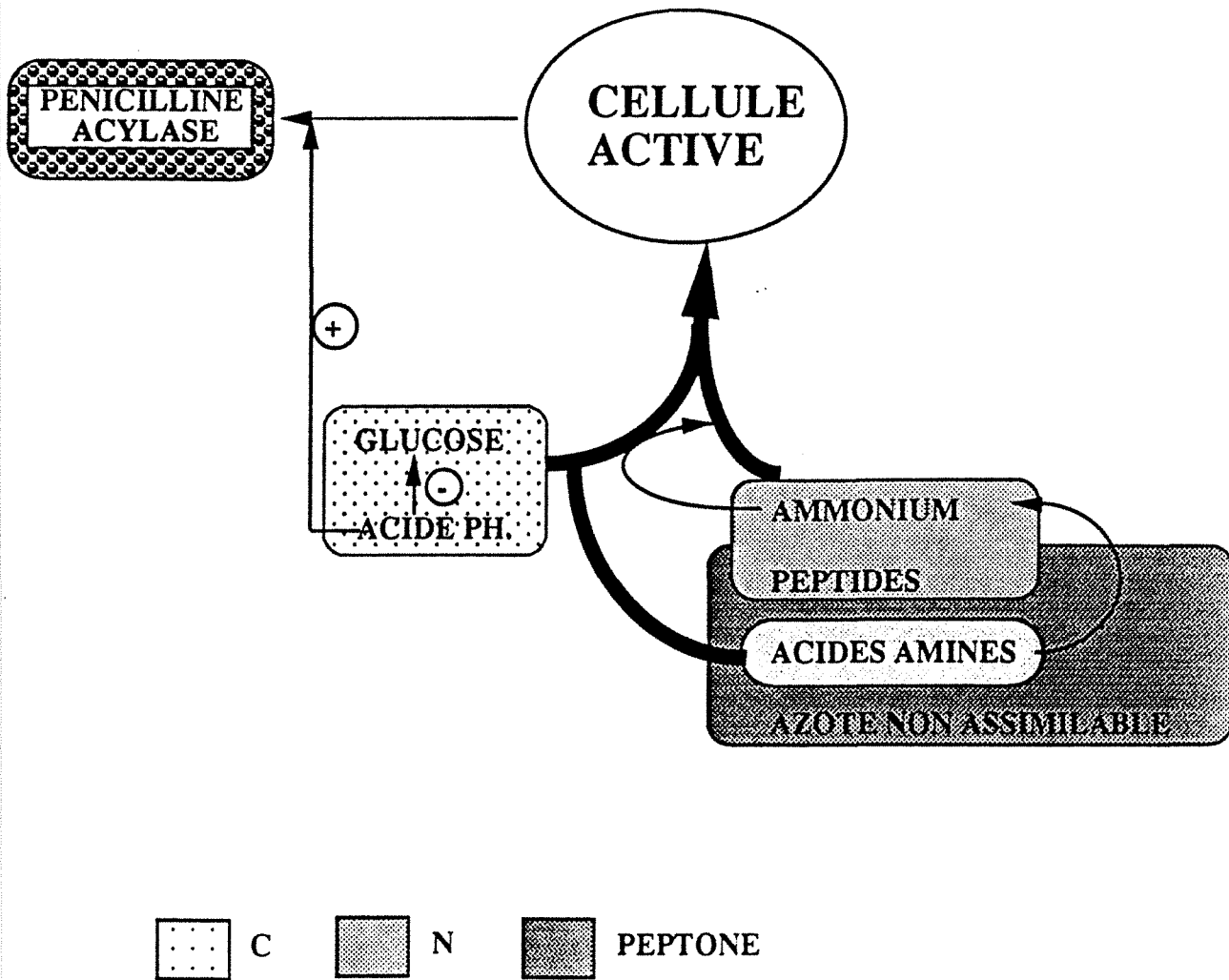
⇒ Ensuite une méthode d'ajustement des paramètres est développée à partir d'une analyse de sensibilité des variables d'état aux paramètres du modèle.

⇒ Ainsi, le comportement de la souche G271 dans les 3 modes de culture pourra être simulé.

⇒ Finalement, le modèle sera utilisé afin de tester des nouvelles conditions de fonctionnement en réacteur semi-continu, notamment en régulant l'alimentation de façon à maintenir constantes les concentrations en APA, en glucose et en ions ammonium dans le réacteur.

#### I.1. - Hypothèses du modèle

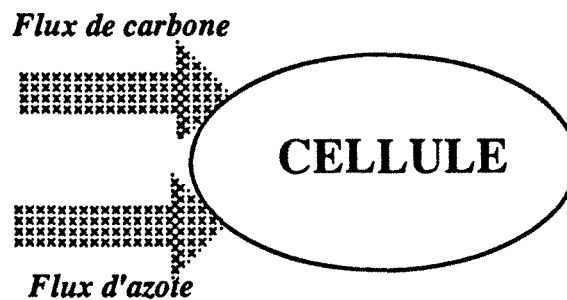
Le modèle doit simuler la croissance, la production de PA et les consommations de peptone, d'APA, du glucose et des ions ammonium. Le comportement de la souche *E. coli* G271 sur milieu complexe, que nous allons détailler, est schématisé par la **figure E 1**.



**Figure E 1 :** Schématisation du métabolisme de la souche *E. coli* G271 : assimilation des substrats carbonés (C) et azotés (N) et production de PA.

### I.1.1. - Croissance de la souche *E. coli* G271

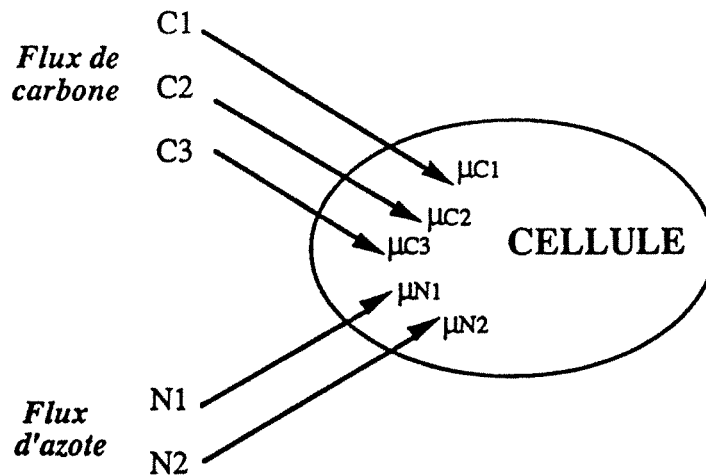
Les cellules se multiplient en consommant une source carbonée et azotée. Les lois de croissance proposées dans la littérature s'appliquent en général à un milieu contenant des sources de carbone et d'azote (glucose et ions ammonium) consommées ensemble, où plusieurs substrats carbonés (mélange de sucres) assimilés successivement. Dans notre cas, le milieu contient plusieurs sources de carbone et plusieurs sources d'azote. Nous avons utilisé une loi de croissance différente de celles rencontrées dans la littérature.



La bactérie est cultivée sur un milieu complexe contenant plusieurs substrats carbonés  $c_j$  et plusieurs substrats azotés  $n_j$ . Ces substrats interagissent entre eux, ils sont consommés simultanément ou/et successivement et peuvent limiter la croissance. Ils constituent un flux de carbone et un flux d'azote. La souche *E. coli* G271 exige pour croître la présence d'une source de carbone et d'une source d'azote, et lorsqu'un composant  $c_j$  ou  $n_j$  est épuisé, la croissance ne s'arrête pas. Le taux de croissance peut être exprimé de la façon suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( \begin{array}{c} \text{limitation de} \\ \text{la croissance} \\ \text{par la source} \\ \text{de carbone} \end{array} \right) \cdot \left( \begin{array}{c} \text{limitation de} \\ \text{la croissance} \\ \text{par la source} \\ \text{d'azote} \end{array} \right)$$

Nous exprimons que la croissance est limitée par plusieurs sources de carbone et plusieurs sources d'azote en compétition. Pour cela, nous considérons que chaque substrat consommé participe à la croissance, nous commençons donc par exprimer la consommation de chaque substrat.



La vitesse spécifique de consommation d'un substrat S (exprimée en : g de S consommé / g de biomasse formée x heure) se décompose de la façon suivante :

$$\gamma_S = \gamma_S' + \gamma_S''$$

où  $\gamma_S'$  et  $\gamma_S''$  représentent les vitesses spécifiques de consommation du substrat S respectivement associée et non associée à la croissance (lorsque le substrat S est épuisé, la consommation non associée à la croissance est nulle).

Les vitesses spécifiques de consommation de chaque substrat carboné et chaque substrat azoté sont représentées par  $\gamma_{c_i}$  et  $\gamma_{n_i}$ .

$$\gamma_{c_i} = \gamma_{c_i}^{\max} \cdot \frac{[c_j]}{K_{c_i} + [c_j]} + m_i$$

$$\gamma_{n_i} = \gamma_{n_i}^{\max} \cdot \frac{[n_j]}{K_{n_i} + [n_j]} + m_i'$$

où  $m_i$  et  $m_i'$  représentent les termes de consommation non associée à la croissance des substrats  $c_i$  et  $n_i$ .

Chaque substrat  $c_i$  et  $n_i$  contribue à la croissance, et cette contribution est représentée par  $\mu_{c_i}$  et  $\mu_{n_i}$  qui sont appelés : "flux de synthèse" des substrats  $c_i$  et  $n_i$ .

avec  $\mu_{c_i} = Y_i \cdot \gamma_{c_i}$  et  $\mu_{n_i} = Y_i' \cdot \gamma_{n_i}$

et  $Y_i$  et  $Y_i'$  représentent les rendements de conversion des substrats  $c_i$  et  $n_i$  en biomasse (exprimé en : g de biomasse formée / g de substrat consommé).

Les contributions à la croissance des sources de carbone et d'azote sont représentées par  $\mu_C$  et  $\mu_N$ .

$$\mu_C = \sum [Y_i \cdot (\gamma_{C_i} - m_i)]$$

consommation  
de  $c_i$  pour la  
croissance

$$\mu_N = \sum [Y_i \cdot (\gamma_{N_i} - m_i)]$$

consommation  
de  $n_i$  pour la  
croissance

$\mu_C$  et  $\mu_N$  représentent les "flux de synthèse" carbonés et azotés.

Nous pouvons exprimer le taux de croissance de *E. coli* à partir de la contribution à la croissance des sources de carbone et d'azote de la façon suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{\mu_C}{\mu_C^{\max}} \right) \cdot \left( \frac{\mu_N}{\mu_N^{\max}} \right)$$

où  $\mu_C^{\max}$  et  $\mu_N^{\max}$  représentent les contributions maximales de carbone et d'azote pour la croissance. Le taux de transformation des substrats est limité par la cellule (transport, synthèse ...), c'est-à-dire lorsque  $\mu = \mu_C^{\max}$  et  $\mu_N = \mu_N^{\max}$  alors la croissance est maximale, soit  $\mu = \mu_{\max}$ .

Pour  $\mu_C^{\max}$  deux expressions sont envisageables :

$$\text{soit } \mu_c^{\max} = \sum_i (Y_i \cdot \gamma_i^{\max})$$

$$\text{soit } \mu_c^{\max} = \max(Y_i \cdot \gamma_i^{\max})$$

Cependant, toutes les sources de carbone ne sont pas consommées en même temps mais successivement, la première formule n'est pas utilisable car le cas  $\mu_C = \mu_C^{\max}$  ne se présenterait pas. Nous utilisons la deuxième formule en considérant que la cellule est caractérisée par un "flux de synthèse" carboné maximal qui ne peut pas être dépassé même si plusieurs substrats sont consommés simultanément. De ce fait le rapport  $\mu_C / \mu_C^{\max}$  est limité à 1 même si plusieurs substrats  $c_i$  sont assimilés simultanément.

De même,  $\mu_N^{\max}$  est exprimé de la façon suivante :

$$\mu_N^{\max} = \max(Y_i \cdot \gamma_i^{\max})$$

Nous avons séparé les sources de carbone et d'azote qui limitent la croissance. Nous considérons la contribution à la croissance de la source carbonée et azotée.

### *1.1.2. - Consommation des substrats*

Les substrats sont représentés par la peptone, les ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), le glucose (GIC) et l'APA (APA), ils constituent soit une source de carbone soit une source d'azote. La peptone est divisée en deux fractions consommables, les acides aminés (AA) et les peptides (PE). Les substrats sont répartis entre la source de carbone (C) et la source d'azote (N) de la façon suivante :

$$(N) = (PE) + (\text{NH}_4^+)$$

$$(C) = (AA) + (\text{GIC}) + (\text{APA})$$

#### > Consommation de la peptone et des ions ammonium :

La peptone est divisée en 3 fractions : les acides aminés (AA), les peptides (PE) et la peptone non assimilable (PN). Les 2 premières fractions représentent chacune 20 % de la quantité initiale de la peptone, et la dernière 60 %.

Durant les premières heures de culture, la peptone est métabolisée rapidement et les ions ammonium sont produits : les acides aminés de la peptone sont consommés comme source de carbone. Ensuite, l'APA (APA) est consommé comme source de carbone, alors que la peptone (fraction peptidique) et les ions ammonium constituent la source d'azote. La peptone n'est jamais la seule source de carbone, aussi nous simplifions le schéma métabolique de la souche en ne considérant que le cas où les peptides sont utilisés comme source d'azote. Lorsque la concentration en source de carbone est nulle, la consommation des ions ammonium est stoppée. Pratiquement, les acides aminés sont toujours consommés avant l'APA et le glucose, donc la consommation des ions ammonium est arrêtée lorsque la somme des concentrations de ces 2 substrats carbonés est nulle.

➤ Consommation du glucose et de l'APA :

L'APA est assimilé avant le glucose, car il inhibe la consommation du glucose. Lorsque la concentration en inducteur devient inférieure à 1 g/l, la consommation du glucose (GLC) n'est plus inhibée.

*1.1.3. - Production de pénicilline acylase*

Nous considérons que la production de PA est associée à la croissance et induite par l'APA.

1.2. - Lois cinétiques :

A partir des hypothèses précédemment émises, les vitesses spécifiques de consommation des substrats, de production de biomasse et de PA vont être exprimées mathématiquement de manière à pouvoir simuler l'évolution des différentes variables d'état pendant la fermentation. D'après la stratégie choisie pour modéliser le comportement de *E. coli*, nous commencerons donc dans un premier temps par écrire les lois cinétiques de consommation des substrats afin d'exprimer  $\mu_C$  et  $\mu_N$ . Dans un deuxième temps nous formulerons l'expression du taux de croissance puis, nous terminerons par la vitesse spécifique de production de la PA. L'écriture des équations de bilan de matière nous permettra d'exprimer le système d'équations différentielles à résoudre.

Pour écrire les différentes lois cinétiques, nous utilisons les abréviations suivantes.

[a] : concentration du composé a dans le réacteur (g/l),

[X] : concentration en biomasse dans le réacteur (g/l),

$\gamma_a$  : vitesse spécifique de consommation du composé a ( $h^{-1}$ ),

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance ( $h^{-1}$ ),

$\gamma_a^{\max}$  : vitesse spécifique maximum de consommation du composé a ( $h^{-1}$ ),

$\mu_{\max}$  : vitesse spécifique maximum de croissance ( $h^{-1}$ ),

$K_a$  : constante d'affinité pour le composé a (g/l),

$\Pi_a$  : vitesse spécifique de production du composé a ( $h^{-1}$ ),

$m_a$  : consommation du composé a non associée à la croissance ( $h^{-1}$ ),

$Y_{a/b}$  : rendement de conversion du substrat b en produit a (g/g).

### 1.2.1.- Consommation de la peptone

La peptone est constituée d'une fraction non assimilable (PN) et des acides aminés (AA), plus rapidement consommés que les peptides (PE). Les consommations des AA et PE sont décrites par des lois de Monod.

$$\Rightarrow \gamma_{AA} = \gamma_{AA}^{\max} \cdot \frac{[AA]}{K_{AA} + [AA]}$$

Le terme  $\frac{[AA]}{K_{AA} + [AA]}$  signifie que la consommation des AA est limitée par la concentration en AA

$K_{AA}$  est la constante d'affinité de la bactérie pour les AA :

$$\text{si } [AA] = K_{AA} \quad \text{alors} \quad \gamma_{AA} = 0,5 \cdot \gamma_{AA}^{\max}$$

En début de fermentation, la vitesse de consommation est maximale :

$$[AA] \gg K_{AA} \quad \text{alors} \quad \gamma_{AA} = \gamma_{AA}^{\max}$$

Pour les peptides, le même type d'équation est utilisé, c'est-à-dire que la concentration en peptides limite leur propre consommation.

$$\Rightarrow \gamma_{PE} = \gamma_{PE}^{\max} \cdot \frac{[PE]}{K_{PE} + [PE]}$$

Le terme  $\frac{[PE]}{K_{PE} + [PE]}$  signifie que la consommation des PE est limitée par la concentration en PE

$K_{PE}$  est la constante d'affinité de la bactérie pour les peptides (PE) :

$$\text{si } [PE] = K_{PE} \quad \text{alors} \quad \gamma_{PE} = 0,5 \cdot \gamma_{PE}^{\max}$$

$$\text{et si } [PE] \gg K_{PE} \quad \text{alors} \quad \gamma_{PE} = \gamma_{PE}^{\max}$$

$$\Rightarrow \gamma_{PN} = 0$$

La vitesse de consommation de la fraction PN est nulle : elle n'est pas assimilée.

La consommation non associée à la croissance des acides aminés et des peptides est supposée négligeable.

### 1.2.2. - Consommation des ions ammonium

Les ions ammonium sont à la fois produits et consommés, avec une vitesse spécifique de production  $\Pi_{NH_4^+}$  et de consommation  $\gamma_{NH_4^+}$ .



$$\Rightarrow \Gamma_{\text{NH}_4^+} = \Pi_{\text{NH}_4^+} + \gamma_{\text{NH}_4^+}$$

➔ La production des ions ammonium :

$$\Pi_{\text{NH}_4^+} = Y_{\text{NH}_4^+/\text{AA}} \cdot \gamma_{\text{AA}}$$

$Y_{\text{NH}_4^+/\text{AA}}$  est exprimé en g d'ions ammonium produits par g d'AA consommés. Ce rendement permet d'exprimer que la production des ions ammonium est proportionnelle à la consommation des AA.

➔ La consommation des ions ammonium :

$$\gamma_{\text{NH}_4^+} = \gamma_{\text{NH}_4^+}^{\text{max}} \cdot \frac{[\text{NH}_4^+]}{K_{\text{NH}_4^+} + [\text{NH}_4^+]} \cdot \frac{[\text{GLC}] + [\text{APA}]}{K + [\text{GLC}] + [\text{APA}]} + m_{\text{NH}_4^+}$$

$K_{\text{NH}_4^+}$  est la constante d'affinité de la bactérie pour les ions ammonium.

La consommation des ions ammonium est exprimée par une équation de type michaelien, signifiant que les ions ammonium limitent leur propre consommation.

Le terme  $\frac{[\text{GLC}] + [\text{APA}]}{K + [\text{GLC}] + [\text{APA}]}$  traduit l'arrêt de la consommation des ions ammonium lorsqu'il n'y a pas d'autres sources de carbone en l'occurrence ici le glucose et l'APA ( $K$  est très faible). Ce terme vaut 1 en présence de glucose ou d'APA ( $[\text{APA}] + [\text{GLC}] \gg K$ ), et il vaut 0 lorsque ces deux substrats sont épuisés ( $[\text{APA}] + [\text{GLC}] = 0$  et  $K + [\text{APA}] + [\text{GLC}] \neq 0$ ).

Le terme  $m_{\text{NH}_4^+}$  représente la consommation des ions ammonium non associée à la croissance, nous avons remarqué expérimentalement que pour un taux de croissance nul, ce substrat était encore assimilé.

### 1.2.3. - Consommation de l'acide phénylacétique

La vitesse de consommation de l'APA diminue lorsque sa concentration dans le milieu de culture est faible. L'assimilation de l'APA n'est liée à aucun autre substrat présent dans le milieu, elle est exprimée par une équation de type michaelien et un terme de consommation non associée à la croissance :

$$\Rightarrow \gamma_{\text{APA}} = \gamma_{\text{APA}}^{\text{max}} \cdot \frac{[\text{APA}]}{K_{\text{APA}} + [\text{APA}]} + m_{\text{APA}}$$



$K_{APA}$  est la constante d'affinité de la bactérie pour l'APA.

Lorsque la croissance est nulle nous avons constaté expérimentalement que ce substrat est toujours consommé, il y a donc une consommation de l'APA non associée à la croissance représentée par le terme  $m_{APA}$ .

#### 1.2.4. - Consommation du glucose

L'assimilation du glucose est inhibée par l'APA. La consommation du glucose est exprimée par une équation de type michaelien modifiée par un terme Y qui rend compte de l'inhibition par l'APA et par un terme de maintenance :

$$\Rightarrow \gamma_{GLC} = \gamma_{GLC}^{max} \cdot \frac{[GLC]}{K_{GLC} + [GLC]} \cdot Y + m_{GLC}$$

$K_{GLC}$  est la constante d'affinité de la bactérie pour le glucose.

Le terme  $m_{GLC}$  représente d'après les résultats expérimentaux la consommation du glucose non associée à la croissance. L'équation de type michaelien rend compte de la limitation de la consommation du glucose par lui même. Cependant, le terme correctif Y est ajouté à cette expression, pour exprimer que la consommation du glucose est inhibée par une concentration en APA supérieure à 1 g/l, et qu'elle est nulle pour une concentration en inducteur de 2 g/l. L'inhibition est rapidement levée dès que la concentration en APA devient inférieure à 1 g/l.

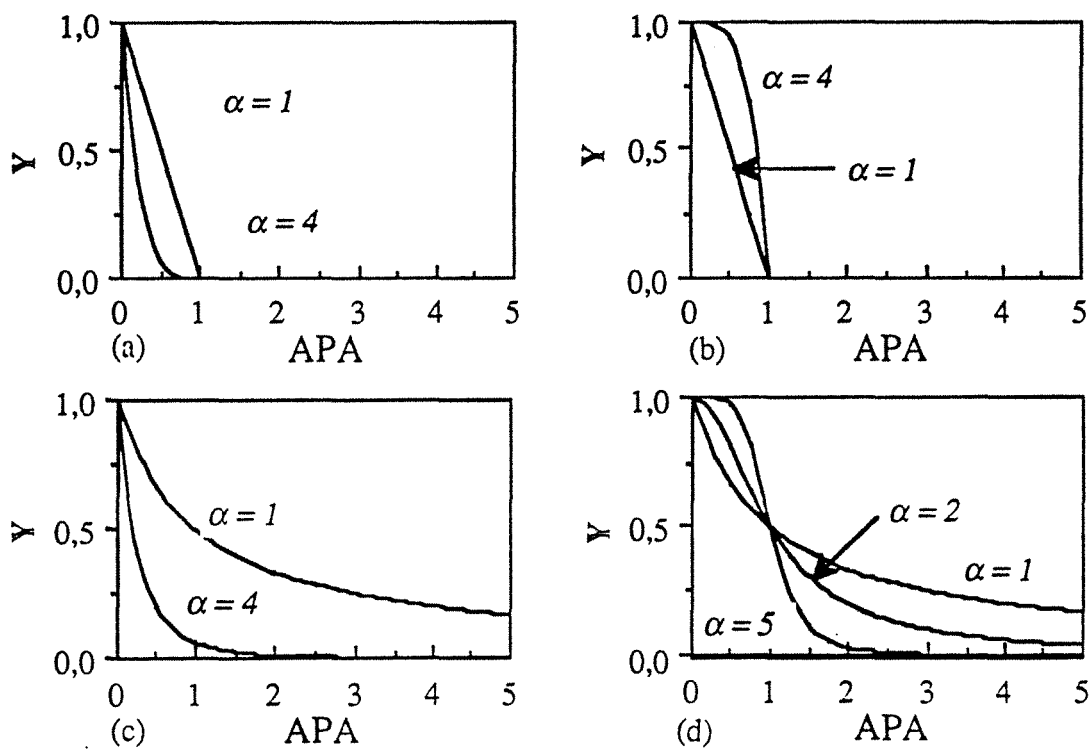
Différentes équations sont envisageables pour décrire cette inhibition.

$$Y = \left(1 - \frac{[APA]}{K_I}\right)^\alpha \quad \text{Fig. E 2}$$

$$Y = 1 - \left(\frac{[APA]}{K_I}\right)^\alpha \quad \text{Fig. E 3}$$

$$Y = \frac{1}{\left(1 + \frac{[APA]}{K_I}\right)^\alpha} \quad \text{Fig. E 4}$$

$$Y = \frac{1}{1 + \left(\frac{[APA]}{K_I}\right)^\alpha} \quad \text{Fig. E 5}$$



**Figures E 2, E 3, E 4 et E 5 :** Variation de Y en fonction de la concentration en acide phénylacétique (APA) dans le milieu de culture pour différentes valeurs de  $\alpha$  ( $K_I$ : constante d'inhibition en g/l).

$$Y = \left(1 - \frac{[APA]}{K_I}\right)^\alpha \quad (a) \quad Y = 1 - \left(\frac{[APA]}{K_I}\right)^\alpha \quad (b) \quad Y = \frac{1}{\left(1 - \frac{[APA]}{K_I}\right)^\alpha} \quad (c) \quad Y = \frac{1}{1 - \left(\frac{[APA]}{K_I}\right)^\alpha} \quad (d)$$

$K_I$  est la constante d'inhibition de l'APA. En fonction de la valeur de  $\alpha$ , lorsque le rapport entre la concentration en APA et  $K_I$  n'est pas nul, le terme Y étant inférieur à 1 entraîne une diminution de la vitesse de consommation du glucose.

- La figure E 2 permet de suivre l'évolution du rapport Y en fonction de la concentration en APA (pour  $\alpha = 1$  et  $\alpha = 4$ ). Cette expression de Y ne convient pas, le rapport s'annule trop rapidement, dès que la concentration en APA est différente de 0.

- Sur la figure E 3, nous avons reporté les valeurs du rapport Y en fonction des concentrations en APA pour deux valeurs de  $\alpha$  ( $\alpha = 1$  et  $\alpha = 4$ ). Cette expression de Y pourrait être convenable avec  $\alpha = 4$ , mais le rapport s'annule pour une concentration en APA de 1, alors qu'il doit tendre vers 0 lorsque la concentration en inhibiteur se rapproche de 2 g/l.

- L'évolution du rapport Y en fonction des concentrations en APA est décrit figure E 4 (pour  $\alpha = 1$  et  $\alpha = 4$ ). Cette équation décrite figure E 4, comme celle décrite figure E 2, entraîne une chute trop rapide de la consommation du glucose. Cependant l'allure de la courbe pour une concentration en APA supérieure à 1 est meilleure que celles obtenues précédemment en effet, pour  $\alpha = 4$  le terme C tend vers 0 lorsque la concentration en APA se rapproche de 2 g/l.

- La figure E 5 représente la variation du rapport Y en fonction de la concentration en APA (pour  $\alpha = 1$ ,  $\alpha = 2$  et  $\alpha = 5$ ). L'expression de Y avec  $\alpha = 5$  décrit convenablement le phénomène d'inhibition. Une augmentation de l'exposant  $\alpha$  permet d'obtenir des variations importantes du rapport Y lorsque la concentration en APA est voisine de 1 g/l. Cette fonction est la plus adéquate, l'expression de la consommation du glucose devient :

$$\Rightarrow \gamma_{\text{GLC}} = \gamma_{\text{GLC}}^{\text{max}} \cdot \frac{[\text{GLC}]}{K_{\text{GLC}} + [\text{GLC}]} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{[\text{APA}]}{K_I}\right)^\alpha} + m_{\text{GLC}}$$

### 1.2.5. - Cinétique de croissance

La souche G271 croît en consommant une source de carbone et une source d'azote. Si une des deux sources est absente, la croissance s'arrête.

L'expression de la croissance est la suivante :

$$\Rightarrow \mu = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{\mu_c}{\mu_c^{\max}} \right) \cdot \left( \frac{\mu_N}{\mu_N^{\max}} \right)$$

limitation de la croissance par la source de carbone et la source d'azote

où :

$$\mu_C = (Y_{X/AA} \cdot \gamma_{AA}) + (Y_{X/APA} \cdot (\gamma_{APA} - m_{APA})) + (Y_{X/GLC} \cdot (\gamma_{GLC} - m_{GLC}))$$

consommation des AA pour la croissance
consommation de l'APA pour la croissance
consommation du glucose pour la croissance

$$\mu_N = (Y_{X/PE} \cdot \gamma_{PE}) + (Y_{X/NH_4^+} \cdot (\gamma_{NH_4^+} - m_{NH_4^+}))$$

consommation des PE pour la croissance
consommation des ions ammonium pour la croissance

$Y_{X/PE}$ ,  $Y_{X/AA}$ ,  $Y_{X/APA}$ ,  $Y_{X/GLC}$ ,  $Y_{X/NH_4^+}$  sont les rendements de conversion des substrats en biomasse.

$\mu_C$  et  $\mu_N$  représentent les consommations respectives de la source de carbone et d'azote pour la croissance. Les consommations des substrats sont directement liées à la croissance par un terme de rendement. Pour la contribution à la croissance du glucose, de l'APA et des ions ammonium, le terme de consommation non associée à la croissance n'est pas pris en compte.

$\mu_C^{\max}$  et  $\mu_N^{\max}$  représentent la contribution maximale des sources de carbone et d'azote à la croissance.

### 1.2.6. - Production de pénicilline acylase

La production d'enzyme est proportionnelle à la croissance avec un terme d'induction lié à la consommation de l'APA :

$$\Rightarrow \Pi_{PA} = Y_{PA/X} \cdot \mu \cdot (1 + \alpha' \cdot \gamma_{APA})$$

production liée à la croissance
induction par l'APA

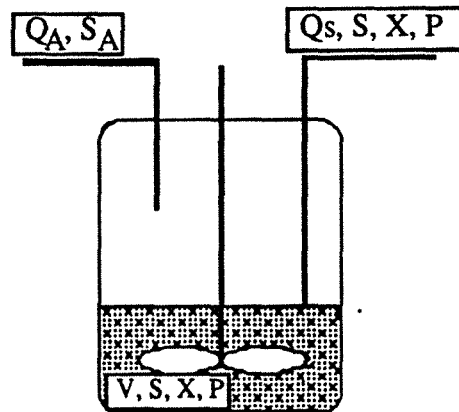
$Y_{PA/X}$  est le rendement de production de la PA (U/g)

$(1 + \alpha' \gamma_{APA})$  représente l'induction par l'acide phénylacétique ( $\alpha'$  est une constante).

Nous exprimons que la production de PA est proportionnelle à la croissance par un terme de

rendement de production de la PA. Un terme d'induction est ajouté : lorsque l'APA est consommé,  $\gamma_{APA}$  est différent de 0, le terme  $(1 + \alpha' \gamma_{APA})$  devient supérieur à 1. La production de PA est augmentée quand l'APA est consommé.

### 1.2.7. - Equations des bilans de matière



$Q_A$  : débit d'alimentation ( $l \cdot h^{-1}$ ).

$Q_S$  : débit de soutirage ( $l \cdot h^{-1}$ ).

$[S]_A$  : concentrations en substrat S dans l'alimentation (g/l).

$r_X, r_P, r_S$  : sont respectivement les vitesses de production de X et P et de consommation de S ( $g/l \cdot h$ ).

$r_{NH_4^+}, r_{NH_4^-}$  : vitesses de production et de consommation des ions ammonium ( $g/l \cdot h$ ).

$[X], [S], [P]$  : sont les concentrations respectivement en biomasse, substrat et produit dans le réacteur (g/l).

V : volume du réacteur (l).

Dans notre cas :

S : la peptone, le glucose, l'APA et les ions ammonium

P : la PA

Les bilans matières pour un réacteur quelconque schématisé précédemment s'écrivent de la façon suivante :

⇒ pour la biomasse :

$$V \cdot r_X = Q_S \cdot [X] + \frac{d(V \cdot X)}{d(t)}$$

$$r_X = \frac{Q_S}{V} \cdot [X] + \frac{d(X)}{d(t)} + \frac{[X]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

$$\frac{d(X)}{d(t)} = r_X - \frac{Q_S}{V} \cdot [X] - \frac{[X]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

⇒ pour un substrat S :

$$Q_A \cdot [S]_A = V \cdot r_S + Q_S \cdot [S] + \frac{d(V \cdot S)}{d(t)}$$

$$\frac{Q_A}{V} \cdot [S]_A = r_S + \frac{Q_S}{V} \cdot [S] + \frac{d(S)}{d(t)} + \frac{[S]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

$$\frac{d(S)}{d(t)} = -r_S + \frac{Q_A}{V} \cdot [S]_A - \frac{Q_S}{V} \cdot [S] - \frac{[S]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

⇒ pour un produit P :

$$V \cdot r_P = Q_S \cdot [P] + \frac{d(V \cdot P)}{d(t)}$$

$$r_P = \frac{Q_S}{V} \cdot [P] + \frac{d(P)}{d(t)} + \frac{[P]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

$$\frac{d(P)}{d(t)} = r_P - \frac{Q_S}{V} \cdot [P] - \frac{[P]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

⇒ pour les ions ammonium :

$$Q_A \cdot [NH_4^+]_A + V \cdot r_{NH_4^+}^+ = V \cdot r_{NH_4^+}^- + Q_S \cdot [NH_4^+] + \frac{d(V \cdot NH_4^+)}{d(t)}$$

$$\frac{Q_A}{V} \cdot [NH_4^+]_A + r_{NH_4^+}^+ = r_{NH_4^+}^- + \frac{Q_S}{V} \cdot [NH_4^+] + \frac{d(NH_4^+)}{d(t)} + \frac{[NH_4^+]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

$$\frac{d(NH_4^+)}{d(t)} = (r_{NH_4^+}^+ - r_{NH_4^+}^-) + \frac{Q_A}{V} \cdot [NH_4^+]_A - \frac{Q_S}{V} \cdot [NH_4^+] - \frac{[NH_4^+]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

Pour simuler l'évolution des concentrations en substrats, biomasse et PA dans le réacteur, il faut donc résoudre le système d'équations différentielles suivant :

⇒ pour la biomasse :

$$\frac{d(X)}{d(t)} = [X] \cdot \mu - \frac{Q_S}{V} \cdot [X] - \frac{[X]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

⇒ pour le glucose :

$$\frac{d(GLC)}{d(t)} = -[X] \cdot \gamma_{GLC} + \frac{Q_A}{V} \cdot [GLC]_A - \frac{Q_S}{V} \cdot [GLC] - \frac{[GLC]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

⇒ pour l'APA :

$$\frac{d(APA)}{d(t)} = -[X] \cdot \gamma_{APA} + \frac{Q_A}{V} \cdot [APA]_A - \frac{Q_S}{V} \cdot [APA] - \frac{[APA]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

⇒ pour les acides aminés :

$$\frac{d(AA)}{d(t)} = -[X] \cdot \gamma_{AA} + \frac{Q_A}{V} \cdot [AA]_A - \frac{Q_S}{V} \cdot [AA] - \frac{[AA]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$



⇒ pour les peptides :

$$\frac{d(\text{PE})}{d(t)} = -[X] \cdot \gamma_{\text{PE}} + \frac{Q_A}{V} \cdot [\text{PE}]_A - \frac{Q_S}{V} \cdot [\text{PE}] - \frac{[\text{PE}]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

⇒ pour les ions ammonium :

$$\frac{d(\text{NH}_4^+)}{d(t)} = [X] \cdot (\Pi_{\text{NH}_4^+} - \gamma_{\text{NH}_4^+}) + \frac{Q_A}{V} \cdot [\text{NH}_4^+]_A - \frac{Q_S}{V} \cdot [\text{NH}_4^+] - \frac{[\text{NH}_4^+]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

⇒ pour la PA :

$$\frac{d(\text{PA})}{d(t)} = [X] \cdot \Pi_{\text{PA}} - \frac{Q_S}{V} \cdot [\text{PA}] - \frac{[\text{PA}]}{V} \cdot \frac{d(V)}{d(t)}$$

Les expressions des vitesses spécifiques de consommation des substrats et de production de la PA, des ions ammonium et de la biomasse sont données dans le paragraphe précédent.

Pour un réacteur discontinu :  $Q_A = Q_S = 0$  et  $(dV/dt) = 0$

Pour un réacteur semi-continu :  $Q_S = 0$  et  $(dV/dt) = Q_A$

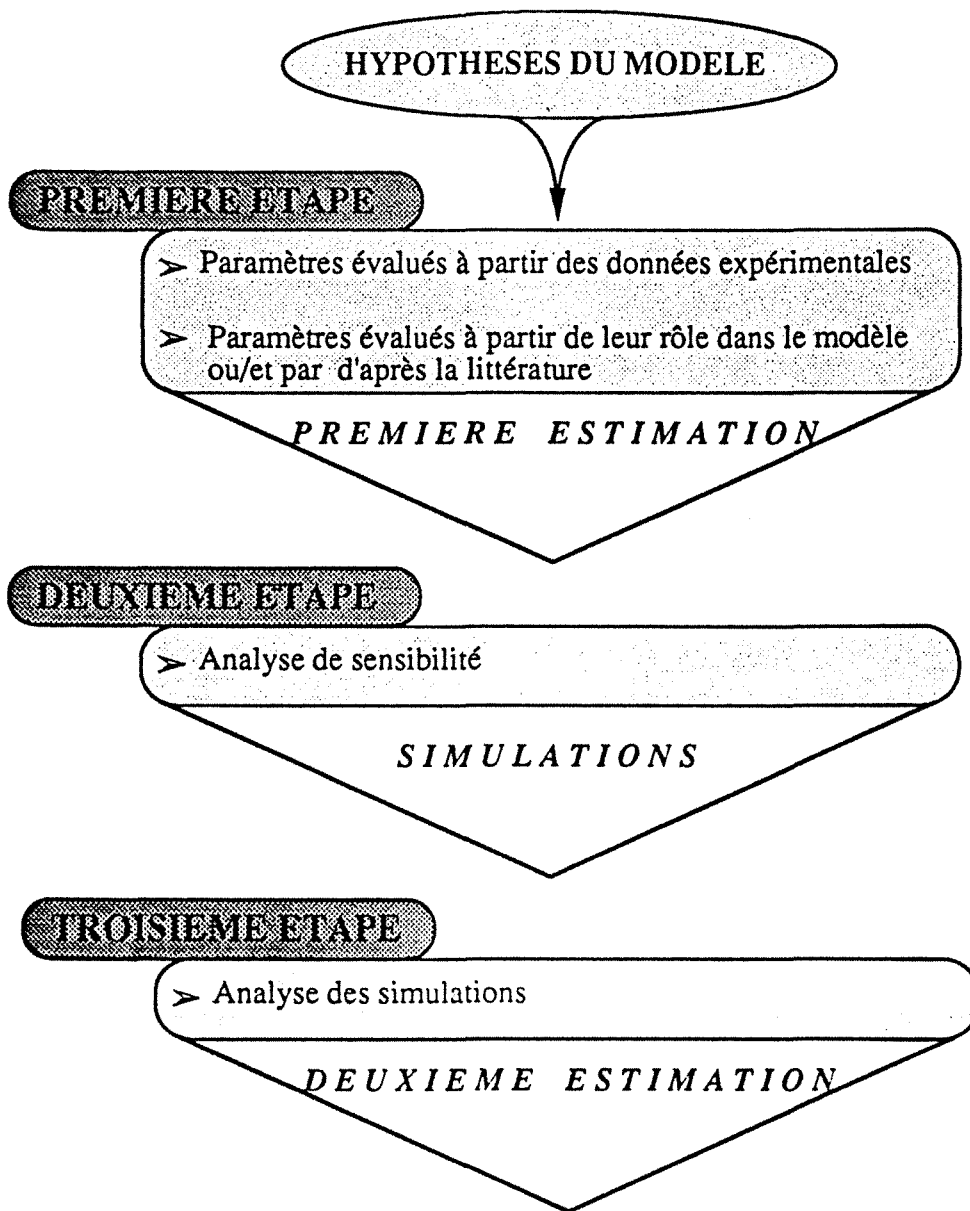
Pour un réacteur continu :  $Q_A = Q_S$  et  $(dV/dt) = 0$

## II. - Identification des paramètres

Une fois le modèle construit, les paramètres utilisés dans les différentes lois cinétiques doivent être identifiés. Certains peuvent l'être expérimentalement, d'autres doivent être évalués. Les paramètres sont ensuite ajustés de façon à améliorer les résultats théoriques fournis par le modèle. Généralement, cette étape d'identification des paramètres bien que très importante, n'est pas détaillée dans un travail de modélisation. Or, si nous voulons pouvoir systématiser la modélisation du comportement d'un microorganisme, il est indispensable de rationaliser toutes les étapes et en particulier celle-ci. Nous allons dans cette partie détailler cette étape afin de proposer un protocole d'identification des paramètres.

La démarche suivie est décrite par la **figure E 6** : elle comporte 3 étapes.

⇒ La première consiste en une estimation des paramètres du modèle. Certains sont calculés à partir des données expérimentales, d'autres sont évalués en fonction de leur rôle dans le modèle. Ainsi, nous obtenons une première estimation des paramètres.



**Figure E 6 :** Estimations des paramètres du modèle : schématisation des différentes étapes.

⇒ Ensuite une analyse de sensibilité des variables d'état aux paramètres du modèle est effectuée. Cette 2ème étape permet d'identifier le rôle et l'influence des paramètres et à quel moment de la fermentation ils sont influents.

⇒ A partir des résultats de l'analyse de sensibilité, les paramètres du modèle sont ajustés grâce à une analyse des simulations des fermentations. Ainsi, la 3ème étape aboutit à une 2ème estimation des paramètres du modèle.

Nous allons détailler chaque étape et utiliser ce protocole pour déterminer les paramètres du modèle.

## II.1. - Première estimation des paramètres :

### II.1.1 Paramètres évalués directement à partir des résultats expérimentaux

Nous faisons la distinction entre les paramètres évalués d'après leur rôle et ceux calculés à partir des données expérimentales. Les cinq fermentations en réacteur discontinu E, F, G, H, I et les deux en semi-continu J et K sont utilisées car les milieux et les conditions de culture sont très différentes de l'une à l'autre et de plus tous les substrats ont été dosés, le pH est contrôlé et la concentration en oxygène dissous est régulée à 40 % de la saturation. Les conditions opératoires de ces fermentations sont succinctement rappelées dans le **tableau E 1**. De plus toutes ces fermentations ont été présentées et analysées dans la partie précédente.

FERMENTATION	MODE DE CULTURE		COMPOSITION DES MILIEUX					
	discontinu	semi-continu	FERMENTATION peptone	glucose	APA	ALIMENTATION glucose	APA	ions NH <sub>4</sub>
E	+		+					
F	+		+	+				
G	+		+		+			
H	+		+	+	+			
I	+		ions NH <sub>4</sub>	+	+			
J		+	+	+	+	+	+	+
K		+	+	+	+		+	

Tableau E 1 : Composition des milieux de culture.

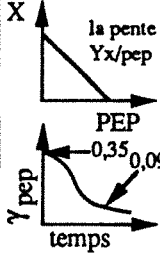
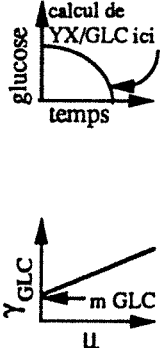
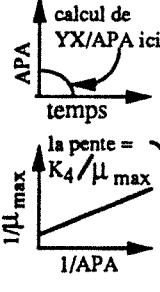
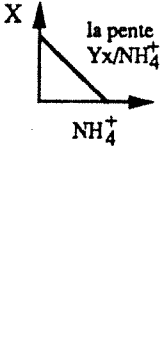
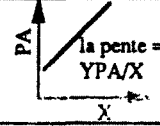
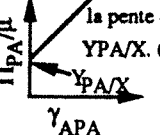
PARAMETRES	FERMENTATION	COMMENTAIRES
$Y_{X_{PEP}} = 1$ $\gamma_{AA}^{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ $\gamma_{PL}^{\max} = 0,09 \text{ h}^{-1}$	E  E	 <p>la pente = <math>Y_{x/pep}</math></p> <p>PEP</p> <p>0,35</p> <p>0,09</p> <p><math>\gamma_{pep}</math></p> <p>temps</p> <p>- pour cette fermentation il n'y a que de la peptone</p> <p>- correspond à la valeur maximale de la vitesse spécifique de consommation de la peptone (pendant la première phase)</p> <p>- correspond à la vitesse spécifique de consommation de la peptone (pendant la deuxième phase)</p>
$Y_{X_{GLC}} = 0,9$ $\gamma_{GLC}^{\max} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ $K_{GLC} = 0,1 \text{ g/l}$ $K_I = 1 \text{ g/l}$ $m_{GLC} = 0,02 \text{ h}^{-1}$	I F H K	 <p>calcul de <math>Y_{X/GLC}</math> ici</p> <p>glucose</p> <p>temps</p> <p><math>\gamma_{GLC}</math></p> <p><math>\mu</math></p> <p>- pendant la 2ème phase de cette fermentation, le glucose est la seule source de carbone</p> <p>- la vitesse spécifique de consommation du glucose est maximum pour cette fermentation où il n'y a que de la peptone et du glucose</p> <p>- valeur prise dans la littérature</p> <p>- nous constatons à première vue que le glucose est consommé lorsque <math>APA &lt; 1 \text{ g/l}</math></p> <p>- nous utilisons le semi-continu qui permet d'obtenir une droite correcte</p>
$Y_{X_{APA}} = 0,5$ $\gamma_{APA}^{\max} = 0,11 \text{ h}^{-1}$ $K_4 = 0,5 \text{ g/l}$ $m_{APA} = 0,01 \text{ h}^{-1}$	G  J	 <p>calcul de <math>Y_{X/APA}</math> ici</p> <p>APA</p> <p>temps</p> <p>la pente = <math>K_4 / \mu_{\max}</math></p> <p><math>1/\mu_{\max}</math></p> <p><math>1/APA</math></p> <p>- pendant la 1ère phase, où nous calculons <math>\gamma_{APA}^{\max}</math>, la croissance se fait sur APA et peptone, nous trouvons un rendement de 1,5 pour l'APA, mais considérant que <math>Y_{X/PEP} = 1</math>, nous avons <math>Y_{X/APA} = 0,5</math> (nous aurions pu utiliser la fermentation I où l'extrait de levure remplace la peptone)</p> <p>- calculs faits avec les données de la littérature</p> <p>- nous utilisons le semi-continu J qui permet d'obtenir une droite correcte</p>
$Y_{X_{NH_4^+}} = 12$ $Y_{NH_4^+, AA} = 0,03$ $\gamma_{NH_4^+}^{\max} = 0,003 \text{ h}^{-1}$ $m_{NH_4^+} = 0,0005 \text{ h}^{-1}$ $\mu_{\max} = 0,18 \text{ h}^{-1}$ $\mu_{\max} = 0,33 \text{ h}^{-1}$	I H I J E, F, G, H J, K	 <p>la pente = <math>Y_{x/NH_4^+}</math></p> <p><math>NH_4^+</math></p> <p>- la seule source d'azote est <math>NH_4^+</math></p> <p>- nous calculons ce rendement pendant la phase de production des ions <math>NH_4^+</math>, nous considérons que tous les AA sont consommés</p> <p>- considérant que la faible quantité d'extrait de levure est rapidement consommée la seule source d'azote est <math>NH_4^+</math></p> <p>- nous utilisons le semi-continu J qui permet d'obtenir une droite correcte</p> <p>- nous calculons des valeurs moyennes pour les discontinus et les semi-continus</p>
$Y_{PA_X} = 300 \text{ U/g}$ $Y_{PA_X} = 180 \text{ U/g}$	H K	 <p>la pente = <math>Y_{PA/X}</math></p> <p>PA</p> <p>X</p> <p>- nous calculons des rendements pour les discontinus et les semi-continus (dans les meilleures conditions : H et K)</p>
$\alpha = 0,09$	J et K	 <p>la pente = <math>Y_{PA/X} \cdot \alpha</math></p> <p><math>1/PA</math></p> <p><math>\gamma_{APA}</math></p> <p>Cette courbe permet de calculer <math>Y_{PA/X}</math> (ordonnée à l'origine) et <math>\alpha</math> (par le calcul de la pente)</p>

Tableau E 2 : Calcul des paramètres du modèle.

La détermination des paramètres cinétiques est résumée dans le **tableau E 2**. Nous avons précisé la fermentation utilisée pour chacun des calculs et schématisé la courbe exploitée. Certaines valeurs sont citées dans l'analyse des cinétiques de la partie précédente d'autres non. Les constantes d'affinité du glucose et de l'APA sont calculées à partir de données expérimentales obtenues sur la même souche fournies par la littérature (CACHON, 1988 et McINNES, 1989).

Remarque :

Les valeurs obtenues pour les rendements sont élevées. MEYER et coll. (1984) constatent eux aussi que les rendements sur un milieu complexe sont supérieurs à ceux calculés sur un milieu synthétique où tous les substrats sont facilement identifiés et dosés. Ils obtiennent sur milieu complexe un rendement de conversion du glucose en biomasse de 1 alors qu'il est de 0.5 sur milieu synthétique.

### II.1.2. - Paramètres estimés

Les paramètres qui ne peuvent pas être calculés expérimentalement sont évalués en fonction de ce qu'ils représentent dans le modèle.

➔ La constante K :

$$\gamma_{\text{NH}_4^+} = \gamma_{\text{NH}_4^+}^{\text{max}} \cdot \frac{[\text{NH}_4^+]}{K_{\text{NH}_4^+} + [\text{NH}_4^+]} \cdot \frac{[\text{GLC}] + [\text{APA}]}{K + [\text{GLC}] + [\text{APA}]} + m_{\text{NH}_4^+}$$

La constante K permet d'annuler la consommation des ions ammonium lorsqu'il n'y a plus de glucose ni d'APA dans le milieu. Ne devant pas intervenir dans l'expression de la consommation des ions ammonium, nous choisissons pour K une valeur très faible, par exemple 0,01.

$$K = 0,01$$

➔ Le rendement de conversion de la peptone en biomasse a été calculé à partir des données expérimentales (Tab. E 2). En première approximation, nous considérons que les rendements de conversion en biomasse de la peptone, des acides aminés et des peptides sont égaux.

$$Y_{\text{AA}/X} = Y_{\text{PE}/X} = Y_{\text{PEP}/X} = 1 \text{ g/g}$$

Afin de traduire une consommation d'APA rapide suivie d'une assimilation plus lente des peptides, nous choisissons  $K_{\text{AA}}$  très faible et  $K_{\text{PE}}$  supérieure à  $K_{\text{AA}}$ . Cependant  $K_{\text{PE}}$  demeure inférieure à la concentration initiale en peptides afin de ne pas limiter l'assimilation de ce substrat dès le début de

la fermentation.

$$K_{AA} = 0,001 \text{ g/l} \quad \text{et} \quad K_{PE} = 1 \text{ g/l}$$

Pour une concentration en acides aminés supérieure à 0,01 g/l la vitesse spécifique de consommation des acides aminés est maximale. Ils sont consommés en même temps que les peptides mais beaucoup plus rapidement.

➔ La constante d'affinité des ions ammonium n'a pas été calculée, une valeur lui est attribuée pour que la concentration initiale en ions soit supérieure à  $K_{NH_4^+}$ .

$$K_{NH_4^+} = 0,01 \text{ g/l}$$

➔ Pour le paramètre  $\alpha$  :

$$\gamma_{GLC} = \gamma_{GLC}^{\max} \cdot \frac{[GLC]}{K_{GLC} + [GLC]} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{[APA]}{K_I}\right)^\alpha} + m_{GLC}$$

Lorsque la concentration en APA est supérieure à 1g/l, la consommation du glucose est inhibée, elle s'annule pour une concentration en inducteur supérieure ou égale à 2 g/l. D'après les résultats précédents (§ 1.2.6, Fig. E 5), la valeur  $\alpha = 5$  permet de simuler correctement l'inhibition de la consommation du glucose par l'APA.

$$\alpha = 5$$

➔ Pour évaluer  $\mu_C^{\max}$  et  $\mu_N^{\max}$  nous appliquons les formules précédemment choisies.

$$\text{soit} \quad \mu_c^{\max} = \max(Y_i \cdot \gamma_i^{\max}) \quad \text{et} \quad \mu_N^{\max} = \max(Y_i \cdot \gamma_i^{\max})$$

D'après les différentes valeurs des  $Y_i \cdot \gamma_i^{\max}$  nous obtenons :

$$\mu_{C\max} = Y_{X/AA} \cdot \gamma_{AA}^{\max}$$

$$\mu_{N\max} = Y_{X/PE} \cdot \gamma_{PE}^{\max}$$

Les "taux de synthèse" des acides aminés et des peptides représentent les contributions maximales à la croissance pour la cellule.

$$\mu_C^{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_N^{\max} = 0,09 \text{ h}^{-1}$$

Les valeurs des paramètres après la première identification sont :

$Y_{X/PEP}$	=	1 g/g
$\gamma_{AA}^{\max}$	=	0,35 h <sup>-1</sup>
$\gamma_{PE}^{\max}$	=	0,09 h <sup>-1</sup>
$K_{AA}$	=	0,01 g/l
$K_{PE}$	=	1 g/l
$Y_{X/GLC}$	=	0,9 g/g
$\gamma_{GLC}^{\max}$	=	0,15 h <sup>-1</sup>
$K_{GLC}$	=	0,1 g/l
$m_{GLC}$	=	0,02 h <sup>-1</sup>
$K_I$	=	1 g/l
$\alpha$	=	5
$Y_{X/APA}$	=	0,5 g/g
$\gamma_{APA}^{\max}$	=	0,11 h <sup>-1</sup>
$K_{APA}$	=	0,5 g/l
$m_{APA}$	=	0,01 h <sup>-1</sup>
$Y_{X/NH_4^+}$	=	12 g/g
$Y_{NH_4^+/AA}$	=	0,03 g/g
$\gamma_{NH_4^+}^{\max}$	=	0,003 h <sup>-1</sup>
$K_{NH_4^+}$	=	0,01 g/l
$m_{NH_4^+}$	=	0,0005 h <sup>-1</sup>
$K$	=	0,01
$\mu^{\max}$	=	0,18 / 0,33 h <sup>-1</sup>
$\mu_N^{\max}$	=	0,09 h <sup>-1</sup>
$\mu_C^{\max}$	=	0,35 h <sup>-1</sup>
$Y_{PA/X}$	=	300 / 180 U/g
$\alpha'$	=	0,09

## II.2. - Analyse de la sensibilité des variables d'état aux paramètres du modèle :

L'étude de la sensibilité des variables d'état aux paramètres du modèle en cultures discontinue et semi-continue met en évidence l'influence des paramètres, leur importance et le moment de la fermentation où ils le sont. Ainsi, en fonction de la variable d'état à modifier, de l'instant auquel il faut intervenir et du mode de culture, l'étude de sensibilité indique quels sont les paramètres à changer. D'autre part, si nous constatons d'après cette étude que les cinétiques théoriques ne peuvent pas être améliorées en ajustant les paramètres, il faut alors modifier les expressions cinétiques.

L'analyse de sensibilité consiste en l'étude de l'influence de la valeur de chacun des paramètres sur les variables d'état.

⇒ Nous commencerons par expliquer la méthodologie employée pour effectuer l'étude de sensibilité.

⇒ Puis nous illustrerons cette explication par deux exemples.

⇒ Nous entamerons ensuite l'étude de sensibilité, que nous avons divisée en deux parties.

⇒ Dans une première partie, nous décrirons l'influence générale des paramètres sur les variables d'état par la méthode sus-décrite. Les paramètres seront modifiés de façon à observer une variation des variables d'état. Cette première étude est essentiellement qualitative.

⇒ Dans une 2ème partie, nous détaillerons l'analyse de la sensibilité de la croissance aux paramètres cinétiques. Contrairement à l'étude précédente, le même pourcentage de variation est appliqué à tous les paramètres. Ainsi, la sensibilité de la biomasse aux différents paramètres sera évaluée et comparée : cette analyse est quantitative.

⇒ Finalement, ces deux études complémentaires seront utilisées pour ajuster les paramètres, grâce à une analyse des résultats des simulations des fermentations.

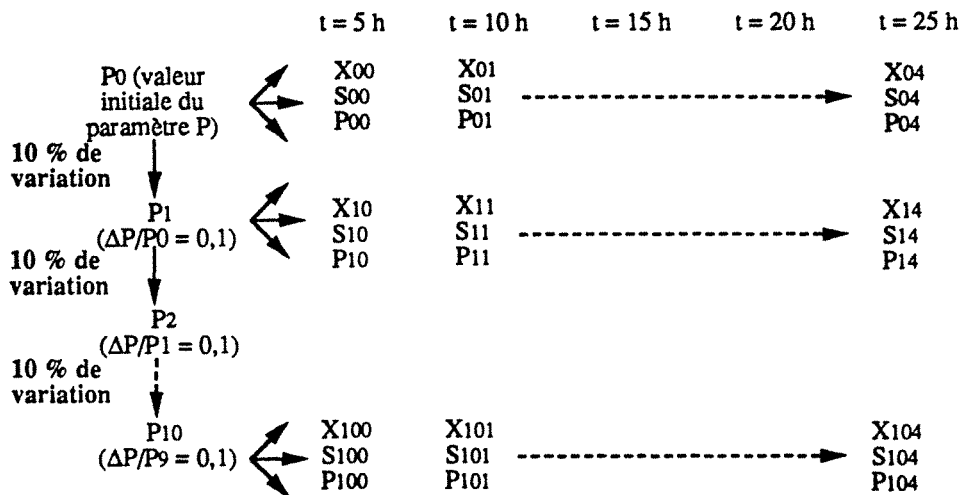
### II.2.1. - *Explication de la méthode*

L'analyse de la sensibilité a été réalisée sur les fermentations discontinues et semi-continues, avec une alimentation en glucose, en APA et en ions ammonium. Pour les cultures discontinues nous choisissons cinq temps d'étude (5-10-15-20-25 heures) et 4 pour les semi-continues (5-15-25-35 heures) sachant que l'alimentation débute à la 10ème heure. La



démarche consiste à faire varier les paramètres afin d'étudier la réaction des variables d'état. Pour expliquer la méthode, nous allons prendre un exemple.

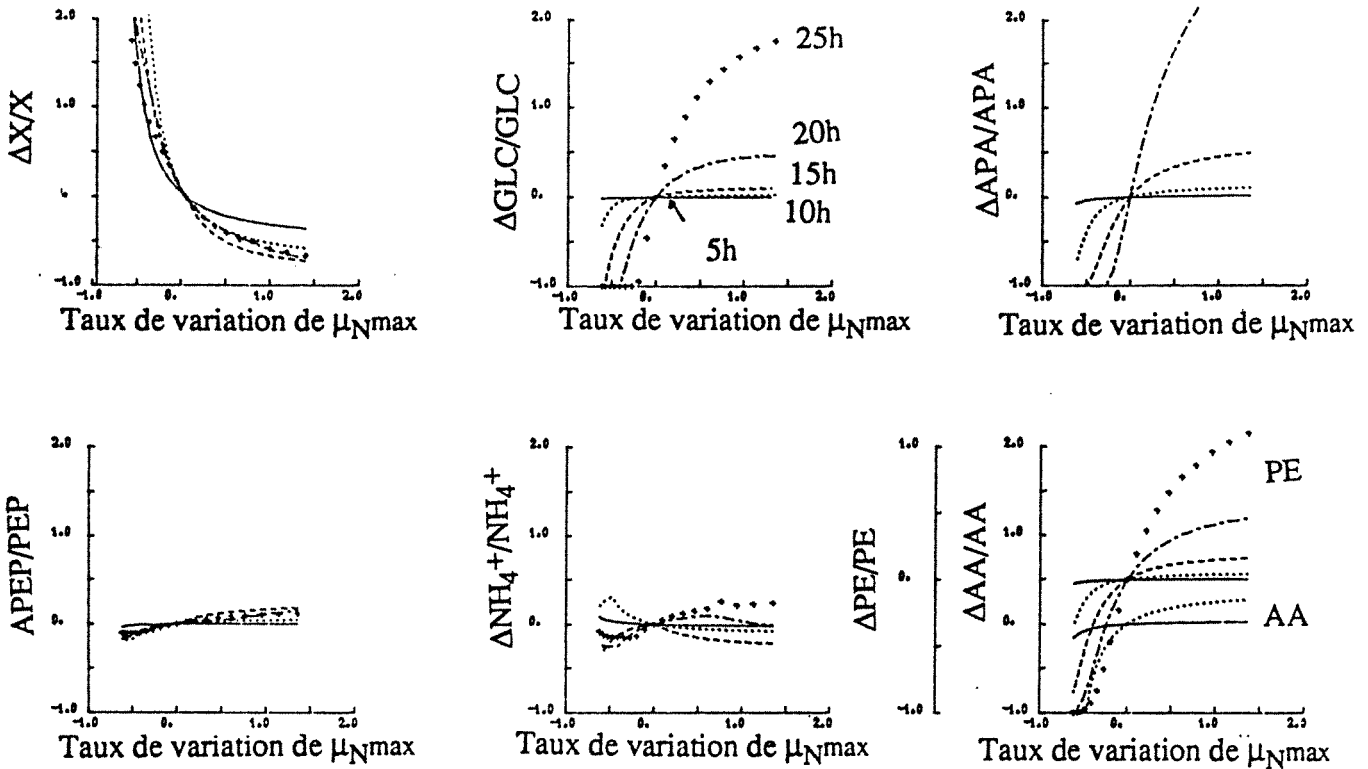
Exemple de l'étude de sensibilité en culture discontinue des variables d'état biomasse (X), substrat (S) et produit (P) au paramètre P (le pourcentage de variation utilisé dans l'exemple est de 10 %).



Pour la valeur initiale du paramètre P ( $P_0$ ), nous obtenons pour chacun des 4 temps d'étude des valeurs pour chaque variable d'état ( $X_{00}$  est la valeur de X pour le paramètre  $P_0$  et pour le premier temps d'étude,  $X_{01}$  est la valeur de X pour le paramètre  $P_0$  et pour le 2ème temps d'étude, etc...). La valeur de  $P_0$  est modifiée de 10 %, nous obtenons une valeur  $P_1$ . Pour ce paramètre  $P_1$ , nous obtenons des nouvelles valeurs des variables d'état correspondant à chaque temps d'étude ( $X_{10}$  est la valeur de X pour le paramètre  $P_1$  et pour le premier temps d'étude,  $X_{11}$  est la valeur de X pour le paramètre  $P_1$  et pour le 2ème temps d'étude, etc ...). Nous appliquons 10 fois de suite le même pourcentage de variation, ainsi  $P_{10}$  est la 10ème variation du paramètre P auquel correspondent les valeurs des variables d'état pour chaque temps d'étude ( $X_{100}$  est la valeur de X pour le paramètre  $P_{10}$  et pour le premier temps d'étude,  $X_{101}$  est la valeur de X pour le paramètre  $P_{10}$  et pour le 2ème temps d'étude, etc...). De la même façon, l'étude de sensibilité est réalisée en diminuant le paramètre.

Les variations des variables d'état sont évaluées de la façon suivante :

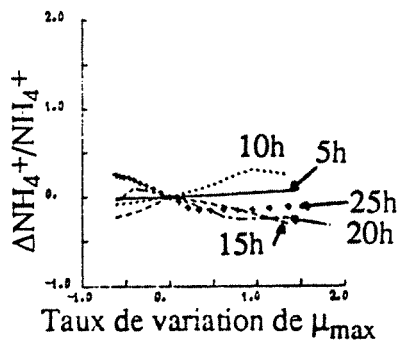
par exemple, pour la biomasse nous avons : 
$$\frac{\Delta X}{X} = \frac{X - X'}{X}$$



**Figure E 7 :** Etude de la sensibilité en culture discontinue des 7 variables d'état du modèle à  $\mu_{Nmax}$  pour 5 temps d'étude (5ème, 10ème, 15ème, 20ème et 25ème heure).

➤ variables d'état : biomasse (a), glucose (b), APA (c), peptone (d), ions ammonium (e), acides aminés et peptides (f).

a	b	c
d	e	f



**Figure E 8 :** Etude de la sensibilité en culture discontinue des ions ammonium ( $NH_4^+$ ) à la vitesse spécifique maximum de croissance ( $\mu_{max}$ ) pour 5 temps d'étude (5ème, 10ème, 15ème, 20ème et 25ème heure).

- où :
- X est la concentration en biomasse obtenue pour la valeur initiale du paramètre étudié (P)
  - X' est la concentration en biomasse obtenue après avoir modifié le paramètre de la valeur P à la valeur P'.

Une variable d'état est sensible à un paramètre, si la modification de celui-ci se répercute sur les variables d'état.

Pour cette étude, nous voulons obtenir une variation des variables d'état, aussi le pourcentage utilisé n'est pas toujours le même suivant les paramètres. Le pourcentage de variation peut être de 10 % ou 20 % voire de 50 %.

La production de PA est d'après le modèle directement liée à la croissance, ces deux variables d'état réagissent de la même façon aux modifications des paramètres. Les deux paramètres liés à la production de PA ( $Y_{PA/X}$  et  $\alpha'$ ) sont étudiés plus loin.

### *II.2.2. - Exemples de résultats bruts issus de l'analyse de sensibilité*

Après avoir expliqué le principe de l'analyse de sensibilité développé ici, nous allons donner deux exemples de résultats bruts fournis par l'analyse de sensibilité des variables d'état à  $\mu_{Nmax}$  et des ions ammonium à  $\mu_{max}$ . Nous obtenons les résultats sous forme d'une courbe représentant l'évolution de la variable d'état pour chaque temps d'étude donné en fonction de la variation du paramètre. Les exemples choisis illustrent les différents types de courbes obtenues.

➡ La figure E 7 (a, b, c, d, e et f) représente les résultats de l'étude de la sensibilité des variables d'état à  $\mu_{Nmax}$ . Pour chaque paramètre et pour chaque mode de culture, nous obtenons cet ensemble de 6 courbes. Les courbes sont généralement symétriques par rapport à l'origine. C'est-à-dire qu'une augmentation et une diminution d'un paramètre ont des effets inverses sur une variable d'état. Nous ne commenterons pas toutes les courbes obtenues. Les résultats seront récapitulés plus loin sous forme d'un tableau.

➡ La figure E 8 représente l'influence du taux de croissance maximum sur la concentration en ions ammonium. Nous obtenons une courbe asymétrique pour l'influence du  $\mu_{max}$  sur cette variable d'état. Avant la 10ème heure de fermentation, une augmentation du taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ) se traduit par une production d'ions ammonium et donc une augmentation de leur concentration dans le milieu. En revanche, après la 10ème heure, les ions ammonium sont seulement consommés, le taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ) et la concentration en ions ammonium varient cette fois en sens inverse.

VARIABLES D'ETAT PARAMETRES	biomasse		glucose		APA		peptides		a. aminés		peptone		ammonium	
	B	FB	B	FB	B	FB	B	FB	B	FB	B	FB	B	FB
$\mu_{max}$ (var 10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	→	→	↖	↖
$\mu_{Cmax}$ et $\mu_{Nmax}$ (var 10 %)	↘	↘	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
vit. spé. max. de conso. des AA (10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↖	↖
vit. spé. max. de conso. des PE (10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↖	↖
vit. spé. max. de conso. du GLC (10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	→	→	→	→	→	→	→	→
vit. spé. max. de conso. de l'APA (10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	→	→	↘	↘
vit. spé. max. de conso. de l'ammonium (10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	→	→	↘	↘
rdt biomasse/GLC (var 10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	→	→	→	→	↘	↘
rdt biomasse/APA (var 10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	→	→	→	→	→	→
rdt biomasse/PEP (var 10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↖	↖
rdt biomasse/ammonium (var 10 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	→	→	↘	↘
rdt ammonium/AA (var 20 %)	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	↗	↗
KAA (var 50 %)	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
KPE (var 50 %)	↘	↘	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↖	↖
KGLC (var 50 %)	↘	↘	↗	↗	↗	↗	↗	↗	→	→	→	→	→	→
KAPA (var 50 %)	↘	↘	↗	↗	↗	↗	↗	↗	→	→	→	→	→	→
Kammonium (var 50 %)	↘	↘	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	→	→	↘	↘
KI (var 20 %)	↗	↗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	→	→	↖	↖
m GLC (var 50 %)	↘	↘	↗	↗	↗	↗	↗	↗	→	→	→	→	↘	↘
m APA (var 50 %)	↘	↘	↗	↗	↗	↗	↗	↗	→	→	→	→	→	→
m ammonium (var 50 %)	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	↘	↘

Tableau E.3 : Etude qualitative de l'influence des paramètres du modèle sur les 7 variables d'état en cultures discontinue (B) et semi-continue (FB).

### II.2.3. - Etude qualitative de l'influence des paramètres du modèle sur les variables d'état

Après avoir montré quelques résultats bruts, nous récapitulons l'analyse de toutes les courbes dans le **tableau E 3**. Pour chaque paramètre, le pourcentage de variation appliqué est indiqué et pour chaque variable d'état, le temps de fermentation où la sensibilité est maximum est précisé. Seuls les résultats concernant l'augmentation des paramètres sont reportés dans le **tableau E 3**. Quand une variable d'état est voisine de zéro, le calcul de sa variation n'est pas possible. par exemple, à la 25ème heure de fermentation en discontinu, la concentration en APA ou en acides aminés (AA) tend vers 0, le rapport  $\Delta\text{APA}/\text{APA}$  ou  $\Delta\text{AA}/\text{AA}$  est infini.

→ Le taux de croissance maximum :

D'après le **tableau E 3**, nous constatons qu'une augmentation du taux de croissance maximum entraîne une amélioration de la concentration en biomasse, qui est maximum à 10 heures pour une culture discontinue et 5 heures pour une culture en semi-continue. Ce paramètre a une valeur plus élevée pour la culture en réacteur semi-continu donc le  $\Delta P/P$  est plus important dès le début de la fermentation : dans ces conditions, ce paramètre a une influence maximale à la 5ème heure. Les concentrations en glucose, APA, acides aminés et en peptides diminuent alors que  $\mu_{\max}$  augmente. L'influence maximale est obtenue à 10 heures pour les acides aminés, 15 heures pour l'APA, 25 heures pour le glucose et entre la 15ème et la 20ème heure pour les peptides. En réacteur semi-continu, ces temps sont sensiblement les mêmes. Nous avons constaté que les courbes  $\Delta\text{NH}_4^+/\text{NH}_4^+$  en fonction de  $\Delta P/P$  ne sont pas strictement monotone. Le taux de croissance maximum n'a pas d'influence sur la consommation de la peptone.

→ Les vitesses spécifiques maximum de consommation des substrats :

Les vitesses spécifiques maximum de consommation des acides aminés, des peptides, du glucose, de l'APA et des ions ammonium ont le même type d'influence sur les variables d'état. Une augmentation d'un de ces paramètres se traduit par une amélioration de la croissance et de la consommation des substrats (leurs concentrations diminuent). Pour le glucose, ce paramètre est influent en fin de fermentation alors que les acides aminés et les peptides sont déjà consommés : la vitesse spécifique maximum de consommation du glucose n'a d'influence ni sur les acides aminés ni sur les peptides. En revanche, la vitesse spécifique maximum de consommation de l'APA a une influence sur ceux-ci car l'inducteur est assimilé en début de culture. En culture semi-continue, les substrats sont consommés plus rapidement, les peptides sont donc sensibles à  $\gamma_{\text{GLC}}^{\max}$ . Les paramètres  $\mu_{\text{C}\max}$  et  $\mu_{\text{N}\max}$  ont une influence négative sur la biomasse durant toute la fermentation. Cette influence est positive sur les substrats, notamment en fin de culture, sauf pour les acides aminés qui sont eux consommés en début de fermentation.

→ Les rendements :

Une augmentation des rendements de conversion des substrats en biomasse entraîne une forte production de biomasse et une amélioration de la consommation des substrats. Le rendement de conversion des acides aminés en ions ammonium n'a d'influence que sur la concentration en ions ammonium. Elle est maximum en début de fermentation quand les ions ammonium sont produits. Sinon, ce rendement n'a pas d'influence sur les autres variables d'état. En effet, dans ces conditions, ils ne sont pas limitants et de plus ce substrat n'apparaît dans aucune autre équation.

→ Les constantes d'affinité :

La constante d'affinité des acides aminés ( $K_{AA}$ ) n'a d'influence sur aucune des variables d'état (acides aminés compris).  $K_{AA}$  reste très inférieure à la concentration initiale en acides aminés et leur consommation n'est donc pas perturbée. L'augmentation des constantes d'affinité pour les autres substrats se traduit par une diminution de la croissance et de la consommation des substrats. Les constantes d'affinités du glucose et de l'APA n'ont pas d'influence sur la consommation des acides aminés et des peptides. L'augmentation de la constante d'inhibition ( $K_I$ ) se traduit par une meilleure croissance et consommation des substrats. Lorsque le  $K_I$  est plus élevé, il faut plus d'APA pour inhiber la consommation du glucose. De ce fait, la consommation du glucose est plus rapide et la croissance est meilleure. Ceci se traduit finalement par une meilleure assimilation de l'APA.

→ Les termes de maintenance :

Une augmentation du terme de maintenance du glucose provoque une diminution de la croissance et une augmentation de son assimilation, en revanche les consommations des peptides et l'APA diminuent. Lorsque la maintenance est forte, le glucose est certes plus consommé mais pas pour la croissance. La maintenance des ions ammonium a le même type d'influence en culture semi-continue. En réacteur discontinu, ce substrat étant faiblement consommé, sa maintenance n'a pas d'influence sur les variables d'état. La maintenance de l'APA n'a pas le même type d'influence. Une augmentation de ce paramètre entraîne une croissance et une consommation des substrats plus importantes. En effet, l'APA est consommé plus vite, l'inhibition de la consommation du glucose par l'inducteur disparaît plus rapidement.

Remarques :

- La variation de la biomasse en début de fermentation est souvent très élevée car les concentrations sont faibles et donc  $(\Delta X/X)$  est important. Lorsque la concentration en substrat devient nulle la variation de cette concentration est très importante : dans la formule  $\Delta S/S$ ,  $S$  tend vers 0. De ce fait l'influence maximum d'un paramètre sur un substrat se situe au moment de la fermentation où il est épuisé.

- Pour les paramètres K et  $\alpha$  il n'y pas d'analyse de sensibilité car ils ont été fixés préalablement en fonction de certains critères.

Les paramètres ne sont pas tous aussi sensibles en culture discontinue qu'en semi-continu, et la sensibilité diffère selon le temps de fermentation considéré. Les paramètres du modèle, mis à part les termes de maintenance pour le glucose et les ions ammonium, ont un effet contraire sur la croissance et la consommation des substrats. Une augmentation du terme de maintenance du glucose ou des ions ammonium se traduit par une production plus faible de biomasse car l'assimilation de ce substrat non liée à la croissance est plus importante. Lorsque le terme de maintenance de l'APA est augmenté, l'APA est plus rapidement épuisé, la consommation du glucose est moins longtemps inhibée, favorisant ainsi la croissance. Certains paramètres sont influents sur les acides aminés et les peptides alors qu'ils ne le sont pas globalement sur la peptone. La fraction non assimilable de la peptone, insensible à tous les paramètres, masque les variations des concentrations en acides aminés et en peptides. La consommation de la peptone est sensible aux paramètres qui lui sont directement associés ( $\gamma_{AA}^{max}$ ,  $\gamma_{PE}^{max}$  et  $Y_{X/PEP}$ ). Cette étude fournit une quantité importante d'informations qualitatives permettant de déterminer clairement les relations qui lient les paramètres aux variables d'état du modèle. Nous complétons cette première étude par une analyse quantitative de la sensibilité de la biomasse aux paramètres du modèle.

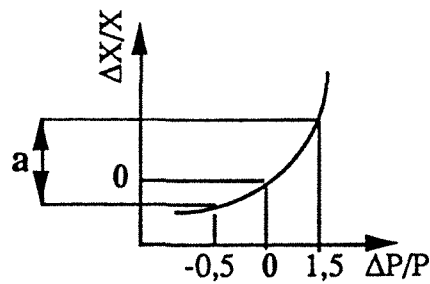
#### *II.2.4. - Analyse de la sensibilité de la croissance aux paramètres du modèle*

Dans cette partie, nous détaillons l'influence des paramètres sur la croissance. Cette étude nous permettra d'ajuster les paramètres à partir des cinétiques de croissance. Ensuite les simulations des cinétiques de consommation des substrats sont améliorées en utilisant la précédente étude qui permet d'anticiper les réactions du modèle en fonction des variations des paramètres.

##### *II.2.4.1. - Modification de la précédente méthode*

Dans cette étude, nous voulons quantifier l'influence des paramètres sur la biomasse afin de déterminer quels sont les paramètres influents sur la croissance, à quels moments de la fermentation cette variable d'état est la plus sensible, et comparer la sensibilité de la biomasse aux différents paramètres.

Les courbes précédentes  $\Delta X/X = f(\Delta P/P)$  exprimant la variation de la biomasse en fonction de la variation du paramètre P, sont utilisées pour calculer la sensibilité de la biomasse pour chaque paramètre (voir schéma ci-dessous).

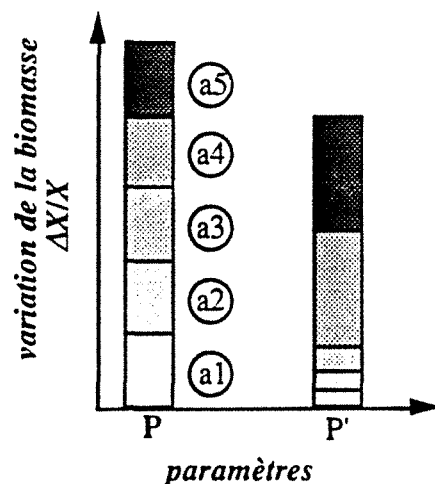


Pour chaque paramètre et chaque temps d'étude, la sensibilité de la biomasse est évaluée par l'amplitude de la variation de cette variable d'état due à une variation donnée et constante du paramètre. En effet, afin de pouvoir comparer les résultats, l'amplitude de variation du paramètre ( $\Delta P/P$ ) est fixée et constante quel que soit le paramètre étudié. Nous prenons  $-0,5 < \Delta P/P < 1,5$ , c'est-à-dire  $P_0/2 < P < 2,5.P_0$  ( $P_0$  est la valeur initiale du paramètre  $P$ ). Nous choisissons cet intervalle de façon à ce que la majorité des variables d'état soient sensibles à chacun des paramètres.

Exemple du calcul de la sensibilité de la biomasse à un paramètre  $P$  (voir schéma ci-dessus):

Pour un paramètre  $P$  et une heure d'étude donnée, nous attribuons à la biomasse une sensibilité  $a$ . Plus  $a$  est importante plus la variable d'état est dite sensible à  $P$ . Ce même calcul est fait pour chaque temps d'étude. Les valeurs absolues des sensibilités obtenues pour chaque paramètre et chaque temps d'étude sont reportées sur des graphes en fonction des paramètres (utilisation de cette représentation pour les figures E 9, culture discontinue, et E 11, culture semi-continue, qui seront exploitées plus loin).

Par exemple pour le paramètre  $P$  nous obtenons une sensibilité de la biomasse évaluée par  $a_1, a_2, a_3, a_4$  et  $a_5$ , correspondants respectivement aux temps d'étude de 5, 10, 15, 20 et 25 heures. Ces valeurs sont reportées sur la graphe de la façon suivante.





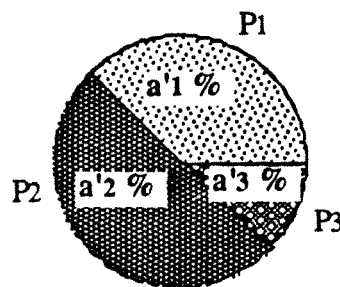
La valeur  $a_1$  représente la sensibilité de la biomasse à la 5ème heure alors que  $\sum a_i$  représente la sensibilité totale de la biomasse au paramètre P durant toute la fermentation.

Ces figures rendent compte de :

- i - l'influence globale de chaque paramètre sur la biomasse durant toute la fermentation (elle permet de déterminer quels sont les paramètres importants en fermentations discontinue et semi-continue) ;
- ii - l'influence de chaque paramètre au cours du temps.

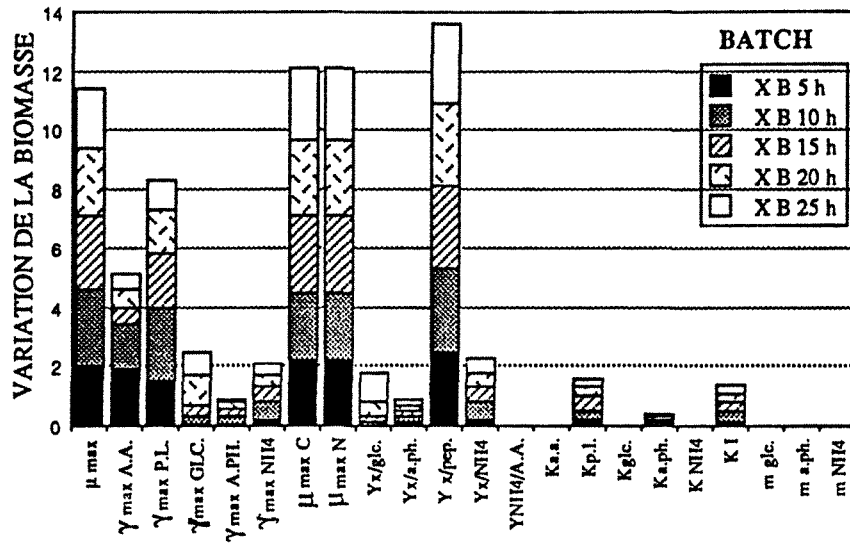
Un paramètre est très influent s'il a une ordonnée importante. Cette figure n'indique pas les sens de variation, cette information est donnée par l'étude qualitative précédente (Tab. E 3).

D'autre part, nous utilisons un autre type de représentation (schéma ci-dessous) qui rend compte à un instant donné (Fig. E 10 et 12), de l'importance relative des paramètres les plus influents sélectionnés à l'aide des graphes précédents (figures E 9 et 11). Par exemple s'il y a trois paramètres importants  $P_1$ ,  $P_2$  et  $P_3$  auxquels correspondent des sensibilités de la biomasse de  $a_1$ ,  $a_2$  et  $a_3$ .



Nous exprimons  $a_1$ ,  $a_2$  et  $a_3$  en pourcentage par rapport à la somme  $a_1 + a_2 + a_3$ , nous obtenons respectivement les valeurs  $a'_1\%$ ,  $a'_2\%$  et  $a'_3\%$ . Cette figure complète les informations apportées par la représentation précédente, elle permet de suivre l'évolution de la population des paramètres importants au cours du temps : certains paramètres gagnent de l'importance au détriment d'autres.

Nous analysons maintenant ces différents graphes construits avec les valeurs correspondant à l'analyse de sensibilité de la biomasse aux paramètres du modèle en cultures discontinue et semi-continue. Les paramètres  $\alpha$ ,  $K$  n'ont pas de signification "biologique", ils ne sont donc pas étudiés.



**Figures E 9** : Influence des paramètres du modèle sur la biomasse, en culture discontinue pour 5 temps d'étude (5ème, 10ème, 15ème, 20ème et 25ème heure).

#### II.2.4.2. - Résultat de l'analyse de la sensibilité de la croissance aux paramètres du modèle en fermentation discontinue

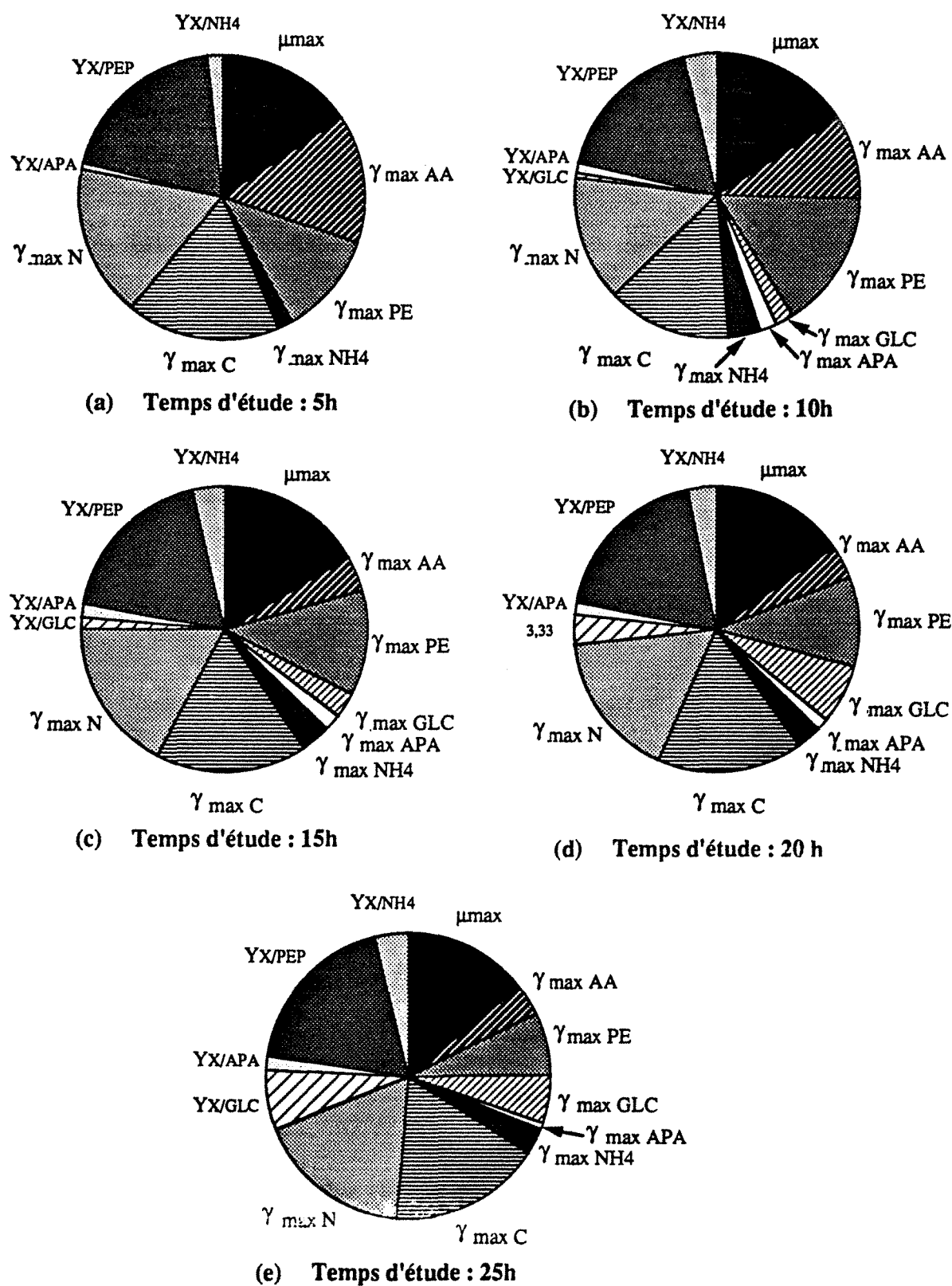
Nous analysons dans un premier temps le graphe représentant l'influence des paramètres sur la biomasse au cours de la culture discontinue. Nous complétons cette analyse par l'exploitation de la représentation en "camembert", qui permet de suivre la variation de l'influence relative des paramètres importants.

➔ La **figure E 9** permet d'évaluer l'influence des paramètres sur la concentration en biomasse à différents temps d'une fermentation discontinue. Le taux maximum de croissance, les vitesses spécifiques maximum de consommation de C et N ainsi que le rendement de conversion de la peptone en biomasse sont très influents durant toute la fermentation quel que soit le temps d'étude. La vitesse spécifique maximum de consommation des acides aminés est influente surtout pendant les premières heures de la fermentation (5 et 10 heures). La biomasse est sensible à la vitesse spécifique maximum de consommation des peptides surtout pour les temps d'étude 10 et 15 heures. La sensibilité de la biomasse à la vitesse spécifique maximum de consommation de l'APA est globalement faible, et nulle à 5 et 25 heures. La vitesse spécifique maximum de consommation du glucose est influente sur la biomasse surtout en fin de culture (20 et 25 heures). L'influence des rendements de conversion de glucose et d'APA en biomasse sont semblables respectivement à celles des vitesses spécifiques maximum de consommation du glucose et de l'APA. Le rendement de conversion des ions ammonium en biomasse n'est pas influent sur la croissance en début de fermentation. La constante d'affinité des peptides est importante surtout à la 15<sup>ème</sup> heure. La constante d'affinité de l'APA a une très faible influence en début de culture alors qu'elle est non négligeable à partir de la 10<sup>ème</sup> heure. La biomasse n'est pas sensible aux autres paramètres.

Les paramètres les plus influents sont les vitesses spécifiques maximum de croissance et de consommation des substrats ainsi que leur rendement de conversion en biomasse. L'analyse des représentations en "camembert" complète la précédente étude dans la mesure où elle met en évidence une évolution de la population des paramètres les plus influents c'est-à-dire que certains apparaissent au cours du temps au détriment d'autres dont l'influence diminue.

➔ La **figure E 10 (a, b, c, d et e)** rend compte de l'évolution au cours d'une culture discontinue de l'importance relative des paramètres parmi ceux qui sont les plus influents.

→ A 5 heures (**Fig. E 10 a**) les paramètres influents sont le taux de croissance maximum, les vitesses spécifiques maximum de consommation des acides aminés, des peptides, de C et N ainsi que le rendement de conversion de la peptone en biomasse. La vitesse spécifique maximum de



**Figure E 10 :** Evolution au cours du temps de l'importance relative des paramètres du modèle les plus influents sur la biomasse (culture discontinue).

➤ Temps d'étude : 5ème heure (a), 10ème heure (b), 15ème heure (c), 20ème heure (d), 25ème (e).

consommation des ions ammonium ainsi que les rendements de conversion en biomasse de l'APA et des ions ammonium sont représentés par un faible pourcentage.

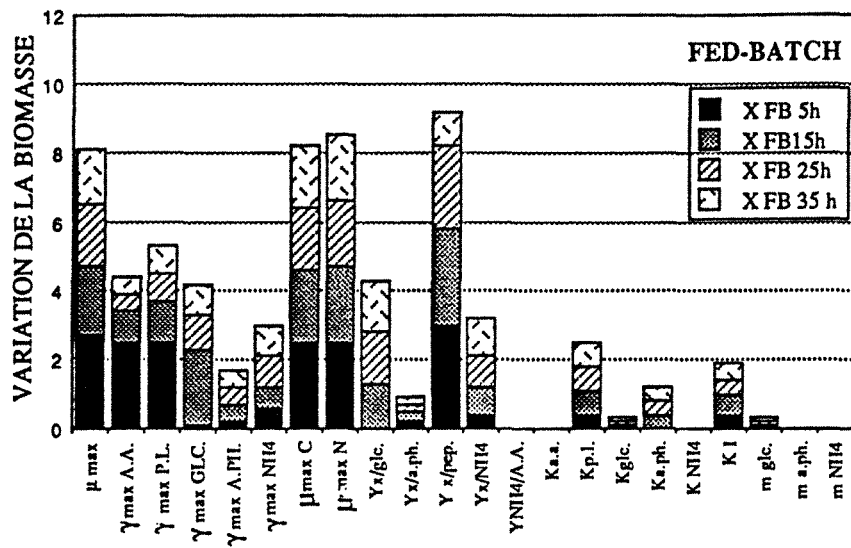
→ A 10 heures (Fig. E 10 b), l'influence de ces 3 paramètres précédemment cités ( $\gamma_{\text{NH}_4}^{\text{max}}$ ,  $Y_{\text{X}/\text{APA}}$  et  $Y_{\text{X}/\text{NH}_4}$ ) augmente. Les vitesses spécifiques maximum de consommation du glucose et de l'APA absentes de la figure E 10 a, apparaissent sur la figure E 10 b. Les paramètres les plus influents sont toujours les mêmes ( $\mu^{\text{max}}$ ,  $\gamma_{\text{AA}}^{\text{max}}$ ,  $\gamma_{\text{PE}}^{\text{max}}$ ,  $\mu_{\text{C}}^{\text{max}}$ ,  $\mu_{\text{N}}^{\text{max}}$  et  $Y_{\text{X}/\text{PEP}}$ ). Le rendement de conversion du glucose en biomasse est toujours très peu influent.

→ A 15 heures (Fig. E 10 c), la vitesse spécifique maximum de consommation des acides aminés perd de l'importance alors que le rendement de conversion du glucose en biomasse en gagne.

→ A 20 heures (Fig. E 10 d), la vitesse spécifique maximum de consommation des peptides perd à son tour de l'influence alors que celle du glucose et le rendement de conversion du glucose en biomasse sont de plus en plus influents.

→ A 25 heures (Fig. E 10 e), la sensibilité de la biomasse aux vitesses spécifiques maximum de consommation des acides aminés et des peptides est faible. La vitesse spécifique maximum de l'APA n'apparaît plus sur la figure alors que le rendement de conversion du glucose en biomasse est encore plus important.

Lorsque les peptides ou l'APA deviennent limitants, leur constante d'affinité sont alors influentes, surtout pour  $K_{\text{PE}}$  qui est beaucoup plus élevée de  $K_{\text{APA}}$ . Pour les acides aminés, la sensibilité est différente car  $K_{\text{AA}}$  est très faible. En effet, lorsque la concentration en acides aminés est limitante, la vitesse spécifique de consommation de ce substrat est nulle. Jusqu'à la 15ème heure de fermentation, les vitesses spécifiques maximum de consommation des acides aminés et des peptides ainsi que le rendement de conversion de la peptone en biomasse ( $Y_{\text{X}/\text{PEP}}$ ) ont une forte influence sur la croissance, car ces substrats sont consommés durant cette période. La constante d'affinité des ions ammonium ( $K_{\text{NH}_4^+}$ ) n'a pas d'influence sur la croissance car ce substrat n'est jamais limitant durant les cultures. Une variation de  $K_{\text{I}}$  entraîne donc une variation de la consommation du glucose qui se répercute sur la croissance. De ce fait, la biomasse est sensible à  $K_{\text{I}}$  entre la 10ème et la 15ème heure de fermentation, pendant la phase de consommation du glucose. Les termes de maintenance ne sont pas des paramètres influents. En effet, en culture discontinue, les cellules sont pratiquement toujours en croissance, la consommation des substrats pour la maintenance est donc négligeable.



**Figures E 11** : Influence des paramètres du modèle sur la biomasse, en culture semi-continue pour 4 temps d'étude ( 5ème, 15ème, 25ème et 35ème heure).

Dans le groupe des paramètres importants apparaissent en cours de fermentation ceux qui sont liés à l'APA ( $\gamma_{\text{APA}}^{\text{max}}$  et  $Y_{\text{X/APA}}$ ) et au glucose ( $\gamma_{\text{GIC}}^{\text{max}}$  et  $Y_{\text{X/GLC}}$ ). Puis, à partir de la 20ème heure de fermentation, les paramètres caractérisant la consommation de l'APA deviennent eux moins influents : la biomasse est sensible aux paramètres de l'APA lorsque ce substrat est consommé (avant la 20ème heure). Il en va de même pour le glucose qui est assimilé après l'APA. De la même façon, les paramètres caractérisant les cinétiques de consommation des acides aminés et des peptides perdent de l'influence au cours du temps.

Le taux de croissance maximum ( $\mu_{\text{max}}$ ), les vitesses spécifiques maximum de consommation du carbone et de l'azote ( $\mu_{\text{C}}^{\text{max}}$  et  $\mu_{\text{N}}^{\text{max}}$ ) sont trois paramètres très importants durant toute la fermentation, car la croissance est directement proportionnelle à ces paramètres. Le taux de croissance maximum ( $\mu_{\text{max}}$ ) a une influence qui diminue légèrement au cours du temps, dans la mesure où la biomasse est surtout sensible au taux de croissance maximum ( $\mu_{\text{max}}$ ) pendant la phase exponentielle, le taux de croissance  $\mu$  est alors peu différent de  $\mu_{\text{max}}$ .

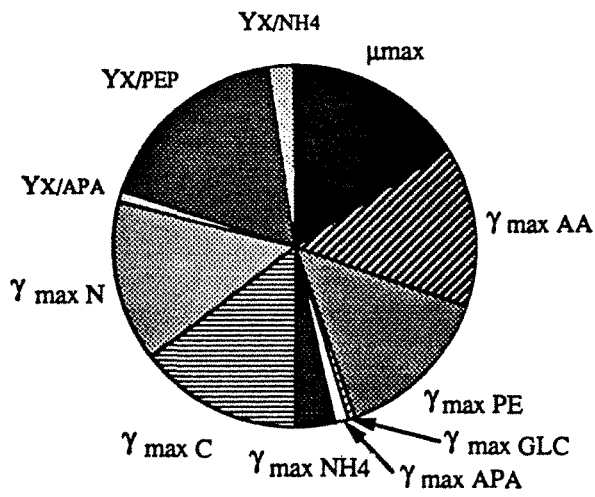
#### Remarques

- Le rendement de la peptone a une forte influence durant toute la fermentation car ce paramètre intervient dans deux expressions mathématiques du modèle : il est employé dans l'expression des vitesses spécifiques de consommation du carbone et de l'azote ( $\mu_{\text{C}}$  et  $\mu_{\text{N}}$ ).
- La quantité d'ions ammonium produite liée au rendement  $Y_{\text{NH}_4^+/\text{AA}}$  n'a pas d'influence sur la croissance dans la mesure où les ions ammonium ne sont pas limitants.

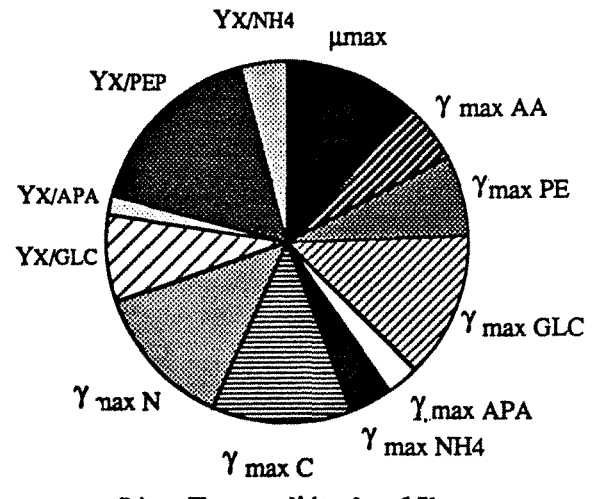
#### II.2.4.3. - Résultat de l'analyse de la sensibilité de la croissance aux paramètres du modèle en fermentation semi-continue

Comme précédemment les deux types de graphes obtenus en étudiant la sensibilité de la biomasse aux paramètres du modèle sont analysés.

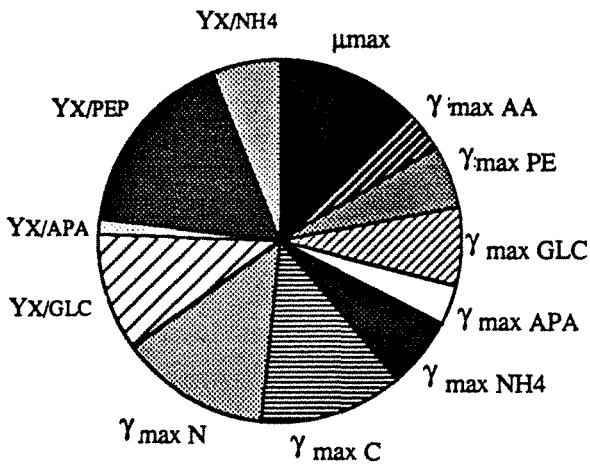
➔ Nous avons reporté sur la **figure E 11** le pourcentage de variation de la concentration en biomasse pour chaque paramètre et à chaque temps d'étude. Nous constatons que les vitesses spécifiques maximum de consommation du glucose, de l'APA et des ions ammonium ont une influence globale sur la fermentation plus importante qu'en culture discontinue. La vitesse spécifique maximum de consommation du glucose est influente à partir de la 15ème heure, alors que celle de l'APA et des ions ammonium est constante durant toute la durée de la fermentation. Le



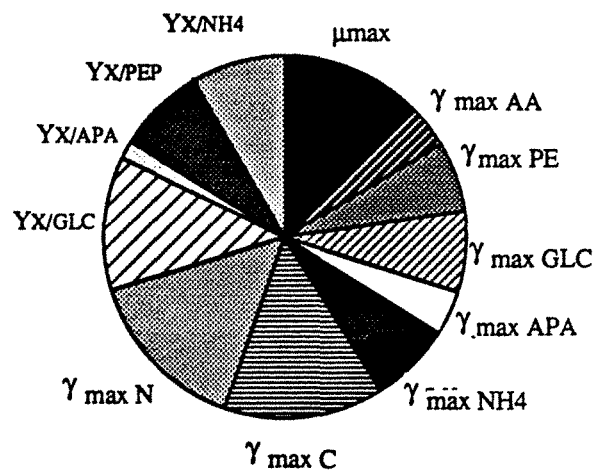
(a) Temps d'étude : 5h



(b) Temps d'étude : 15h



(c) Temps d'étude : 25h



(d) Temps d'étude : 35h

**Figure E 12 :** Evolution au cours du temps de l'importance relative des paramètres du modèle les plus influents sur la biomasse (culture semi-continue).

➤ Temps d'étude : 5ème heure (a), 15ème heure (b), 25ème heure (c), 35ème heure (d).



rendement de conversion du glucose en biomasse devient influent à partir de la 15<sup>ème</sup> heure, la croissance est beaucoup plus sensible à ce paramètre en culture semi-continue. Les rendements de conversion de l'APA et des ions ammonium en biomasse ont pris de l'importance par rapport à la culture en réacteur discontinu. En culture semi-continue, la biomasse est sensible à la constante d'affinité et la maintenance du glucose. Les constantes d'affinité de peptides et de l'APA ainsi que la constante d'inhibition sont plus importantes au cours d'une fermentation semi-continue.

Le taux de croissance maximum, les vitesses spécifiques maximum de consommation des acides aminés, des peptides, de C et de N ainsi que le rendement de conversion de la peptone en biomasse sont toujours influents durant toute la fermentation. En revanche, la croissance est comme en culture discontinu insensible aux 3 paramètres liés aux ions ammonium qui sont  $K_{NH_4^+}$ ,  $m_{NH_4^+}$  et  $Y_{NH_4^+/AA}$ , ainsi qu'à la constante d'affinité des acides aminés ( $K_{AA}$ ) et au terme de maintenance en APA ( $m_{AA}$ ).

L'étude des différents paramètres influents, est réalisée de la même façon que précédemment.

→ la figure E 12 (a, b, c et d) rend compte de l'évolution de l'importance relative des paramètres influents pour une culture semi-continue. Nous comparerons les résultats obtenus avec ce mode de culture et ceux obtenus en réacteur discontinu (Fig. E 10 a, b, c, d et e).

→ En début de fermentations semi-continue et discontinu, la répartition des paramètres influents sont semblables puisque l'alimentation est déclenchée à la 10<sup>ème</sup> heure (Fig. E 12 a et E 10 a).

→ A la 15<sup>ème</sup> heure (Fig. E 12 b), la vitesse spécifique maximum de consommation du glucose et le rendement de conversion de ce substrat en biomasse sont représentés par un pourcentage important qui est supérieur aux valeurs obtenues en réacteur discontinu (Fig. E 10 c). Les vitesses spécifiques maximum de consommation des acides aminés et des peptides ont perdu de l'influence par rapport au début de la fermentation. En revanche, la vitesse spécifique maximum de consommation de l'APA et les rendements de conversion de l'APA et des ions ammonium en biomasse ont pris de l'importance.

→ A la 25<sup>ème</sup> heure, les paramètres influents sont les mêmes qu'à la 20<sup>ème</sup> heure. Les rendements de conversion du glucose et de l'APA en biomasse et les vitesses spécifiques maximum de consommation de ces 2 substrats représentent des pourcentages plus élevés en culture semi-continue qu'en culture discontinu (Fig. E 12 c et E 10 e). De ce fait, les paramètres très influents en fermentation discontinu ( $\mu_{max}$ ,  $\mu_{Cmax}$ ,  $\mu_{Nmax}$  et  $Y_{X/PEP}$ ) sont représentés par des pourcentages plus élevés qu'en culture semi-continue.

→ Entre la 35ème et la 25ème heure, l'importance relative des paramètres les plus influents est la même (Fig. E 12 c et d).

En culture semi-continue, les conditions de limitation pour certains substrats sont atteintes, leurs constantes d'affinité deviennent donc des paramètres influents, sauf pour  $K_{AA}$  et  $K_{NH_4^+}$  pour les raisons citées précédemment. D'autre part, la diminution de l'influence du taux de croissance maximum en cours de fermentation est confirmée en culture semi-continue. A partir de la 35ème heure de culture, la modification de la croissance en début de la fermentation a été atténuée par d'autres phénomènes qui ont un effet contraire. Une amélioration de la croissance se traduit par une consommation plus rapide en début de culture d'un substrat qui ainsi devient limitant pour la croissance plus précocement. La maintenance du glucose est pour ce mode de culture un paramètre influent en fin de fermentation. A ce moment là, la consommation de ce substrat non lié à la croissance n'est plus négligeable comme en culture discontinue, car le taux de croissance est faible.

L'importance relative des paramètres influents en fermentation semi-continue évolue au cours du temps. A la 25ème heure, les vitesses spécifiques maximum de consommation du glucose, de l'APA et des ions ammonium ( $\gamma_{GLC}^{max}$ ,  $\gamma_{APA}^{max}$  et  $\gamma_{NH_4^+}^{max}$ ) ainsi que leur rendement de conversion en biomasse sont plus influents en culture semi-continue par rapport au discontinu. C'est le contraire pour les vitesses spécifiques maximum de consommation des acides aminés et des peptides ( $\gamma_{AA}^{max}$  et  $\gamma_{PE}^{max}$ ). D'autre part, les vitesses spécifiques maximum de consommation de C et N, le taux de croissance maximum et le rendement de conversion de la peptone en biomasse sont moins influents en culture semi-continue. L'alimentation contenant du glucose, de l'APA et des ions ammonium, les paramètres liés à ces substrats ont une influence sur la croissance qui persiste pendant toute la fermentation. En cultures semi-continues contrairement aux discontinues, les vitesses spécifiques de consommation de l'APA, du glucose et des ions ammonium demeurent importantes. De ce fait, en culture semi-continue, les paramètres caractérisant les cinétiques de consommation de ces trois substrats gagnent de l'importance parmi les paramètres influents au détriment des 4 paramètres clefs ( $\mu^{max}$ ,  $\mu_C^{max}$ ,  $\mu_N^{max}$  et  $Y_{X/PEP}$ ).

Remarque :

-  $m_{APA}$  et  $m_{NH_4^+}$  n'ont pas d'influence sur la biomasse. Cette conclusion est en contradiction avec les résultats du tableau E 3. Dans ce tableau, la variation des paramètres est adaptée de façon à obtenir une modification des variables d'état et entre autre de la concentration en biomasse. En fait,

la maintenance des ions ammonium et de l'APA agissent en sens inverse par rapport à celle du glucose (Tab. E 3). Ces deux études sont effectivement complémentaires.

### *II.2.5. - Conclusion*

Cette étude de sensibilité permet de mettre en évidence les relations existant entre d'une part les paramètres et les variables d'état et les variables d'état entre elles. Cette étude permet de situer pour tous les paramètres du modèle, les conditions expérimentales et/ou les périodes d'une fermentation pour lesquelles ils ont une influence maximum.

En effet, les paramètres liés à la consommation d'un seul substrat sont influents lorsque celui-ci est consommé. Aussi, l'ajustement de ces paramètres peut être réalisé en choisissant les fermentations en fonction de la composition du milieu de culture. Par exemple, pour ajuster les paramètres liés à la consommation de la peptone il est souhaitable de choisir les résultats expérimentaux de la fermentation E dont le milieu de culture ne contient que ce substrat.

D'autre part, il est possible de faire une analyse de l'influence des paramètres en fonction de la période de la fermentation.

#### Entre le début de la fermentation et la 5ème heure

Les paramètres importants en cultures semi-continue et discontinue sont :  $\mu_{\max}$ ,  $\gamma_{AA}^{\max}$ ,  $\gamma_{PE}^{\max}$ ,  $\mu_C^{\max}$ ,  $\mu_N^{\max}$ ,  $Y_{X/PEP}$  c'est-à-dire tous les paramètres liés aux substrats consommés durant cette période de la fermentation

#### Entre la 10ème et la 15ème heure de fermentation

Les paramètres importants sont les mêmes que précédemment auxquels s'ajoute ceux qui sont liés aux substrats consommés pendant cette phase de la culture :  $\gamma_{GIC}^{\max}$ ,  $\gamma_{APA}^{\max}$ ,  $\gamma_{NH_4^+}^{\max}$ ,  $Y_{X/GLC}$ ,  $Y_{X/APA}$ ,  $Y_{X/NH_4^+}$  et  $K_I$ . Le paramètre  $K_I$  est influent lorsque l'APA est assimilé. L'inhibition de la consommation du glucose par l'inducteur dépend de  $K_I$  et de la concentration en APA. En fermentation semi-continue, les constantes d'affinité des substrats limitants pour la croissance (glucose, APA et peptides), deviennent des paramètres influents sur la concentration en biomasse.

#### Entre la 25ème et la 35ème heure de fermentation

En fermentation discontinue, la biomasse est sensible aux mêmes paramètres. Cependant les



plus influents sont les paramètres liés aux substrats consommés qui, comme le glucose, ne sont pas encore épuisés. En culture semi-continue, les substrats contenus dans l'alimentation ont une influence qui se prolonge pendant toute la fermentation, la biomasse devient plus sensible aux maintenances. Ces paramètres modifient directement la consommation des substrats concernés, et agissent donc indirectement sur la croissance. Une fermentation semi-continue est plus appropriée pour ajuster les valeurs des maintenances ou de certaines constantes d'affinité, comme par exemple la constante d'affinité de l'APA ( $K_{APA}$ ).

Connaissant les paramètres influents, nous pouvons à un temps donné de la fermentation corriger la simulation de la croissance et par déduction celle des substrats.

### II.3.- Application de l'analyse de sensibilité : deuxième estimation des paramètres

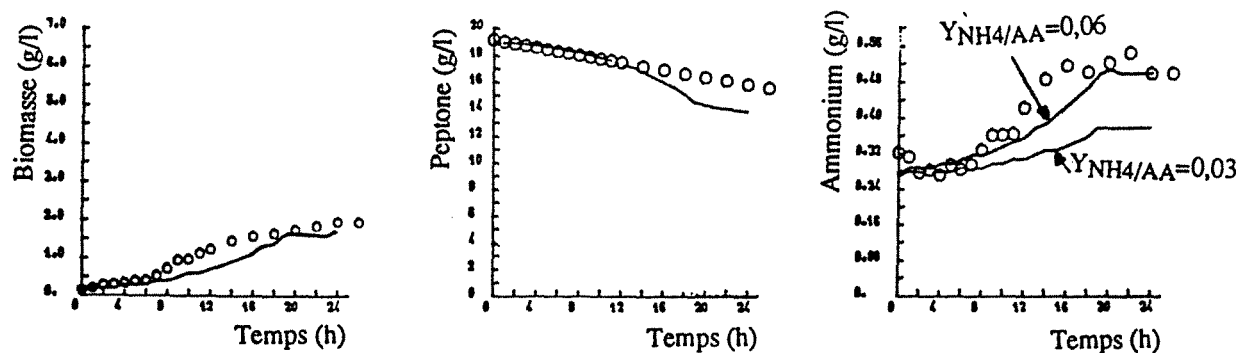
L'analyse de sensibilité que nous venons d'effectuer est utilisée dans cette partie pour ajuster les valeurs des paramètres : nous obtiendrons ainsi une deuxième estimation des paramètres. En effet cette étude nous a permis de déterminer les relations existantes entre les variables d'état et les paramètres. Ainsi, selon la modification que nous voulons apporter à la courbe représentant la simulation de la variation d'une variable d'état, nous connaissons l'ensemble des paramètres influents sur lesquels il faut agir. De plus ayant déterminé le moment de la culture où l'influence des paramètres est maximale, le nombre de paramètres sur lesquels il est possible d'agir est réduit, la courbe théorique peut être corrigée. La modification de la première estimation des paramètres est réalisée en deux principales étapes.

⇒ D'après le schéma d'élaboration des lois cinétiques du modèle, nous allons dans un premier temps, nous intéresser aux paramètres liés aux cinétiques de consommation des substrats. Nous considérons dans cette première partie les résultats généraux de l'analyse qualitative de la sensibilité des variables d'état aux paramètres du modèle. Pour cela, nous comparons les cinétiques réelles et théoriques des différentes fermentations E, F, G, H, J et K qui d'après la composition de leur milieu de culture permettent d'ajuster les paramètres liés aux consommations des substrats.

⇒ Ensuite nous utiliserons l'analyse quantitative de sensibilité effectuée sur la biomasse pour achever cette deuxième estimation des paramètres du modèle. Finalement nous ajustons les deux paramètres utilisés dans la loi cinétique de production de la PA.

#### *II.3.1.- Correction des cinétiques théoriques de consommation des substrats :*

Nous utilisons dans cette partie les résultats expérimentaux des fermentations E, F, G, H, J et K. La composition des milieux de culture pour chacune de ces fermentations est rappelée dans le

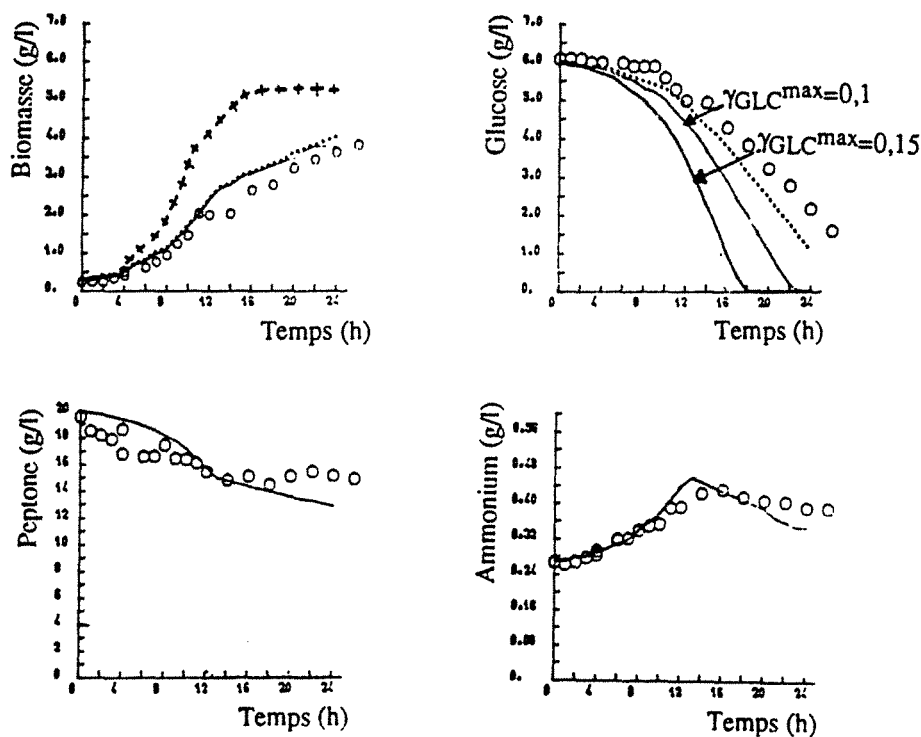


**Figure E 13 :** Résultats des simulations de la culture discontinue de la souche *E. coli* G271 sur un milieu ne contenant que de la peptone (E).

o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques

(a) : biomasse, (b) : peptone et (c) : ions ammonium ( $Y_{NH_4^+/AA} = 0,06$  et  $0,03$ ).

a | b | c



a | b  
c | d

**Figure E 14 :** Résultats des simulations de la culture discontinue de la souche *E. coli* G271 sur un milieu contenant de la peptone et du glucose (F).

o o o : valeurs expérimentales

(a) : biomasse (— :  $\gamma_{GLC} \max = 0,1h^{-1}, \dots$  :  $m = 0 h^{-1}$  et +++ :  $Y_{NH_4^+/AA} = 12$ ).

(b) : glucose (— :  $Y_{NH_4^+/AA} = 5$  et  $\gamma_{GLC} \max = 0,1$  ou  $0,15h^{-1}$ , ..... :  $m = 0 h^{-1}$ ,  $\gamma_{GLC} \max = 0,1h^{-1}$  et  $Y_{NH_4^+/AA} = 5$ , +++ :  $Y_{NH_4^+/AA} =$  et  $\gamma_{GLC} \max = 0,1$ ).

(c) : peptone (— : valeurs théoriques).

(d) : ions ammonium (— : valeurs théoriques).

**tableau E 4.** Nous commençons l'étude par les 4 fermentations discontinues. Ensuite nous exploiterons les données expérimentales des cultures semi-continues.

### II.3.1.1. - En réacteur discontinu

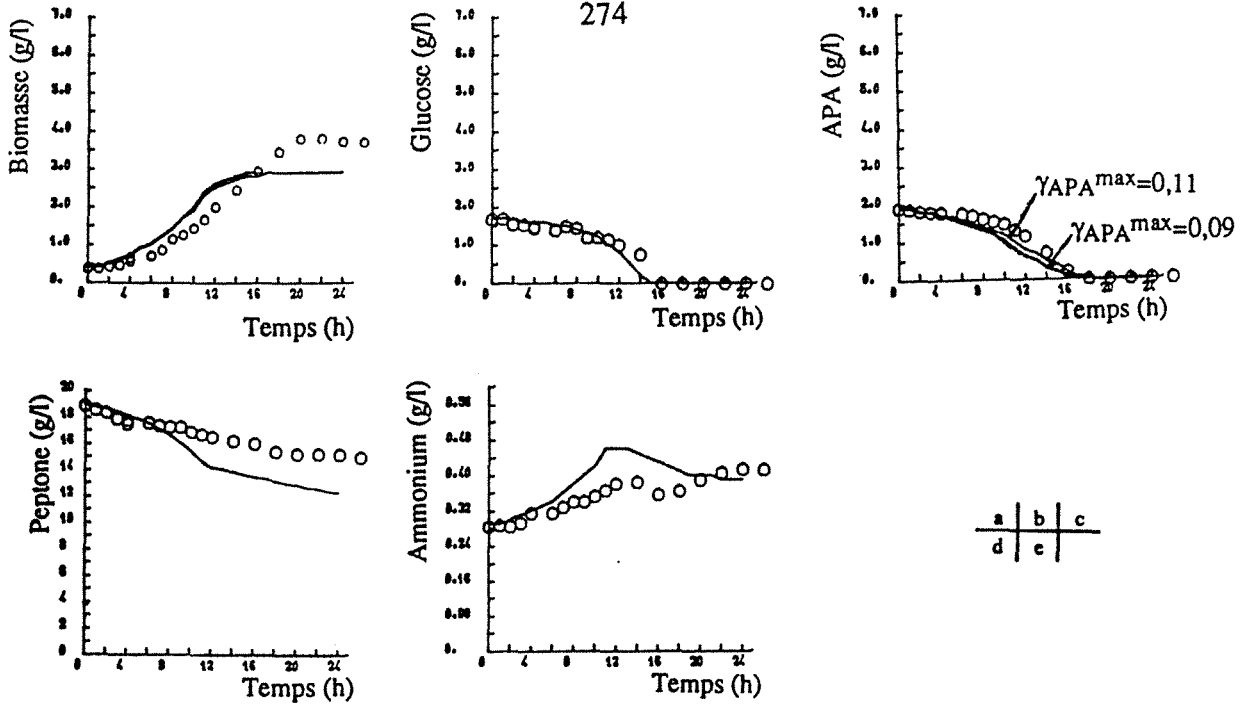
Les fermentations E, F, G et H (Tab. E 4) sont utilisées successivement pour ajuster les paramètres utilisés dans l'expression de la consommation de chaque substrat.

FERMENTATION	MODE DE CULTURE		COMPOSITION DES MILIEUX					
	discontinu	semi-continu	FERMENTATION			ALIMENTATION		
			peptone	glucose	APA	glucose	APA	ions NH <sub>4</sub>
E	+		+					
F	+		+	+				
G	+		+		+			
H	+		+	+	+			
J		+	+	+	+	+	+	+
K		+	+	+	+		+	

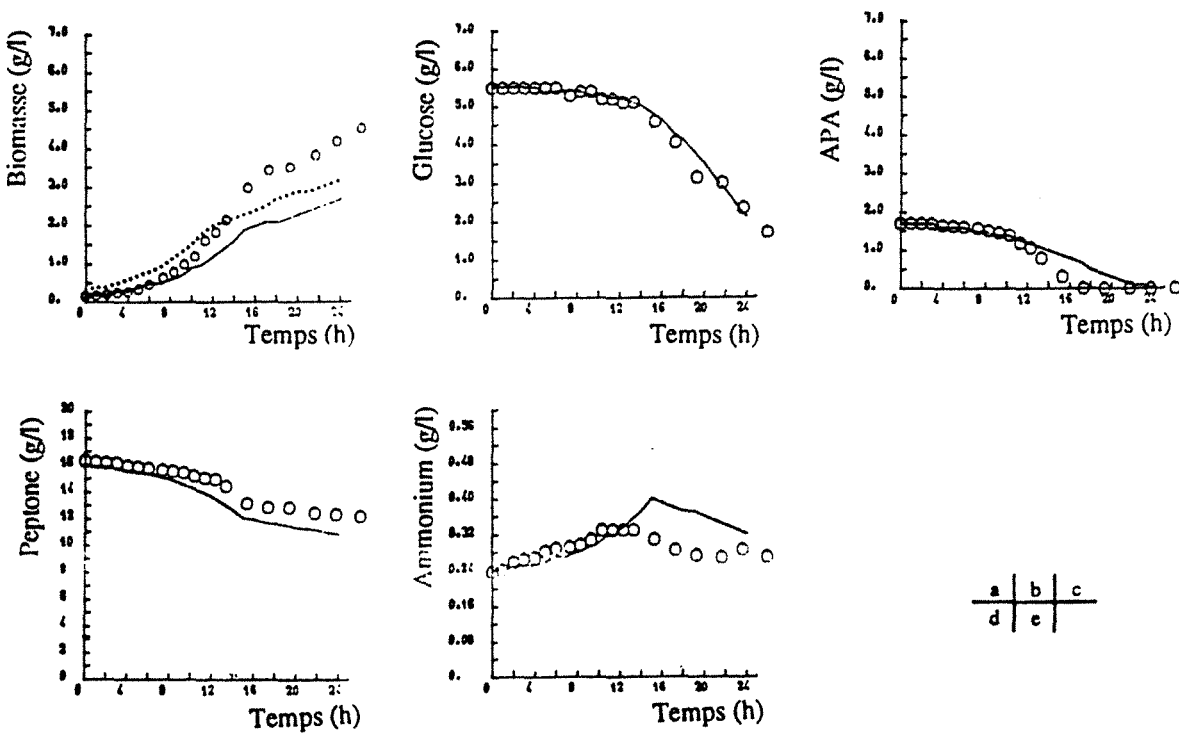
**Tableau E 4 :** Compositions des milieux de culture.

➔ La simulation des cinétiques de consommation des substrats de la fermentation E permet d'ajuster les paramètres des expressions mathématiques concernant la peptone et de la production des ions ammonium (dans ces conditions ils ne sont pas assimilés) : les confrontations des résultats théoriques et expérimentaux sont décrites par la **figure E 13 (a, b et c)**. Les courbes théoriques fournies par le modèle représentent correctement l'évolution des concentrations en biomasse et en peptone (**Fig. E 13 a et b**) au cours du temps. Pour les ions ammonium, dès la 6ème heure de culture, la concentration théorique est nettement plus faible que la valeur réelle. Les ions ammonium sont produits à partir des acides aminés. Donc pour modifier les résultats théoriques il faut augmenter soit  $\gamma_{AA}$  soit  $Y_{NH_4^+/AA}$ . Or la cinétique de consommation de la peptone obtenue par le modèle est correcte, le rendement de conversion des acides aminés en ions ammonium est augmentée de 0,03 à 0,06 g/g. Cette modification n'entraîne aucune modification des autres cinétiques dans la mesure où les ions ammonium ne sont pas consommés. La production des ions ammonium théorique est alors en accord avec les résultats expérimentaux (**Fig. E 13 c**).

➔ La fermentation F est utilisée afin d'ajuster les paramètres liés à la consommation du glucose. Les résultats théoriques et expérimentaux sont comparés sur la **figure E 14 (a, b, c et d)**. Les cinétiques théoriques de croissance et de consommation du glucose surestiment beaucoup les



**Figure E 15 :** Résultats des simulations de la culture discontinue de la souche *E. coli* G271 sur un milieu contenant de la peptone et de l'APA (G).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA ( $\gamma_{APA\ max} = 0,11$  et  $0,09\ h^{-1}$ ), (d) : peptone et (e) : ions ammonium.



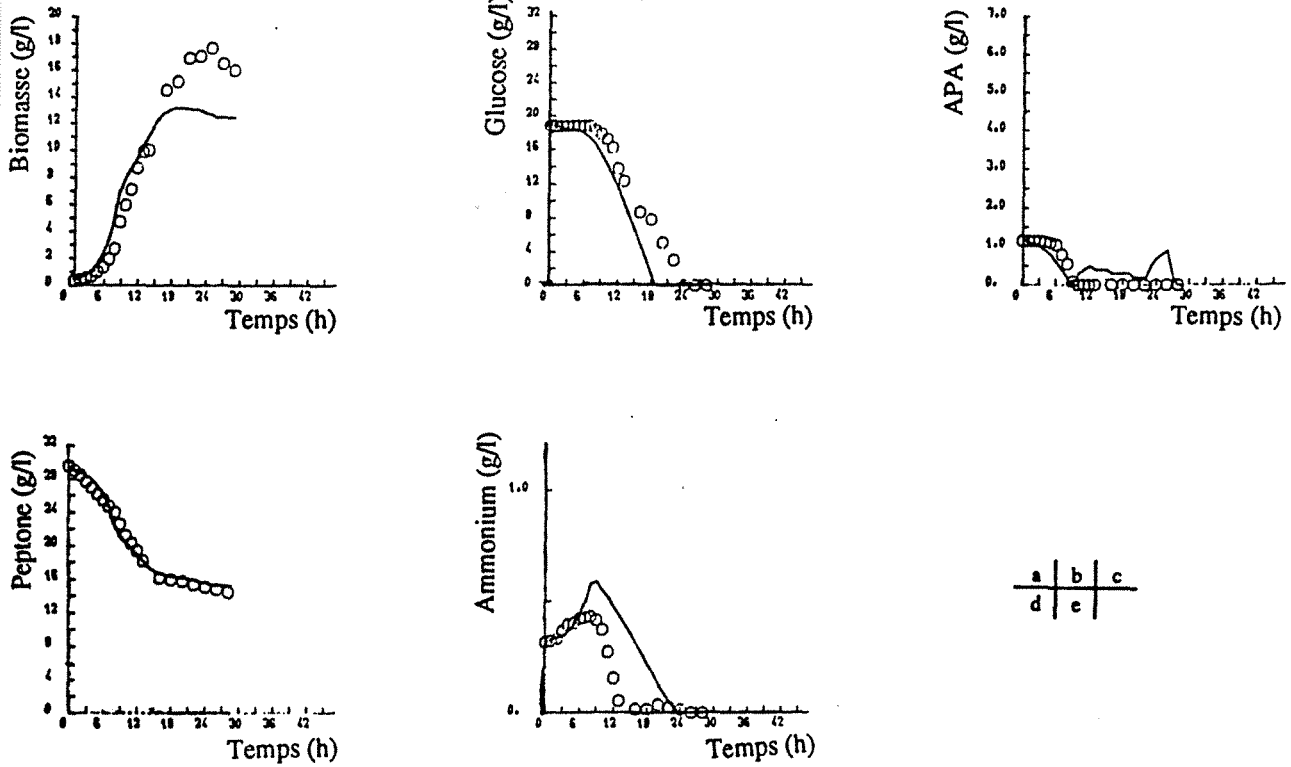
**Figure E 16 :** Résultats des simulations de la culture discontinue de la souche *E. coli* G271 sur un milieu standard (H).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse (..... : concentration initiale en biomasse  $X_0$  plus élevée), (b) : glucose, (c) : APA ,  
 (d) : peptone et (e) : ions ammonium.



valeurs expérimentales (Fig. E 14 a et b). Nous avons réduit la valeur de  $\gamma_{\text{GLC}}^{\text{max}}$  de 0,15 à  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , les simulations ainsi obtenues sont correctes (Fig. E 14 b). Cependant, la croissance théorique est encore trop forte. Nous pouvons diminuer soit le rendement de conversion en biomasse des ions ammonium ( $Y_{\text{X}/\text{NH}_4}$ ) soit celui du glucose ( $Y_{\text{X}/\text{GLC}}$ ). Les rendements de conversion en biomasse des acides aminés et des peptides sont corrects (cf fermentation E). La croissance est surestimée dès la 5ème heure de culture. Or d'après les résultats de l'analyse de sensibilité de la biomasse aux paramètres du modèle, nous constatons que  $Y_{\text{X}/\text{NH}_4}$  est plus influent durant cette période de la fermentation que  $Y_{\text{X}/\text{GLC}}$ . KOLE et coll. (1986) utilisent un rendement de 11 g/g sur milieu synthétique. La souche est cultivée sur milieu complexe, son métabolisme est très différent de celui mis en œuvre sur milieu synthétique. Les rendements calculés sont apparents, la souche assimile plusieurs substrats simultanément. Nous obtenons une simulation de la croissance acceptable pour une valeur de  $Y_{\text{X}/\text{NH}_4}$  égale à 5 g/l. Les cinétiques simulées et expérimentales des concentrations en biomasse, glucose, peptone et en ions ammonium sont voisines (Fig. E 14 a, b, c et d). Cependant le glucose en fin de fermentation est trop consommé à cause du terme de maintenance, qui prend de l'importance quand le taux de croissance est faible. Si nous annulons ce terme, la cinétique simulée de l'assimilation du glucose correspond beaucoup mieux à la courbe expérimentale, surtout en fin de fermentation (Fig. E 14 b).

➔ Les paramètres liés à la consommation de l'APA sont ajustés à l'aide de la fermentation G qui théoriquement ne contient pas de glucose. Cependant initialement, la concentration en sucre dans le réacteur est de 1,5 g/l, il est apporté par l'inoculum. Les résultats des simulations sont comparés aux résultats expérimentaux sur la figure E 15 (a, b, c, d et e). Les concentrations expérimentales et théoriques en biomasse, glucose, peptone et en ions ammonium sont proches (Fig. E 15 a, b, d et e). La consommation de l'inducteur étant trop rapide en début de fermentation (Fig. E 15 c), la valeur de  $\gamma_{\text{APA}}^{\text{max}}$  est diminuée de  $0,11 \text{ h}^{-1}$  à  $0,09 \text{ h}^{-1}$ . Ainsi la simulation de la fermentation G est acceptable (Fig. E 15). La croissance théorique s'arrête trop tôt, suite à une consommation rapide des substrats carbonés ( $\mu_{\text{C}} = 0$ ). Nous reviendrons plus loin sur ce problème.

➔ Les paramètres ajustés séparément pour chaque substrat sont finalement utilisés pour simuler les cinétiques de la fermentation H pour laquelle le milieu est complet. Les résultats sont décrits figure E 16 (a, b, c, d et e). Les cinétiques théoriques de consommation des substrats suivent convenablement les valeurs expérimentales (Fig. E 16 b, c, d et e). Cependant la croissance théorique est trop faible, la phase exponentielle obtenue par simulation est trop courte (Fig. E 16

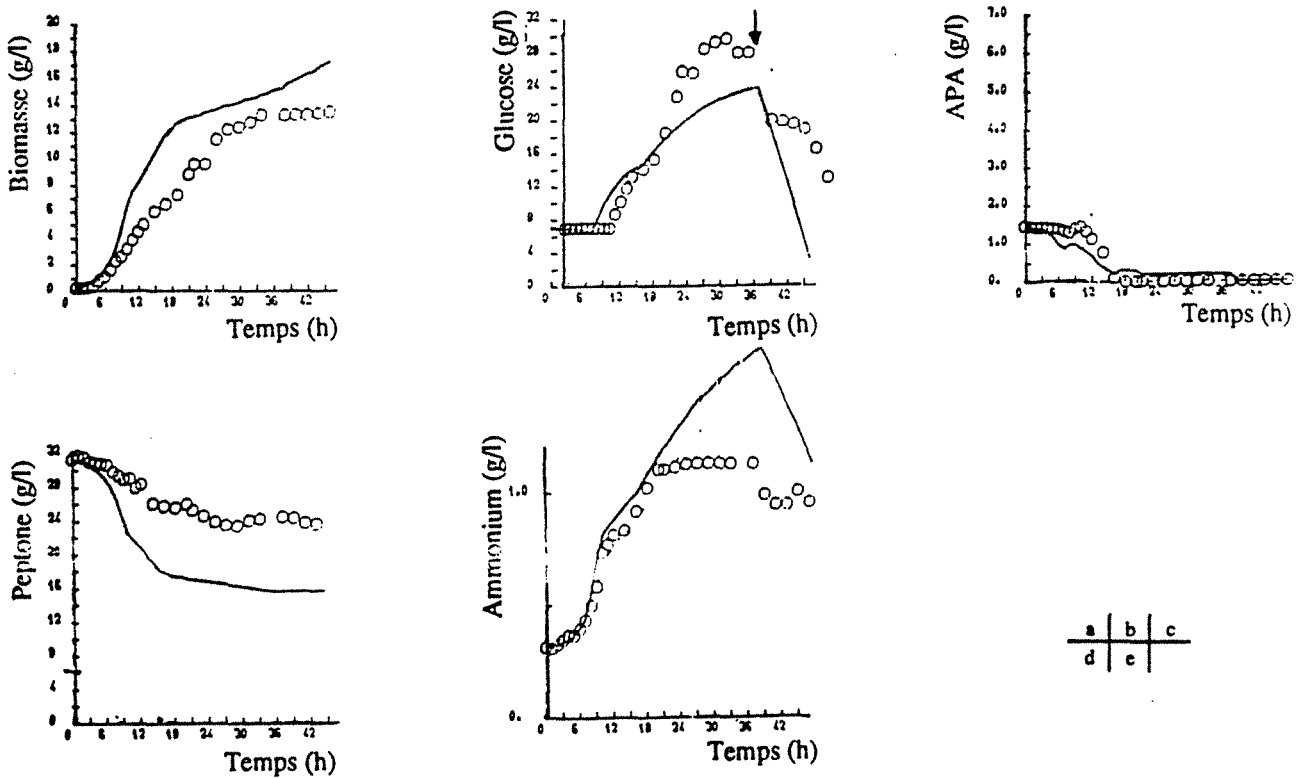


a	b	c
d	e	

**Figure E 17 :** Résultats des simulations de la culture semi-continue avec une alimentation en APA (K) de la souche *E. coli* G271.

o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques

(a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA , (d) : peptone et (e) : ions ammonium.



a	b	c
d	e	

**Figure E 18 :** Résultat des simulations de la culture semi-continue avec une alimentation mixte en glucose et APA (J) de la souche *E. coli* G271 (→ : arrêt de l'alimentation).

o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques

(a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA , (d) : peptone et (e) : ions ammonium.

a). Expérimentalement, la phase de latence a été longue comparée à celles des autres discontinus, car l'inoculation a été vraisemblablement trop faible. Or, dans le modèle, la phase de latence est exprimée par une vitesse de transition constante entre les cellules latentes et actives. La trop faible concentration en biomasse se traduit dans le modèle par une faible croissance (fig. E 16 a). La modélisation de la production de biomasse est améliorée en décalant la courbe simulée, de telle sorte que l'origine des temps pour la simulation corresponde à la 4ème heure de culture (fig. E 16 a). C'est-à-dire que la concentration initiale en biomasse pour la modélisation est égale à la concentration en biomasse à la 4ème heure de la fermentation H. Nous augmentons artificiellement la concentration initiale en biomasse.

Suite à cette série de simulations, nous constatons qu'en modifiant le milieu de culture, les cinétiques théoriques de consommation des substrats rejoignent les valeurs expérimentales. La croissance théorique est dans certains cas inférieure à la croissance réelle.

### II.3.1.2. - En réacteur semi-continu

Nous conservons les paramètres précédemment ajustés pour tester le modèle avec les cultures en réacteur semi-continu. Seul le taux de croissance maximum est augmenté à  $0,33 \text{ h}^{-1}$  (à cause de l'ajout de l'extrait de levure). Les résultats expérimentaux des fermentations J et K sont utilisés pour tester le modèle. Les compositions des milieux de fermentation sont donnés dans le tableau E 9.

➔ Les simulations des cinétiques de la fermentation K sont décrites par la figure E 17 (a, b, c, d et e). La cinétique de consommation de la peptone obtenue par simulation représente parfaitement les résultats expérimentaux (Fig. E 17 d). En revanche les évolutions des concentrations théoriques en APA et en ions ammonium sont surestimées par rapport aux valeurs expérimentales. (Fig. E 17 c et e). Pour le glucose, l'effet contraire est observé (Fig. E 17 b). La croissance théorique s'arrête à la 18ème heure au lieu de la 22ème heure expérimentalement (Fig. E 17 a). Cependant, nous pouvons considérer que les allures générales des courbes expérimentales sont respectées par le modèle.

➔ Les résultats des simulations obtenus pour la fermentation J sont représentés sur la figure E 18 (a, b, c, d et e). L'évolution de la concentration théorique en APA correspond aux valeurs expérimentales (Fig. E 18 c). Pour les autres substrats et la biomasse, les points théoriques ne se superposent pas aux valeurs expérimentales, mais l'allure générale est satisfaisante. D'après le modèle, la consommation des ions ammonium est trop lente alors que celle du glucose est trop rapide (Fig. E 18 b et e).



Les paramètres ajustés pour les cultures en réacteur discontinu permettent de décrire correctement l'allure des cinétiques des fermentations semi-continues. Dans cette partie, les substrats sont les principales variables d'état observées. Nous ne cherchons pas à obtenir un ajustement parfait entre les points expérimentaux car l'analyse des cinétiques de croissance va entraîner des modifications de certains paramètres qui se répercuteront sur les cinétiques de consommation des substrats.

### *II.3.2. - Analyse des cinétiques de croissance :*

Grâce à l'analyse de sensibilité de la biomasse, nous pouvons maintenant terminer l'étude des paramètres du modèle. Les cinétiques de consommation des substrats étant acceptables, nous allons ajuster les cinétiques de croissance.

Quatre paramètres sont très influents durant la fermentation ( $\mu_{\max}$ ,  $\mu_{C\max}$ ,  $\mu_{N\max}$  et  $Y_{X/PEP}$ ), mais leur importance est moindre en culture semi-continue. D'autre part, les cinétiques des fermentations semi-continues sont moins bien simulées que celles des cultures en réacteur discontinu. En effet, les résultats fournis par le modèle pour les fermentations discontinues sont corrects. Aussi nous commencerons à ajuster les paramètres en appliquant le modèle aux cultures semi-continues.

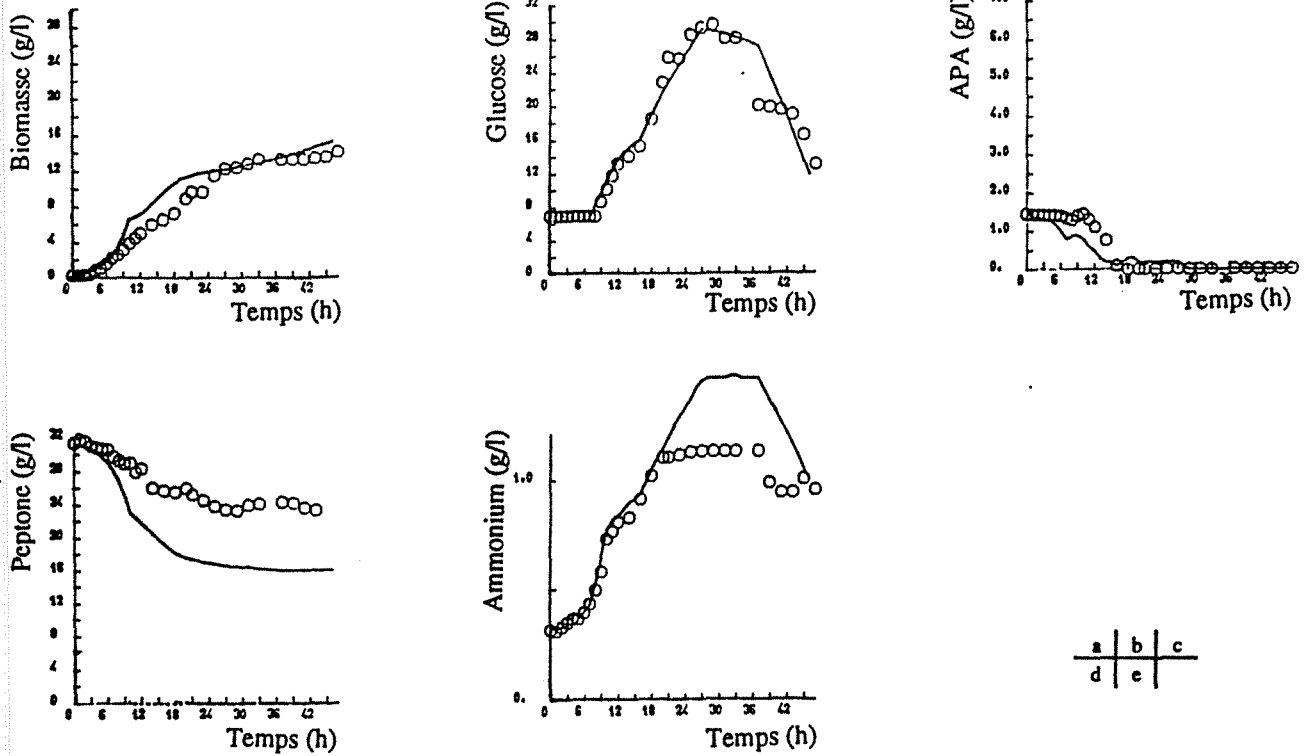
#### *II.3.2.1. - Modifications des paramètres du modèle et résultats des simulations en fermentations discontinue et semi-continue*

La confrontation des résultats théoriques et expérimentaux met en évidence une croissance simulée trop forte au début de la fermentation J, et un arrêt prématuré de celle-ci pour la fermentation K. Les paramètres modifiés sont choisis parmi ceux qui ne perturbent pas ou peu l'allure des cinétiques théoriques des fermentations discontinues.

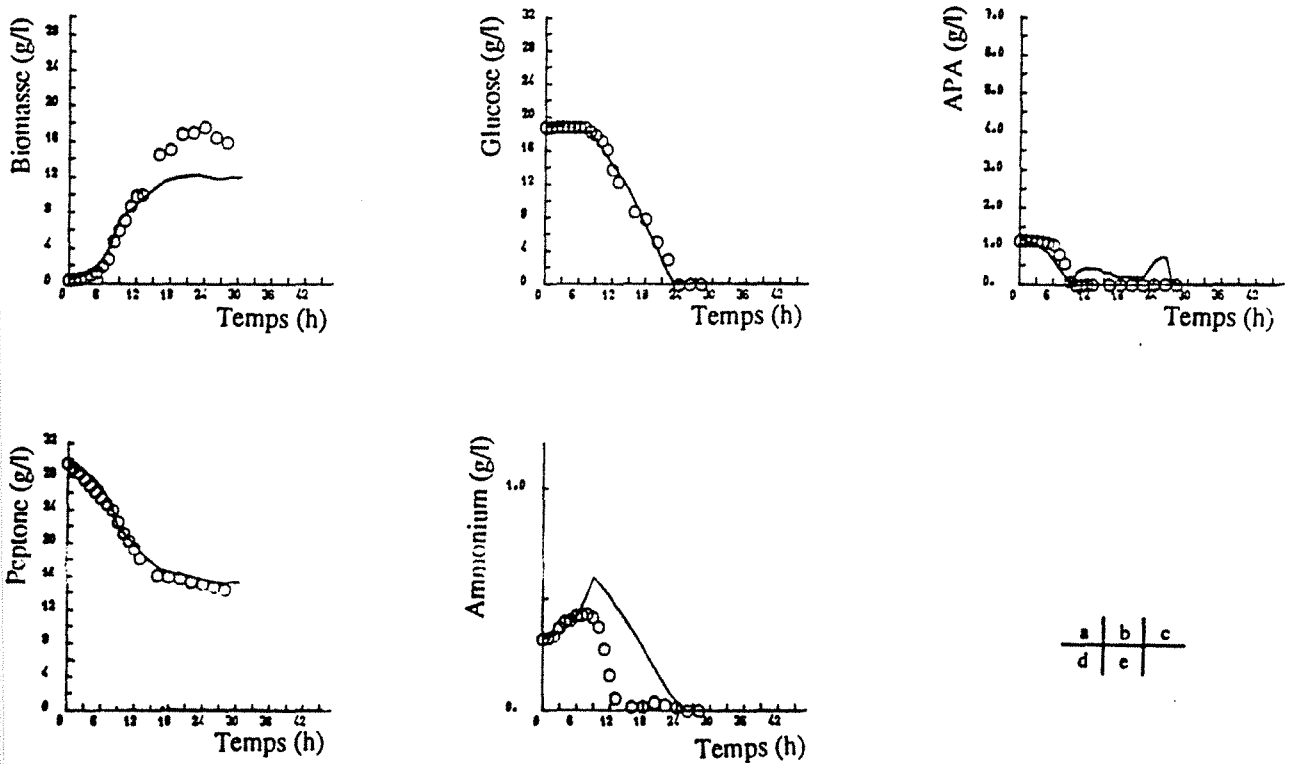
#### *II.3.2.2. - Modifications des paramètres du modèle*

La liste des paramètres susceptibles d'être modifiés comporte :  $\gamma_{GLC\max}$ ,  $Y_{X/GLC}$ ,  $m_{GLC}$ ,  $K_{GLC}$ ,  $K_I$ ,  $K_{APA}$  et  $K_{PI}$ . Cependant les cinétiques théoriques de consommation des substrats pour la fermentation sont en accord avec les résultats expérimentaux. Aussi les paramètres liés directement à la consommation des substrats sont retirés, le seul paramètre modifiable est  $K_I$ . Le  $K_I$  est diminué de 1 à 0,5 de manière à ralentir la croissance (Tab. E 4). En effet, pour un  $K_I$  de 0,5, une concentration de 0,5 g/l en APA dans le réacteur inhibe encore la consommation du glucose. Cependant, la croissance étant plus faible en début de fermentation, il en découle une

279



**Figure E 19 :** Paramètres ajustés : résultats des simulations de la culture semi-continue avec une alimentation mixte en glucose et APA (J) de la souche *E. coli* G271 (→ : arrêt de l'alimentation).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA, (d) : peptone et (e) : ions ammonium.



**Figure E 20 :** Paramètres ajustés : résultats des simulations de la culture semi-continue avec une alimentation en APA (K) de la souche *E. coli* G271.  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA, (d) : peptone et (e) : ions ammonium.

consommation insuffisante de l'APA. Nous voulons augmenter la consommation de l'APA sans pour autant perturber la croissance. Les paramètres liés à la cinétique de consommation de l'APA sont  $\gamma_{APA\max}$ ,  $K_{APA}$ ,  $m_{APA}$  (Tab. E 3). La maintenance de l'APA ( $m_{APA}$ ) influe peu sur la croissance, ce paramètre est augmenté à  $0,02\text{ h}^{-1}$  (ancienne valeur =  $0,01\text{ h}^{-1}$ ).

#### II.3.2.1.2. - Résultats des simulations en fermentations discontinue et semi-continue

➔ Les cinétiques théoriques des fermentations J et K obtenues après avoir modifié ces paramètres sont décrites respectivement par les figures E 19 et E 20 (a, b, c, d et e).

→ Le modèle prédit correctement l'évolution des cinétiques de la fermentation J (Fig. E 19 a, b, c et e). Cependant, la consommation théorique de la peptone est trop forte (Fig. E 19 d). De même, l'évolution de la concentration en ions ammonium donnée par le modèle bien qu'étant améliorée surestime encore les résultats expérimentaux (Fig. E 19 c et E 18 c).

→ Pour la fermentation K (Fig E 20) les résultats théoriques n'ont pas beaucoup évolué : la croissance simulée s'arrête trop tôt (Fig E 20 a). Mais les cinétiques expérimentales et théoriques de consommation du glucose et de l'APA se rejoignent (Fig E 20 b, c et E 17 b, c).

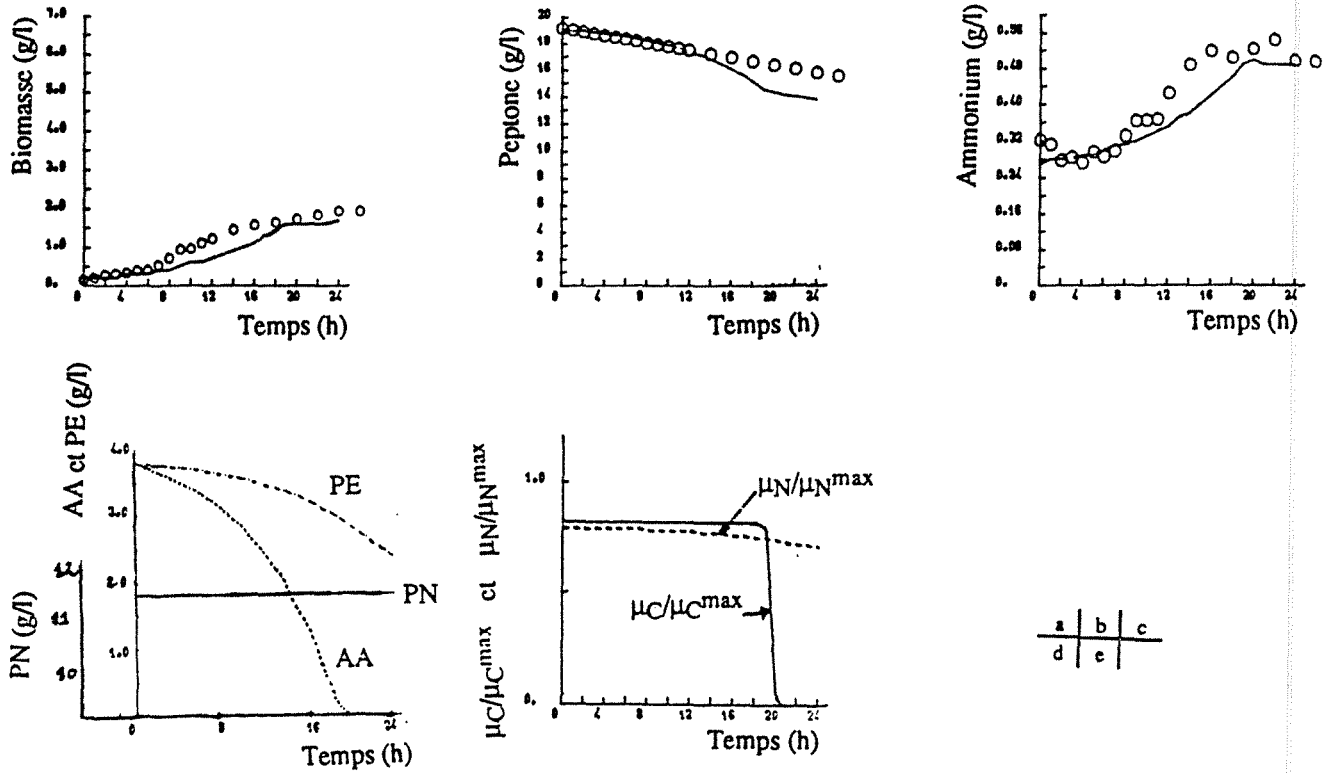
Les simulations des fermentations semi-continues sont nettement améliorées. Nous n'expliquons toutefois pas pourquoi la peptone pour la culture semi-continue J est si peu consommée. Ceci entraîne une mauvaise simulation de la concentration des ions ammonium dans le réacteur. La croissance s'arrête encore trop tôt pour la fermentation K.

➔ Les quatre fermentations discontinues sont alors utilisées pour tester le modèle après la modification de ces paramètres. Les résultats des simulations des fermentations E, F, G et H fournis par le modèle sont comparés aux données expérimentales respectivement sur les figures E 21, 22, 23, 24 et 25. Nous faisons référence aux précédents résultats représentés sur les figures E 13, 14, 15, 16 et 17.

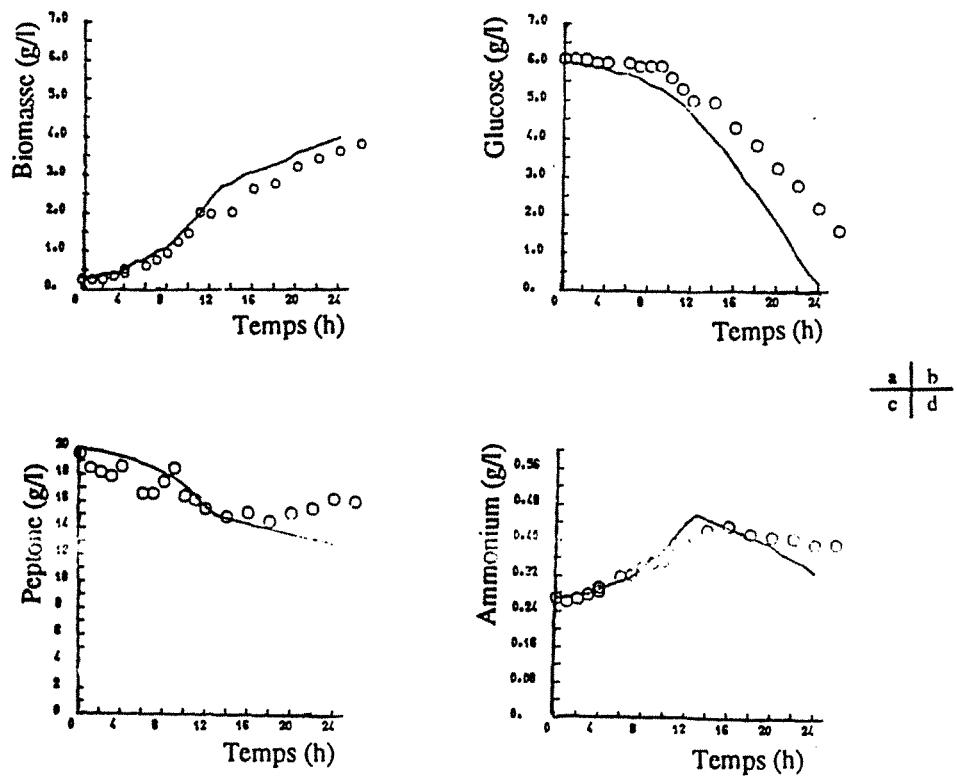
→ Les cinétiques théoriques des fermentations E et F n'ont pas été modifiées car il n'y a pas d'APA dans le milieu (Fig. E 21 et E 13, E 22 et E 14). Pour la fermentation E (milieu contenant que de la peptone), la croissance s'arrête (Fig. E 21 a) lorsque la source de carbone représentée par les acides aminés est épuisée (Fig. E 21 d). Les consommations de peptides et de peptone s'arrêtent au même moment (Fig. E 21 d). Les ions ammonium sont produits pendant les 15 premières heures de la culture, ils ne sont jamais consommés (Fig. E 21 c). Les rapports  $\mu_C/\mu_{C\max}$  et  $\mu_N/\mu_{N\max}$  restent inférieurs à 1 (Fig. E 21 e) : la croissance est limitée par les sources de carbone et d'azote. Pour la fermentation F (milieu contenant de la peptone et du



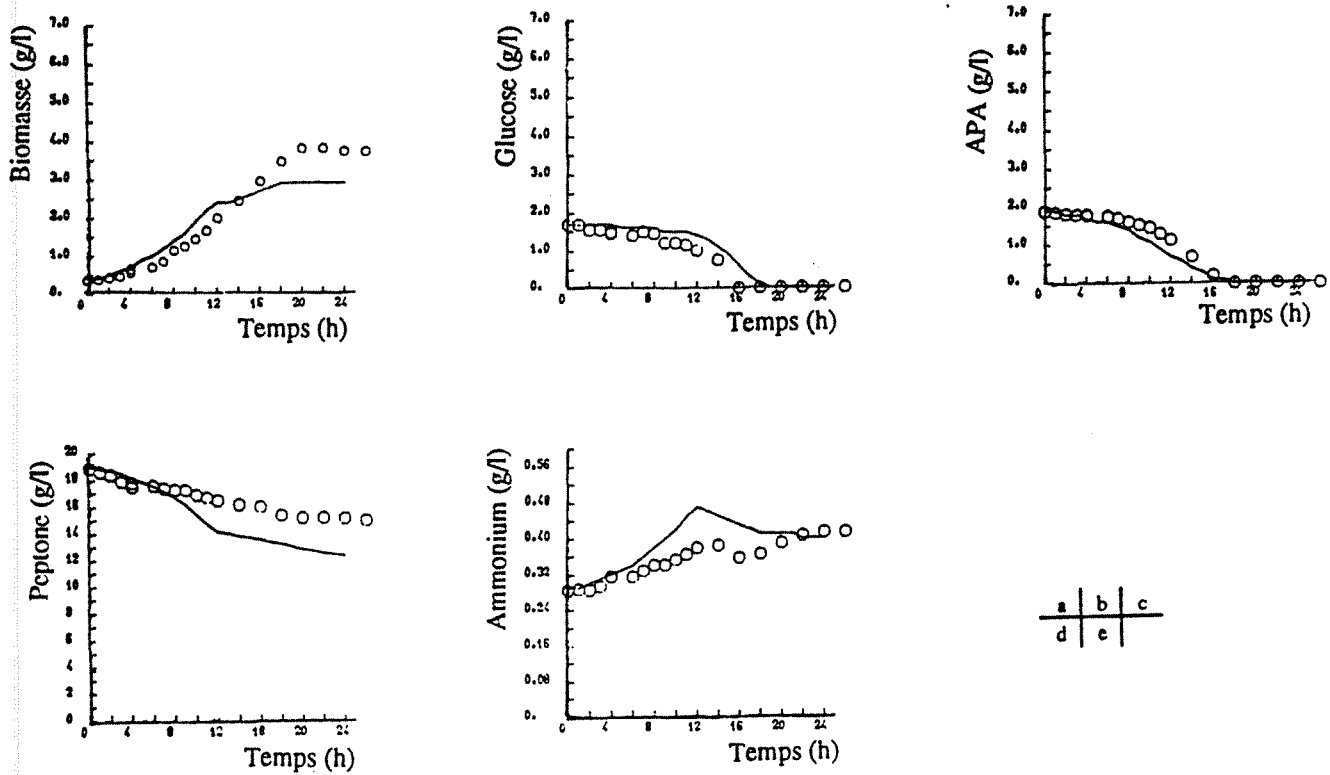




**Figure E 21 :** Paramètres ajustés : résultats des simulations de la culture discontinue de la souche *E. coli* G271 sur un milieu ne contenant que de la peptone (E).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : peptone, (c) : ions ammonium, (d) : acides aminés (...) et peptides (----), (e) :  $\mu_C/\mu_{Cmax}$  et  $\mu_N/\mu_{Nmax}$ .



**Figure E 22 :** Paramètres ajustés : résultats des simulations de la culture discontinue de la souche *E. coli* G271 sur un milieu contenant de la peptone et du glucose (F).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA, (d) : peptone et (e) : ions ammonium.



a	b	c
d	e	

Figure E 23 : Paramètres ajustés : résultats des simulations de la culture discontinue de la souche *E. coli* G271 sur un milieu contenant de la peptone et de l'APA (G).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA, (d) : peptone et (e) : ions ammonium.

glucose), le modèle simule correctement la croissance, les consommations de glucose et de peptone (Fig. E 22 a, b, c). Le modèle permet de rendre compte des phases de production et d'assimilation des ions ammonium (Fig. E 22 d).

→ Pour la fermentation G (milieu contenant de la peptone et de l'APA et très peu de glucose), les concentrations calculées se rapprochent des valeurs expérimentales mais les résultats ne sont pas parfaits (Fig. E 23 et E 15). La croissance théorique s'arrête prématurément. Le modèle simule correctement l'inhibition de la consommation du glucose par l'APA. Toutefois, l'assimilation théorique du glucose est légèrement retardée (Fig. E 23 b et E 15 b).

→ Pour la fermentation H (milieu complet), la phase exponentielle de croissance théorique est trop courte (Fig. E 24 a). Les consommations théoriques du glucose et de l'APA sont trop faibles par rapport aux valeurs expérimentales (Fig. E 24 b, c). Une augmentation de la concentration initiale en biomasse, permettant de diminuer artificiellement la phase de latence, permet de corriger les cinétiques simulées (Fig. E 25). Notamment, l'évolution de la concentration en APA est mieux modélisée que précédemment (Fig. E 25 c et E 17 c).

Les simulations des fermentations discontinues sont correctes sauf pour la fermentation H, car la longue phase de latence due à une faible concentration cellulaire initiale, n'est pas correctement simulée par le modèle.

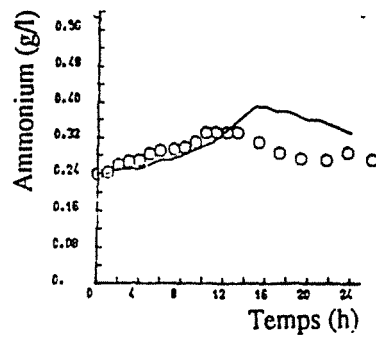
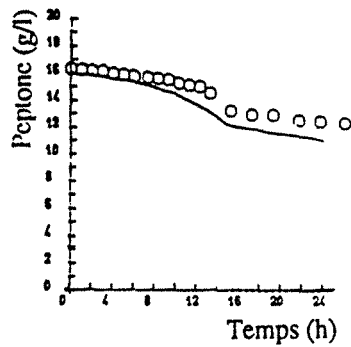
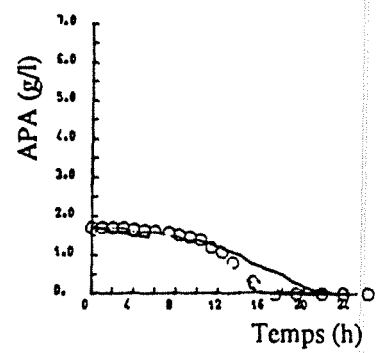
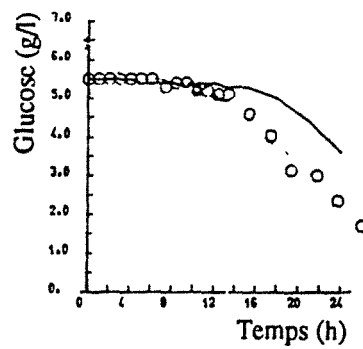
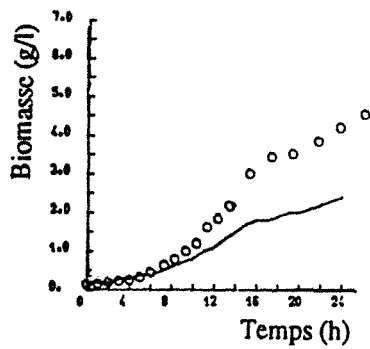
Les simulations des cultures semi-continues restent imparfaites, la croissance théorique est notamment trop faible. Le modèle testé sur différentes fermentations semi-continues, où les substrats sont ajoutés ponctuellement (FB n° 1 et 2 cf partie D), sous-estime toujours la croissance. Il n'est plus possible de corriger la cinétique de croissance théorique des fermentations semi-continues sans perturber les simulations des cultures discontinues. Les expressions des lois cinétiques du modèle doivent être modifiées.

### *II.3.3. - Modifications du modèle et résultats des simulations en fermentation discontinue et semi-continue*

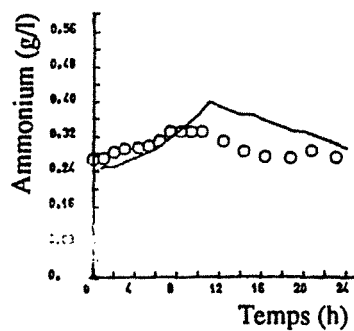
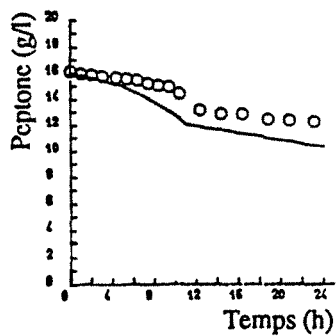
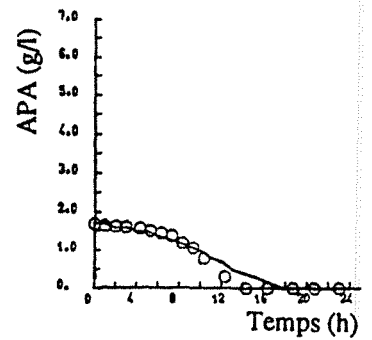
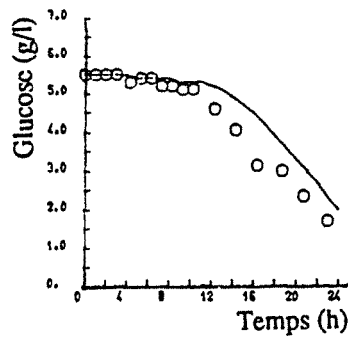
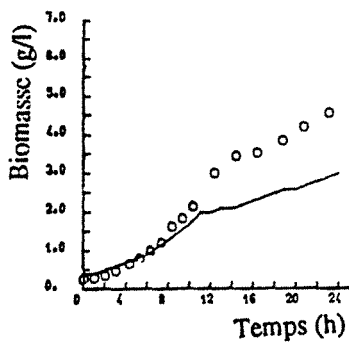
#### *II.3.3.1. - Modifications du modèle*

Nous avons constaté que le modèle permettait de simuler correctement l'évolution des variables d'état des fermentations discontinues. En revanche, nous cherchons à améliorer les performances du modèle pour les cultures semi-continues. La différence entre ces deux types de fermentation provient de l'ajout d'extrait de levure dans le milieu des cultures semi-continues.





a	b	c
d	e	

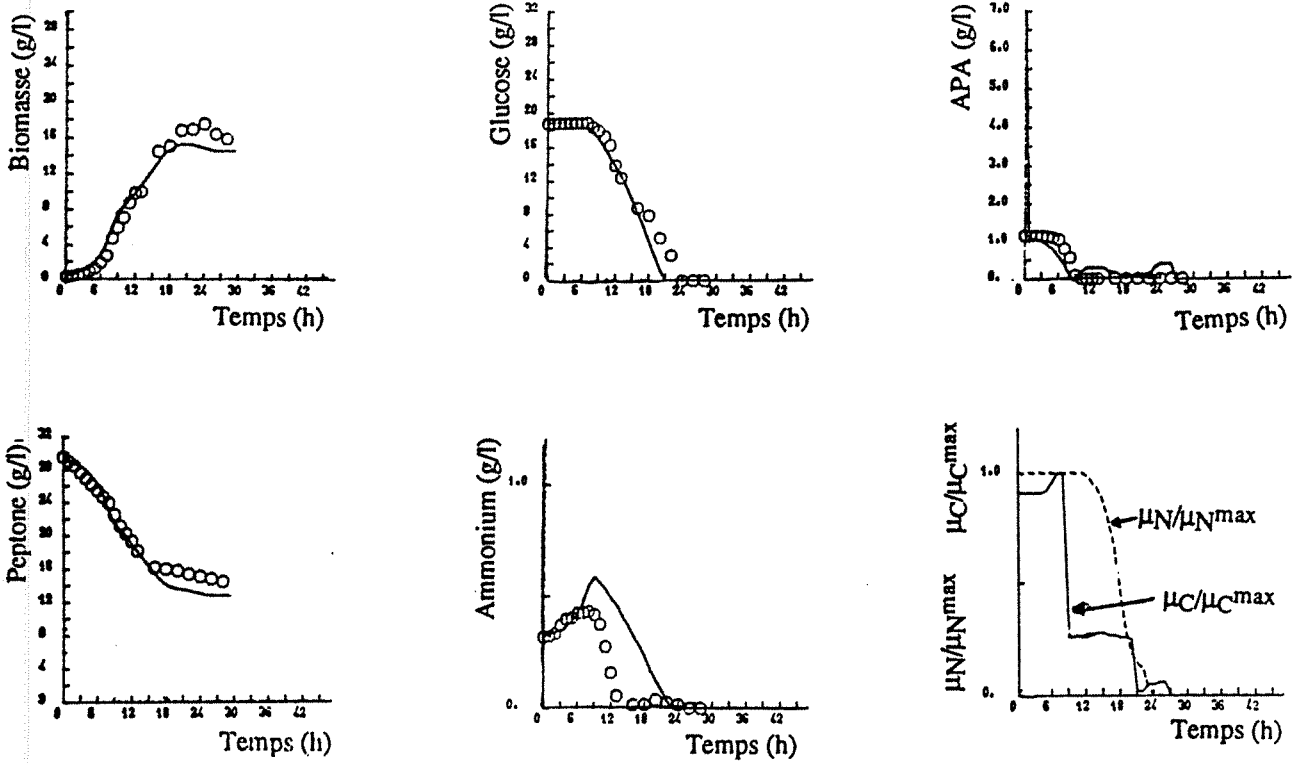


a	b	c
d	e	

Figures E 24 et E 25 : Paramètres ajustés ; résultats des simulations de la culture discontinue de la souche *E. coli* G271 sur un milieu standard (H) (Fig. E 25 en diminuant la phase de latence).

o o o : valeurs expérimentales

(a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA, (d) : peptone et (e) : ions ammonium.

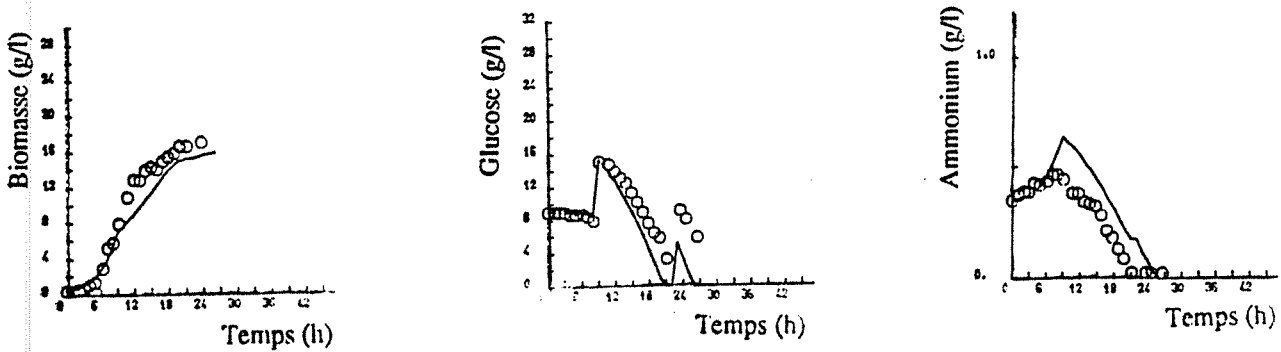


**Figure E 26 :** Modification des pourcentages entre les acides aminés (20%) et les peptides (30%) : résultats des simulations de la culture semi-continue avec une alimentation en APA (K) de la souche *E. coli* G271.

o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques

(a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA, (d) : peptone (..... : acides aminés et -----: peptides), (e) : ions ammonium et (f) :  $\mu_C/\mu_{Cmax}$  et  $\mu_N/\mu_{Nmax}$ .

a	b	c
d	e	f



**Figure E 27 :** Modification des pourcentages entre les acides aminés (20%) et les peptides (30%) : résultats des simulations de la culture semi-continue FB n°1 (2 ajouts ponctuels de glucose) de la souche *E. coli* G271.

o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques

(a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : ions ammonium

a	b	c
---	---	---

L'extrait de levure a été introduit dans le modèle en augmentant dans les mêmes proportions les quantités représentées par les acides aminés et les peptides. Or, l'extrait de levure favorise surtout la croissance par rapport à la production de PA. Nous pouvons supposer que l'introduction d'extrait de levure dans le milieu modifie le rapport entre une première fraction composée de nutriments favorables à la production de l'enzyme et une deuxième stimulant la croissance. D'après les résultats des précédentes études, nous supposons que les acides aminés constituent la première fraction et les peptides représentent la deuxième fraction. Les pourcentages en acides aminés et peptides sont modifiés et les cinétiques de croissance théoriques et expérimentales sont comparées pour les cultures semi-continues.

### II.3.3.2. - Résultats des simulations en fermentations discontinue et semi-continue

Le modèle est appliqué aux fermentations semi-continues en utilisant des pourcentages différents entre les acides aminés et les peptides. Les résultats obtenus avec la répartition suivante PE = 30 % et AA = 20 % sont confrontés aux données expérimentales.

➔ La figure E 26 (a, b, c, d, e et f) permet de comparer les résultats expérimentaux et théoriques de la fermentation K. Les cinétiques fournies par le modèle pour la fermentation K sont en parfait accord avec les résultats expérimentaux (Fig. E 26 a, b, c et d), sauf pour les ions ammonium pour lesquels la consommation théorique est légèrement en retard (Fig. E 26 e). Le modèle permet de simuler correctement les consommations successives des différents substrats. Le rapport  $\mu_N/\mu_{Nmax}$  chute à partir de la 15<sup>ème</sup> heure de croissance (Fig. E 26 f). Le rapport  $\mu_C/\mu_{Cmax}$  baisse dès la 10<sup>ème</sup> heure de culture mais se stabilise ensuite pendant toute la période d'alimentation du fermenteur (Fig. E 26 f). Le milieu d'alimentation ne contient que de l'APA, la croissance est limitée par la source d'azote.

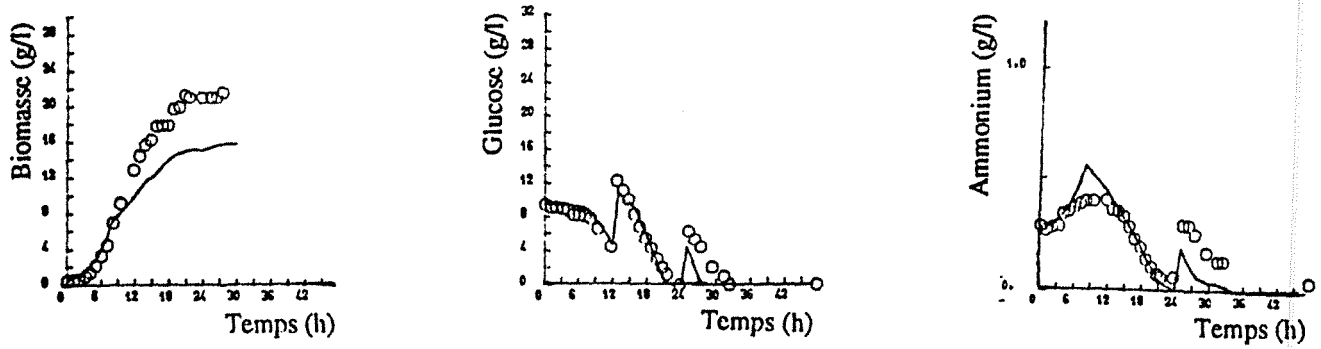
➔ Les résultats théoriques et expérimentaux de la culture semi-continue n° 1 (2 ajouts ponctuels de glucose) sont représentés sur la figure E 27 (a, b et c). L'évolution des concentrations théoriques en biomasse et en substrat rejoignent les valeurs expérimentales (Fig. E 27 a,d et c).

➔ Sur la figure E 28 (a,b et c), les résultats expérimentaux et théoriques pour la fermentation semi-continue n° 2 (ajouts ponctuels de glucose et de sulfate d'ammonium) sont comparés. La croissance théorique décroît trop tôt (Fig. E 28 a). Les simulations des consommations de glucose et des ions ammonium sont en accord avec les points expérimentaux (Fig. E 28 b et c).

➔ La figure E 29 (a, b, c, d et e) permet de confronter les données expérimentales et théoriques de la fermentation semi-continue J. La croissance est surestimée par le modèle (Fig. E

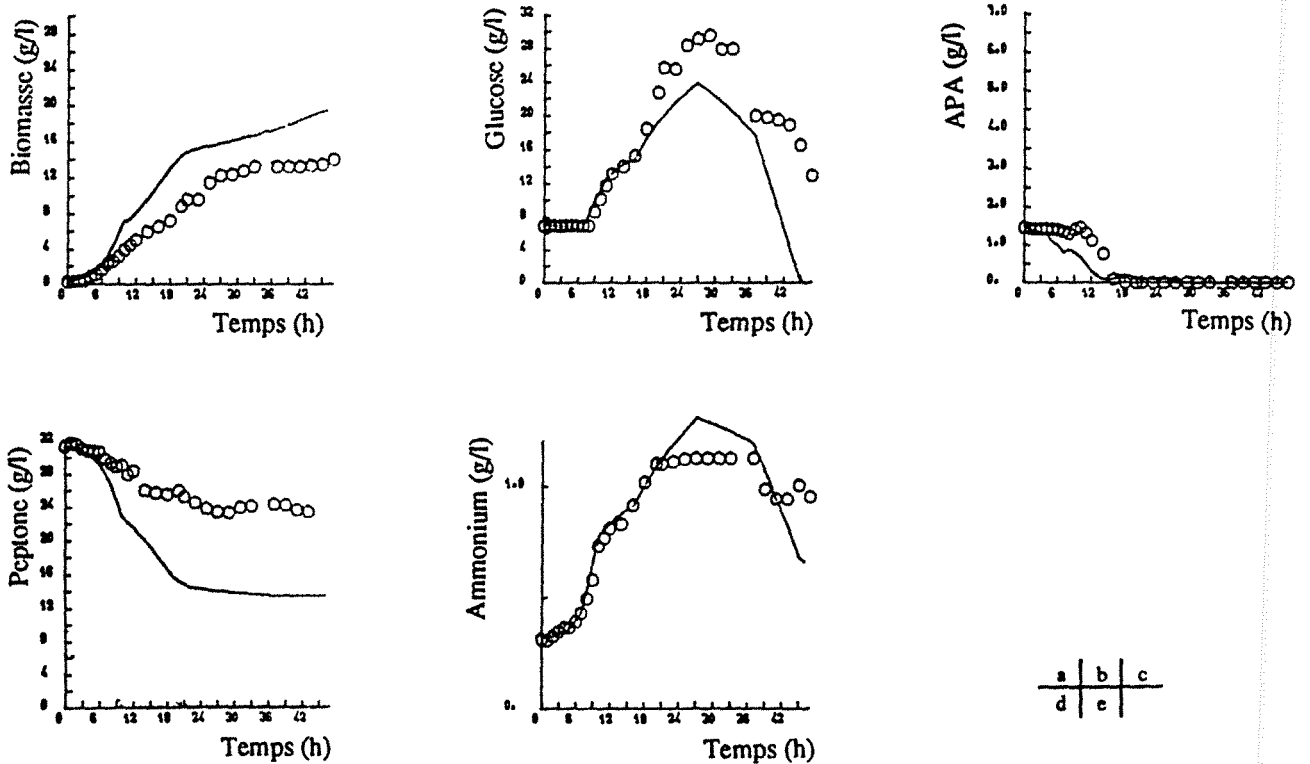






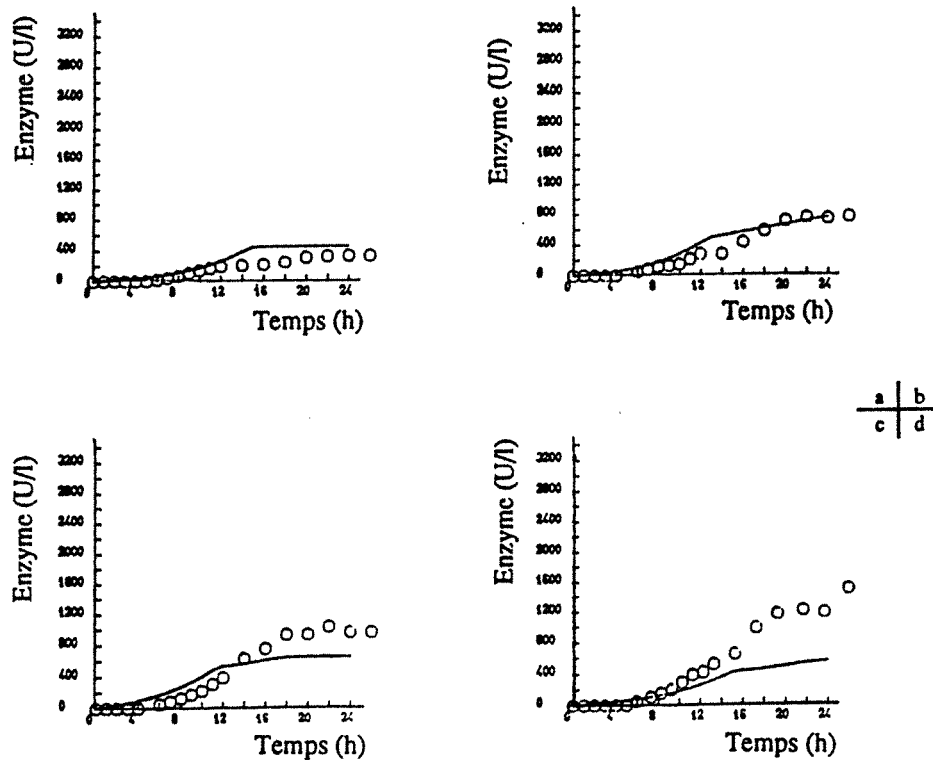
**Figure E 28 :** Modification des pourcentages entre les acides aminés (20%) et les peptides (30%) : résultats des simulations de la culture semi-continue FB n°2 (2 ajouts ponctuels de glucose et un ajout de sulfate d'ammonium) de la souche *E. coli* G271.  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : ions ammonium

a | b | c



a | b | c  
 d | e |

**Figure E 29 :** Modification des pourcentages entre les acides aminés (20%) et les peptides (30%) : résultats des simulations de la culture semi-continue avec une alimentation mixte en glucose et en APA (J) de la souche *E. coli* G271.  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA, (d) : peptone et (e) : ions ammonium.



**Figure E 30 :** Résultats des simulations de la production enzymatique en cultures discontinues.  
 Milieux : peptone (a), peptone et glucose (b), peptone et APA (c) et standard(d).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques

**29 a).** La précédente simulation décrivait mieux l'évolution des concentrations réelles en biomasse (Fig. E 19 a). Les consommations théoriques de glucose, d'APA et de peptone sont trop importantes (Fig. E 29 b, c et d). En revanche les valeurs théoriques des concentrations en ions ammonium rejoignent les valeurs expérimentales (Fig. E 29 e).

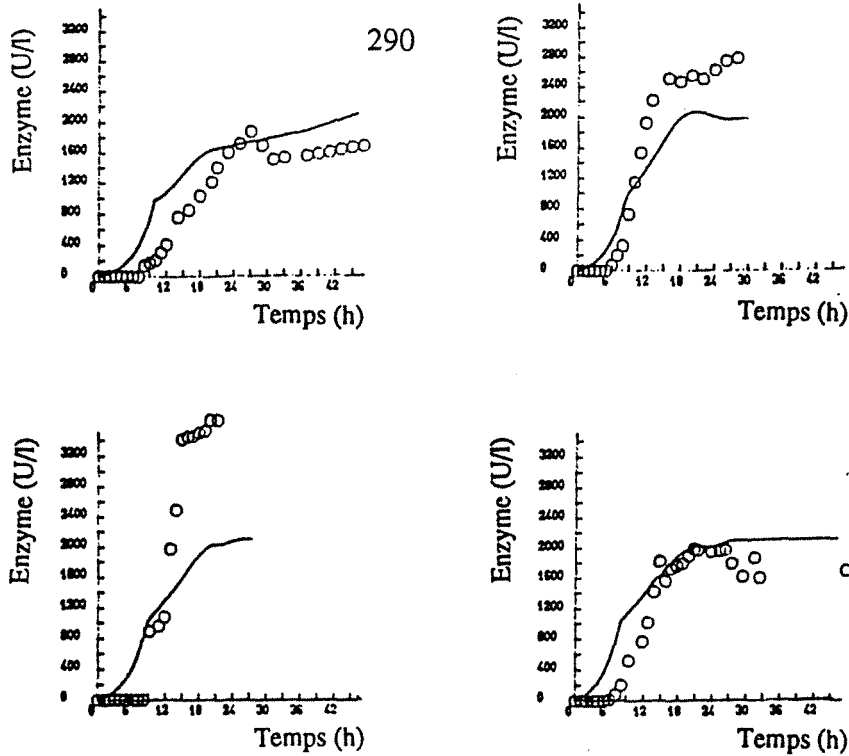
L'extrait de levure ayant une composition différente de la peptone favorise la croissance. L'amélioration de la synthèse de l'enzyme par la fraction acides aminés de la peptone est ici indirectement confirmée. Le rôle de l'extrait de levure est introduit dans le modèle en modifiant les parts respectives des différentes fractions de la peptone. Les acides aminés et les peptides représentent respectivement 20 et 30% de la concentration initiale en peptone. La croissance de la fermentation semi-continue J est toujours surestimée, son milieu de culture contiendrait moins d'extrait de levure ou de peptone que les autres. Avec une répartition en acides aminés et en peptides équivalente à celle des cultures discontinues, la simulation de la croissance est correcte. Cependant, même en simulant correctement la croissance, la consommation de l'azote est surestimée.

#### *III.3.4. - Résultats des simulations de la production de l'enzyme*

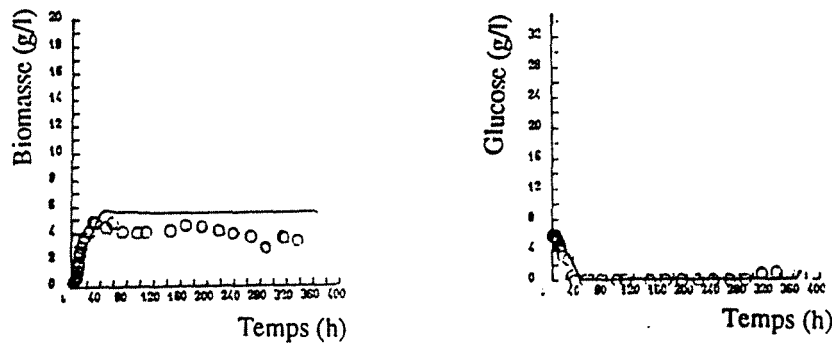
La simulation de la croissance étant correcte, les deux paramètres qui permettent d'exprimer la production de la PA ( $Y_{PA/X}$  et  $\alpha'$ ) sont ajustés.

Les simulations des fermentations discontinues E et F, pour lesquelles le milieu de culture initial ne contient pas d'APA, sont utilisées pour ajuster  $Y_{PA/X}$ ,  $\alpha'$  est considéré comme nul. Ensuite, les deux autres fermentations discontinues H et G, contenant de l'inducteur, sont utilisées pour fixer la valeur de  $\alpha'$ .

➔ La figure E 30 (a, b, c et d) permet de comparer les concentrations théoriques et expérimentales en PA. D'après les simulations des productions d'enzyme pour les fermentations E et F (Fig. E 30 a et b), nous constatons que la valeur de 200 pour  $Y_{PA/X}$  permet d'obtenir des cinétiques théoriques de production de PA très proches des valeurs expérimentales. En donnant la valeur de 5 à  $\alpha'$  nous pouvons ajuster la production théorique à la production réelle de PA pour les fermentations G et H (Fig. E 30 c et d). Pour cette dernière fermentation, l'évolution théorique de la concentration en PA s'éloigne des points réels au delà de la 12ème heure de culture car la croissance simulée par le modèle n'est pas correcte.

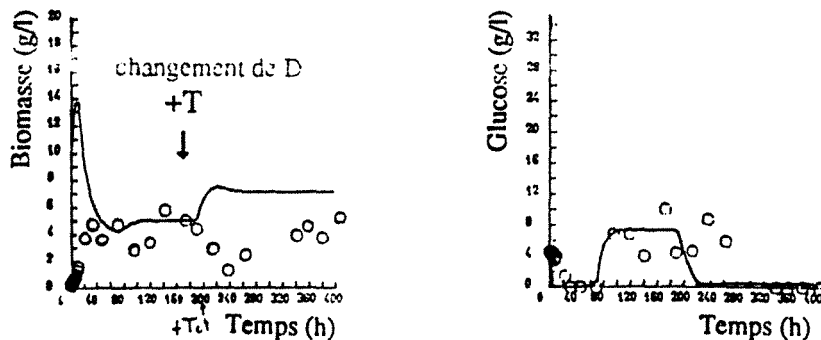


**Figure E 31 :** Résultats des simulations de la production enzymatique en cultures semi-continues. Alimentations : mixte glucose et APA (a), APA (b), 2 ajouts de glucose (c) et 1 ajout de sulfate d'ammonium (d).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques



**Figure E 32 :** Résultats des simulations de la culture continue C1 (faible taux de dilution).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose.

a	b
---	---



**Figure E 33 :** Résultats des simulations de la culture continue C2 (taux de dilution moyen).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose.

a	b
---	---

Soit :  $Y_{PA/X} = 200 \text{ U/g}$  et  $\alpha' = 5$

Pour les fermentations semi-continues, le rendement  $Y_{PA/X}$  est plus faible qu'en culture discontinue. Aussi seule la valeur de  $\alpha'$  est maintenue constante ( $\alpha' = 5$ ).

➡ Les valeurs théoriques et expérimentales des concentrations en PA pour les cultures semi-continues sont reportées sur la figure E 31 (a, b, c et d). Les résultats des cinétiques théoriques de production de PA pour les fermentations J et K sont utilisés pour ajuster  $Y_{PA/X}$  à 120 U/g (Fig. E 31 a et b). Pour la fermentation semi-continue n°2, la simulation de la cinétique de production de PA est en accord avec les points expérimentaux (Fig. E 31 d). Pour la fermentation en réacteur semi-continu n°1, la production réelle de PA est nettement supérieure aux valeurs théoriques (Fig. E 31 c). Nous avons vu précédemment, que les performances atteintes par cette culture demeurent inexplicables.

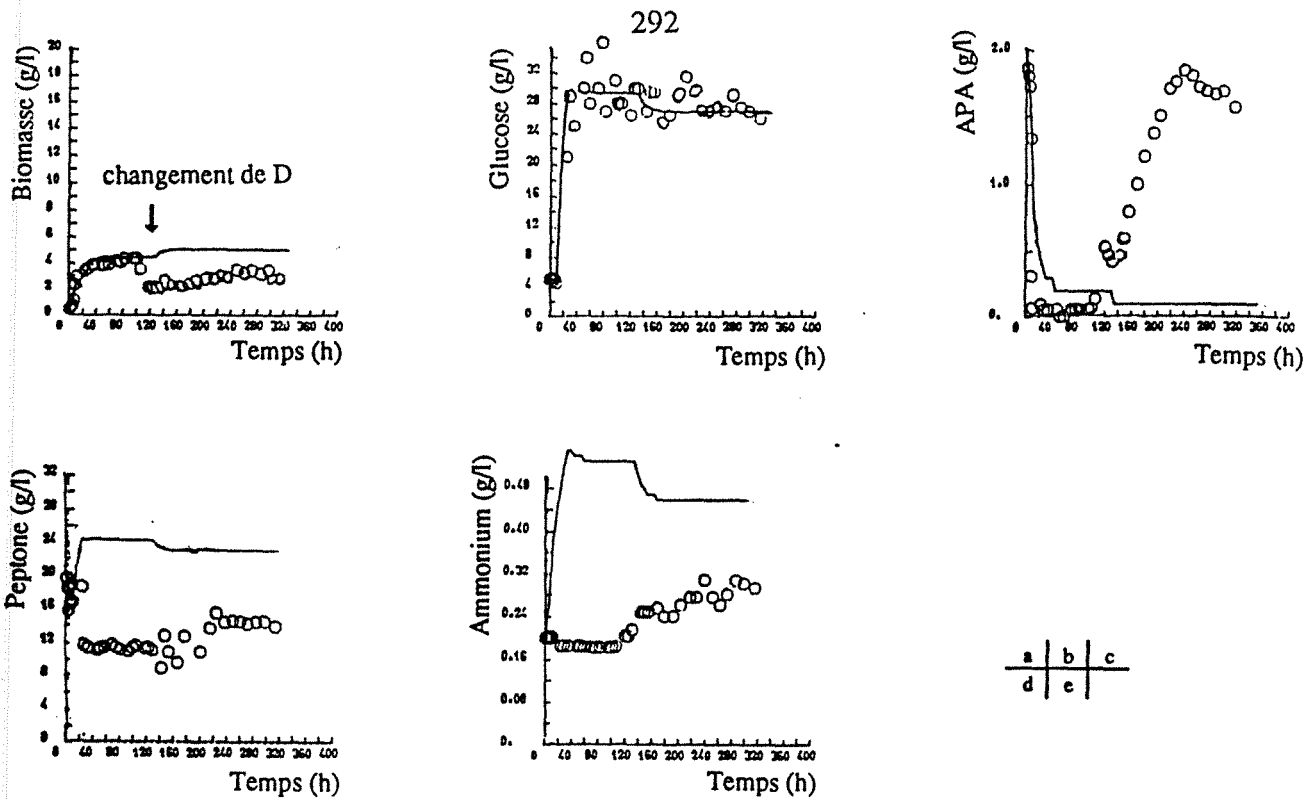
Les simulations de la production de l'enzyme pour les différentes fermentations sont loin des valeurs réelles, sauf pour les cultures discontinues. Il faudrait modifier l'expression de la synthèse de l'enzyme et notamment donner un rôle plus important à la composition du milieu. La production de PA pourrait être liée à la consommation des composants de la peptone.

#### II.4. - Résultats des simulations des fermentations continues

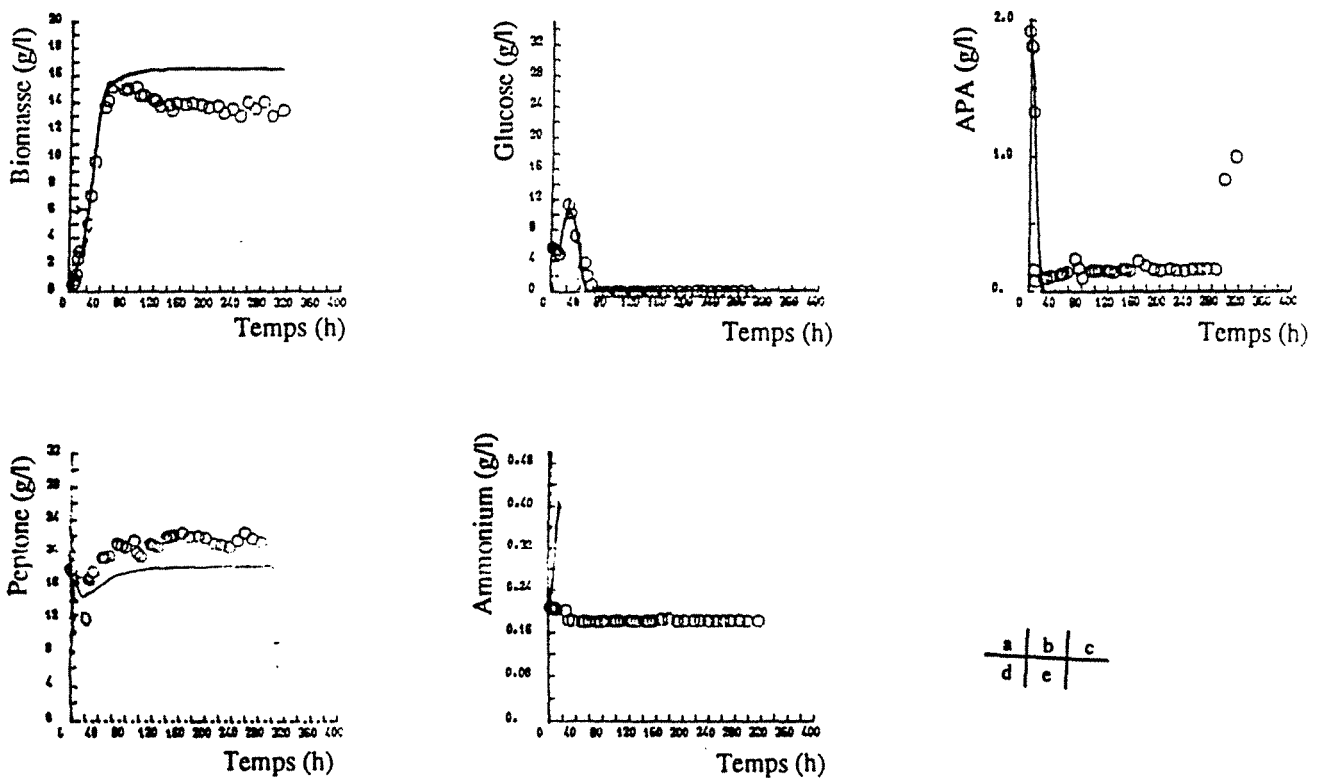
Considérant que le modèle permet de simuler correctement le comportement de la souche G271 en fermentations discontinues et semi-continues, nous allons maintenant étendre son utilisation aux fermentations continues. Les résultats expérimentaux des fermentations C1, C2, C3 et C4 (décrites dans la partie D paragraphe III.1.) sont utilisés dans cette partie pour tester les capacités du modèle.

➡ La figure E 32 (a et b) permet de comparer les résultats théoriques aux résultats expérimentaux pour la fermentation C1. Les évolutions théoriques des concentrations en biomasse et en glucose rejoignent bien la réalité expérimentale.

➡ La figure E 33 (a et b) permet de suivre les évolutions théoriques et expérimentales des concentrations en biomasse et glucose au cours de la culture continue C2. Avant l'ajout de tétracycline, les cinétiques théoriques de croissance et de consommation du glucose décrivent correctement l'évolution des concentrations expérimentales (a et b). En revanche, après l'ajout de tétracycline (+T), les résultats théoriques surestiment la croissance et donc sous-estiment la



**Figure E 34 :** Résultats des simulations de la culture continue C3 (fort taux de dilution).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA, (d) : peptone et (e) : ions ammonium.



**Figure E 35 :** Résultats des simulations de la culture continue C4 (faible taux de dilution et forte concentration en peptone dans le milieu d'alimentation).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques  
 (a) : biomasse, (b) : glucose, (c) : APA, (d) : peptone et (e) : ions ammonium.

concentration en glucose (a et b). L'état stationnaire atteint après cet événement est correctement décrit par le modèle.

➤ Les données théoriques et expérimentales pour la fermentation en continu C3 sont reportées sur la figure E 34 (a, b, c, d et e). Pendant les 100 premières heures de la culture, la représentation théorique des concentrations en biomasse, glucose, APA sont proches des valeurs réelles (a, b et c). En revanche, les cinétiques de consommations de la peptone et des ions ammonium sont très mal simulées (d et e). Au delà de la 100ème heure, le modèle ne permet pas de simuler le comportement de la souche G271. La diminution du taux de dilution entraîne une augmentation de la biomasse théorique (a) et une diminution des concentrations théoriques en substrats (b,c,d et e). Or expérimentalement, les concentrations en biomasse et en glucose diminuent et celles en APA, peptone et en ions ammonium augmentent (a, b, c, d et e).

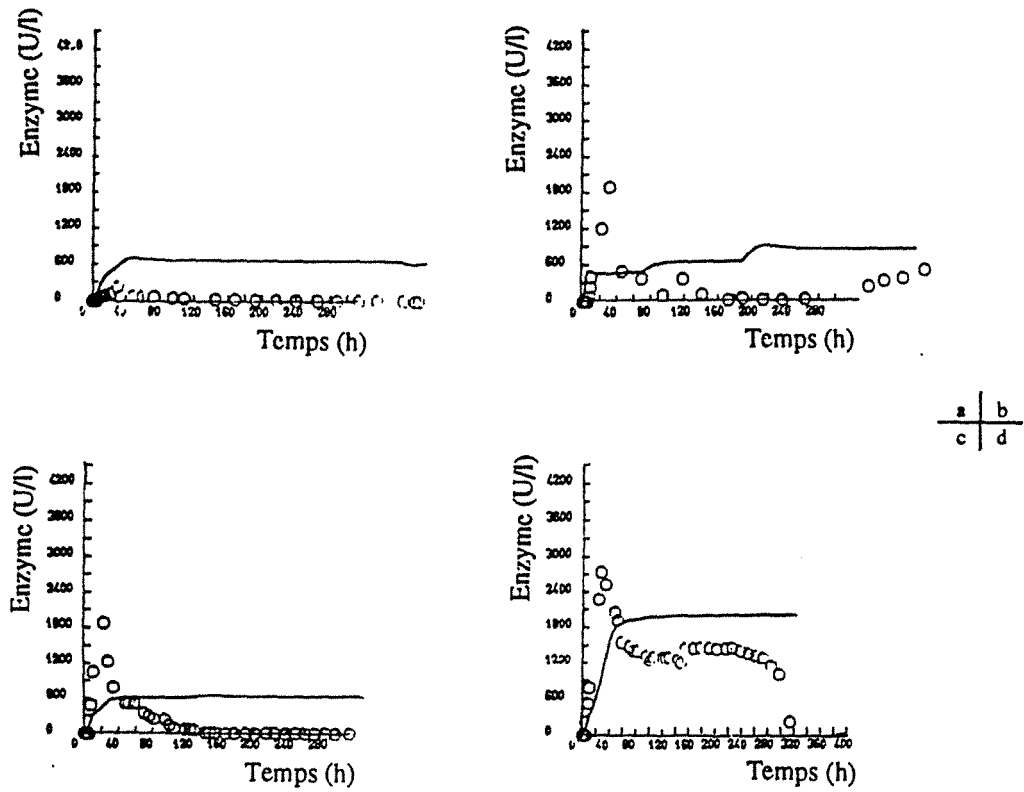
➤ Les résultats des simulations de la fermentation C 4 sont représentés figure E 35 (a, b, c, d et e). L'évolution des concentrations en biomasse, glucose, APA et peptone suivent correctement les valeurs expérimentales (a, b, c et d). En revanche, la courbe théorique obtenue pour les cinétiques de consommation des ions ammonium ne décrit pas du tout la réalité (e).

➤ Les simulations des cinétiques de production de la PA fournies par le modèle sont représentées figure E 36 (a, b, c et d). Nous constatons que la production de PA est mal simulée pour les fermentations C1, C2, C3 et C4 (Fig. E 36 a, b,c et d). Cependant, en fin de fermentation C2, après l'ajout de tétracycline, la production de PA n'est plus nulle, les concentrations théoriques en enzyme rejoignent les valeurs expérimentales (b). Pour la fermentation C4, les concentrations théoriques en PA se rapprochent des points expérimentaux à l'état stationnaire (c).

Pour les fermentations continues C1 et C2, les résultats du modèle simulent correctement les résultats expérimentaux. Pour la fermentation C2, la chute de la biomasse due à l'ajout de la tétracycline n'est pas modélisée. La surestimation de la biomasse après l'ajout de l'antibiotique se répercute sur la concentration résiduelle en glucose dans le réacteur, qui est sous-estimée par le modèle. Cependant, dans ces conditions, à l'état stationnaire les valeurs simulées et les points expérimentaux sont proches. Les fermentations C3 et C4 montrent que le métabolisme des ions ammonium n'est pas parfaitement modélisé. La synthèse de l'enzyme pour la fermentation continue C4 est importante, et entraîne vraisemblablement une augmentation du terme de maintenance des ions ammonium. Les simulations des autres cinétiques sont satisfaisantes. Le changement de métabolisme qui intervient à la 100ème heure de la fermentation C3 n'est pas simulé par manque d'informations. Les simulations de la production de la PA restent très approximatives : la production de PA n'est pas dans ces conditions simplement proportionnelle à la







**Figure E 36 :** Résultats des simulations de la production enzymatique en cultures continues.  
 Taux de dilution : faible C1 (a), moyen C2 (b), fort C3 (c) et C4 faible et forte concentration en peptone dans le milieu d'alimentation (C4) (d).  
 o o o : valeurs expérimentales, — : valeurs théoriques



vitesse spécifique de croissance. Pour les fermentations C3 (en fin de culture) et C4, nous avons montré que la production de PA était proportionnelle à la croissance, c'est pourquoi les valeurs théoriques et expérimentales sont voisines.

## II.5. - Discussion

Ce modèle, original dans sa conception permet de simuler correctement le comportement de notre souche en fermentations discontinues et semi-continues. Les résultats du modèle en cultures continues doivent être améliorés. Ce modèle permet de progresser dans la compréhension et la modélisation du comportement d'un microorganisme en milieu complexe. Il est certes compliqué, mais nous ne pouvions pas utiliser des modèles cités dans la littérature établis pour des milieux synthétiques avec seulement 1 ou 2 substrats carbonés : dans notre cas plusieurs substrats sont limitants. La distinction entre les sources carbonée et azotée qui a été introduite dans le modèle permet de simuler les cinétiques de croissance de *E. coli* en présence de plusieurs sources compétitives de carbone et d'azote. Ce modèle décrit correctement les consommations successives des différents substrats. Le fractionnement de la peptone est intéressant, car il nous a permis de simuler la production et la consommation des ions ammonium au cours des cultures de *E. coli*. Cependant, des dosages plus nombreux permettraient d'approfondir nos connaissances. Ainsi, nous pourrions calculer les rendements des différentes fractions. En comparant la consommation des acides aminés de l'extrait de levure et la peptone, une corrélation plus précise entre la production de l'enzyme et la quantité de peptone voire d'une de ses fractions pourrait être établie. Le taux de croissance ( $\mu$ ) pourrait être remplacé dans l'expression de la vitesse de production de PA par les vitesses spécifiques de consommation de la peptone voire des acides aminés ( $\gamma_{PEP}$  et  $\gamma_{AA}$ ). D'autre part, la prise en compte de la variation du contenu plasmidique permettrait aussi de corriger la simulation de la production de PA pour les fermentations continues, dans la mesure où la chute du nombre de copies de plasmides par cellule et par la suite l'apparition des bactéries non recombinées, entraînent une diminution de la production spécifique. Le double effet de la peptone sur le contenu plasmidique et la production de PA pourrait être introduit dans le modèle.

Il serait souhaitable d'introduire une inhibition de la croissance par l'APA. De même, il serait intéressant d'introduire une phase de latence dans la structure du modèle, en considérant une population active et une population latente (des cellules qui ne consomment pas de substrat et qui ne se multiplient pas). Les simulations des concentrations en ions ammonium pourraient être améliorées en corrélant le terme de maintenance des ions ammonium à la production de l'enzyme.

PARAMETRES	1ère estimation	2ème estimation
YX/PEP (g/g)	1	1
$\gamma_{AA}^{max}$ (h-1)	0,35	0,35
$\gamma_{PE}^{max}$ (h-1)	0,09	0,09
KAA (g/l)	0,001	0,001
KPE (g/l)	1	1
YX/GLC (g/g)	0,9	0,9
$\gamma_{GLC}^{max}$ (h-1)	0,15	0,1
KGLC (g/l)	0,1	0,1
mGLC (h-1)	0,02	0,04
KI (g/l)	1	0,5
$\alpha$	5	5
YX/APA (g/g)	0,5	0,5
$\gamma_{APA}^{max}$ (h-1)	0,11	0,09
KAPA (g/l)	0,5	0,5
mAPA (h-1)	0,01	0,02
YX/NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (g/g)	12	5
YNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /AA (g/g)	0,03	0,06
$\gamma_{NH_4^+}^{max}$ (h-1)	0,003	0,003
KNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (g/l)	0,01	0,01
mNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (h-1)	0,0005	0,0005
K	0,01	0,01
$\mu_{max}$ (h-1)	0,18/0,33	0,18/0,33
$\mu_{Nmax}$ (h-1)	0,09	0,09
$\mu_{Cmax}$ (h-1)	0,35	0,35
YPA/X (U/g)	300/180	200/120
$\alpha'$	0,09	5

Tableau E 5 : Comparaison des valeurs des paramètres entre la première et la deuxième estimation.

D'autre part, nous avons détailler l'étape de détermination et d'ajustement des paramètres du modèle. En effet cette étude est généralement occultée dans la présentation d'un travail de modélisation. L'ajustement des paramètres se fait "manuellement" en modifiant de façon plus ou moins raisonnée la valeur de chacun d'eux et en testant ensuite le modèle sur des fermentations. Lorsque le nombre de paramètres est élevé, ce travail est délicat. Nous avons effectué 2 estimations successives des paramètres. Leur évolution est rapportée dans le **tableau E 5**. Les résultats de l'analyse de sensibilité ont permis d'améliorer les capacités de simulation du modèle en modifiant 7 paramètres.

Nous proposons une "méthode" pour réaliser ce travail, schématisée par la **figure E 37**.

⇒ Une première estimation des paramètres est réalisée par calcul à partir des résultats expérimentaux et par estimation en utilisant les connaissances de l'expérimentateur.

⇒ Nous réalisons ensuite une analyse de sensibilité des variables d'état aux paramètres du modèle. Les résultats sont utilisés pour analyser les simulations. La structure du modèle impose dans notre cas d'analyser les cinétiques de consommation des substrats avant les cinétiques de croissance. Si l'ajustement des cinétiques ne peut être réalisé, il faut modifier les hypothèses du modèle. Cependant, dans notre étude la comparaison entre les cinétiques théoriques et les cinétiques expérimentales demeure empirique. Il faudrait introduire une fonction à optimiser de manière à rationaliser cette étape. Il serait aussi souhaitable d'introduire des valeurs seuils voire même imposer des valeurs pour certains paramètres dont la détermination à partir des données expérimentales est primordiale. La méthode proposée n'est pas encore parfaite, mais complétée elle pourra être exploitée par l'intermédiaire d'un système expert afin d'identifier les paramètres cinétiques d'un modèle.



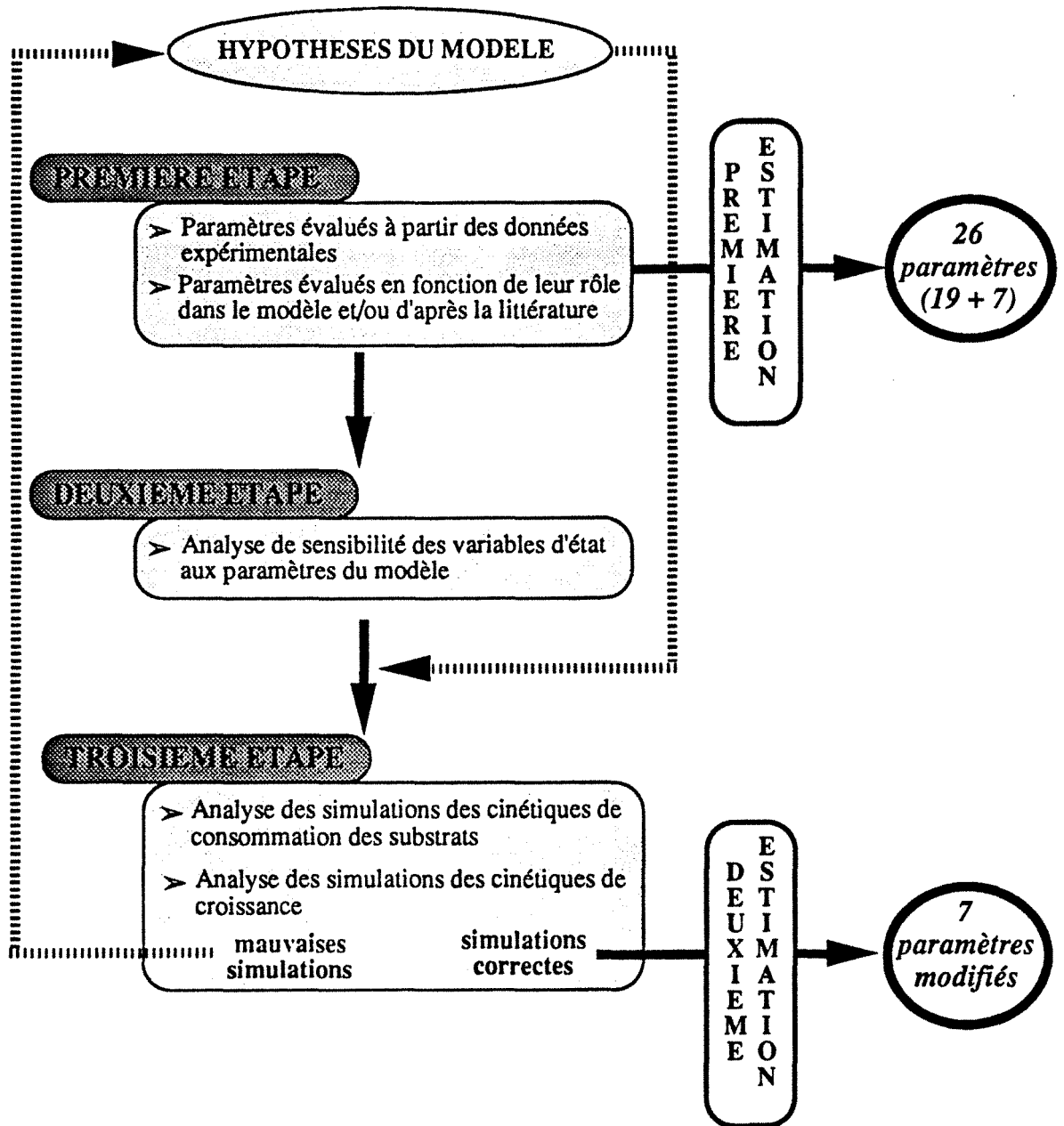


Figure E 37 : Les différentes étapes de l'estimation des paramètres du modèle.





### III. - Application du modèle : optimisation des conditions d'alimentation pour une fermentation semi-continue

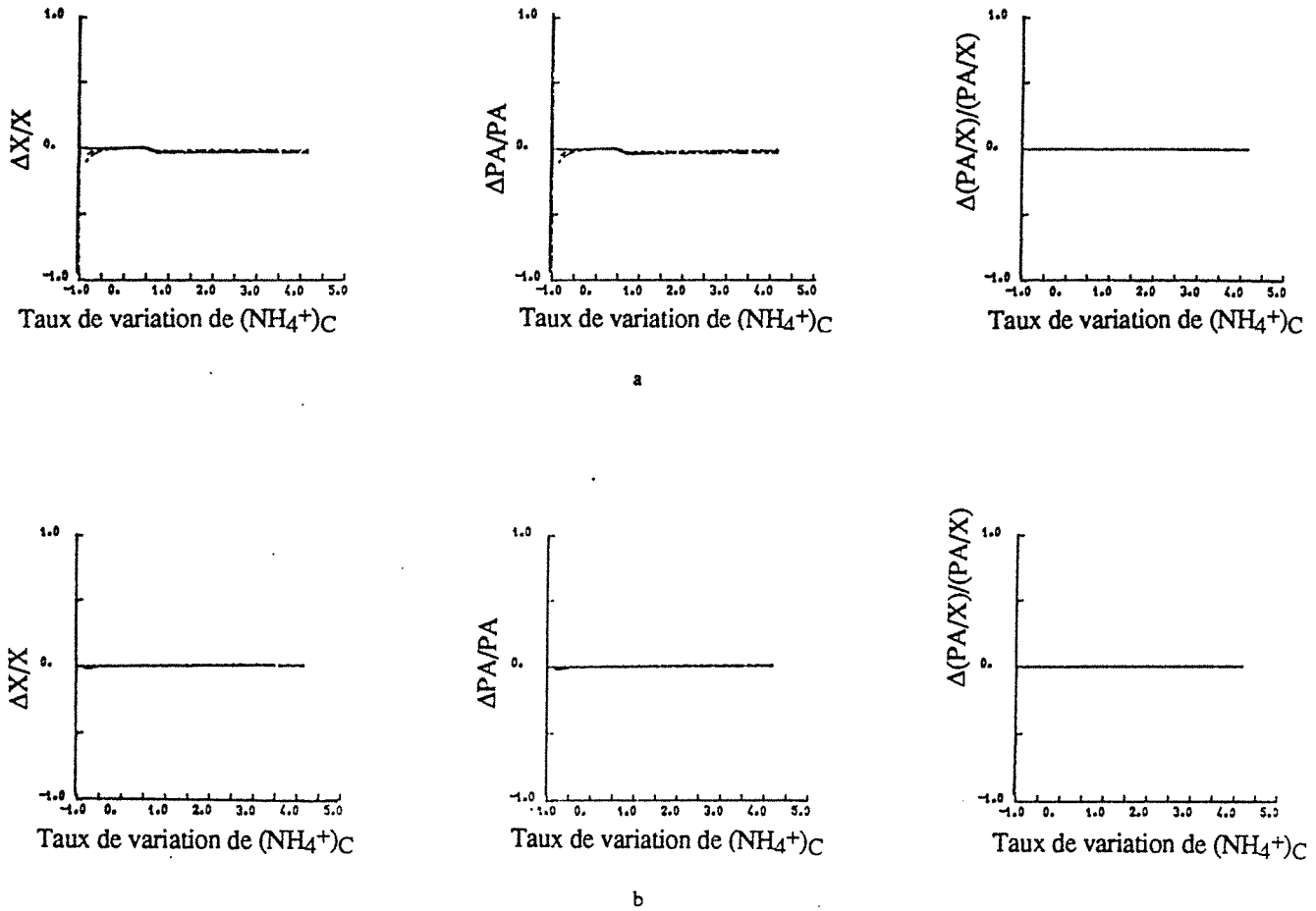
Le modèle a été utilisé dans une première partie pour structurer les connaissances sur le comportement de la souche *E. coli* G271. Dans cette dernière partie, il sera employé de manière prédictive.

Les performances de la souche *E. coli* G271 obtenues en cultures discontinue et semi-continue ont été étudiées dans la partie D. Ces résultats montrent que le mode de culture semi-continue permet d'atteindre des productivités volumiques en enzyme et des concentrations finales en PA comparables voire dans certains cas meilleures qu'en culture discontinue. Expérimentalement, pour une culture semi-continue alimentée seulement avec de l'APA (FB n°6) des performances finales obtenues sont les meilleures. La productivité volumique en PA est de 117 U/l.h, la production spécifique en PA atteint 159 U/g et la quantité finale en PA produite est de 30000 U pour un coût en matières premières de 0,11 cts/U.

Pour toutes les cultures réalisées précédemment, un seul milieu d'alimentation est utilisé comportant de l'APA, du glucose et des ions ammonium. Aussi, les concentrations des différents substrats dans le milieu de culture n'ont pas pu être contrôlées. Dans cette partie, le modèle est employé afin de tester de nouvelles conditions opératoires qui n'ont pas été mises en œuvre expérimentalement. Le modèle permet de compléter l'étude réalisée sur l'influence du type d'alimentation sur les performances de la souche *E. coli* G271, en simulant des fermentations semi-continues pour lesquelles chaque substrat est apporté séparément. Ainsi, les concentrations dans le milieu de culture en APA, en glucose et en ions ammonium peuvent être contrôlées et ajustées à des valeurs de consigne. Nous nous sommes restreint à l'ajout d'APA, de glucose et d'ions ammonium car l'étude préalablement commencée concernait ces trois substrats.

⇒ Dans un premier temps, nous étudierons l'influence des concentrations de consigne en ions ammonium, en APA et en glucose sur la croissance et la production de PA.

⇒ Dans un deuxième temps, à partir des résultats précédents, différentes conditions de culture seront testées grâce au modèle par simulation de fermentations semi-continues. Les performances obtenues seront comparées en fonction du type d'alimentation. Ces performances sont évaluées par rapport à 3 critères : les concentrations finales en biomasse et en PA ainsi que la production spécifique en enzyme.



**Figure E 38 :** Influence de la concentration de consigne en ions ammonium sur les concentrations en biomasse et en PA ainsi que sur la production spécifique en enzyme (temps d'étude : 15ème, 25ème, 35ème et 45ème heure).

(a) : Les concentrations initiales en glucose et en APA sont respectivement de 19 g/l et 1,2 g/l. Les concentrations de consigne en glucose et en APA sont respectivement de 1 g/l et 0,3 g/l.

(b) : Les concentrations initiales en glucose et en APA sont respectivement de 0 g/l et 1,2 g/l. Les concentrations de consigne en glucose et en APA sont respectivement de 0 g/l et 3 g/l.

⇒ Finalement, les résultats théoriques et expérimentaux seront confrontés. Les critères employés sont comme pour l'étude réalisée dans la partie D, la productivité volumique en enzyme, la production spécifique en PA, les concentrations finales en biomasse et en PA ainsi que le coût en matières premières.

Pour cette étude, les concentrations initiales de références sont celles de la fermentation réalisée expérimentalement avec une alimentation en APA (FB n°6), qui s'est révélée être la plus performante. La concentration initiale en APA utilisée est généralement comprise entre 0 et 2 g/l. En effet, l'APA doit être ajouté le plus tôt possible et au delà de 2 g/l il inhibe la croissance.

### III.1. - Etude de l'influence du contrôle des concentrations en substrat dans le milieu de culture sur la croissance et la production de pénicilline acylase

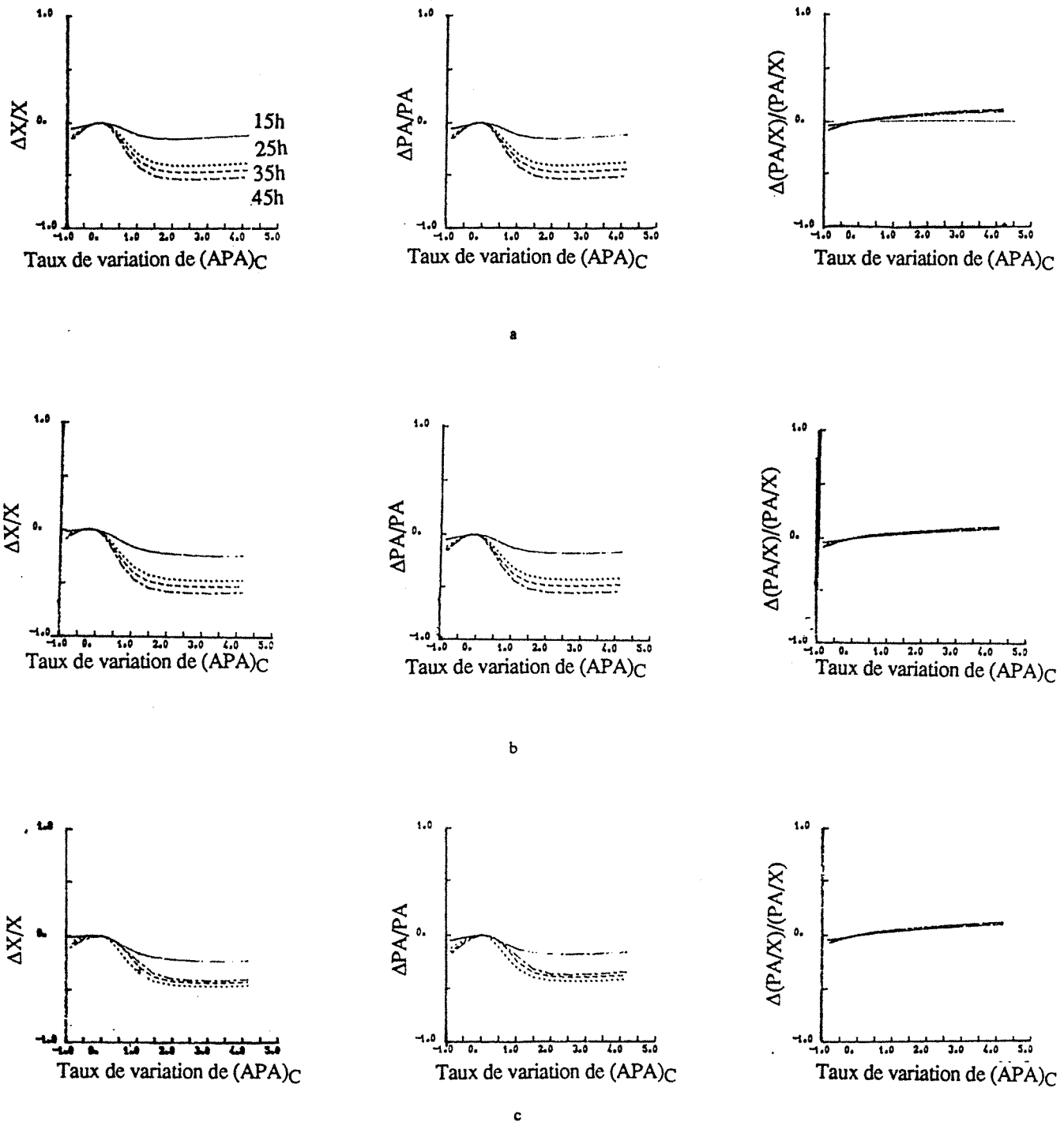
Le modèle permet de simuler des fermentations semi-continues en ajustant les débits d'alimentation de manière à contrôler les concentrations en substrat dans le fermenteur. Les concentrations en glucose, APA et en ions ammonium dans l'alimentation sont fixées respectivement à 500 g/l, 100 g/l et 18 g/l.

Dans cette première partie, nous étudierons successivement l'influence des concentrations de consigne des ions ammonium, de l'APA et du glucose sur la production de biomasse, de PA et la production spécifique en enzyme. Par analogie avec l'analyse de sensibilité des variables d'état aux paramètres du modèle, nous faisons varier les valeurs des consignes (le pourcentage de variation est de 20%). Nous calculons un taux de variation de la production spécifique en enzyme ainsi que des concentrations en biomasse et en PA après 15, 25, 35 et 45 heures de culture.

#### *III.1.1. - Etude de l'influence du contrôle de la concentration en ions ammonium dans le milieu de culture sur la croissance et la production de pénicilline acylase*

Différentes conditions de culture ont été testées, deux exemples représentatifs sont exposés.

➔ La **figure E 38** représente l'influence de la concentration de consigne en ions ammonium sur la biomasse, la PA et la production spécifique en PA pour deux fermentations semi-continues réalisées dans des conditions très différentes. La valeur de consigne est modifiée entre 0,02 et 1 g/l (la valeur de référence est de 0,2 g/l). Pour la **figure E 38 a**, le milieu initial contient du glucose (19 g/l) et de l'APA (1,2 g/l). Les concentrations de ces 2 substrats sont contrôlées respectivement à 1 g/l et 0,3 g/l. Pour la **figure E 38 b**, la culture est réalisée sans glucose et pour l'APA la



**Figure E 39 :** Influence de la concentration de consigne en APA sur les concentrations en biomasse et en PA ainsi que sur la production spécifique (temps d'étude : 15ème, 25ème, 35ème et 45ème heure).

Les concentrations initiales en glucose sont de 0 g/l (a), 5 g/l (b) et 19 g/l (c).

concentration initiale et la valeur de consigne sont respectivement de 1,2 g/l et 3 g/l. Quelles que soient les conditions de culture, la concentration de consigne en ions ammonium n'a pas ou très peu d'influence sur les performances. En effet, une concentration de 0,02 g/l en ions ammonium n'est pas limitante. Lorsque la concentration de consigne en ions ammonium s'écarte légèrement de 0,2 g/l, les performances baissent très faiblement. Une concentration de consigne de 0,2 g/l est optimale. Cette valeur sera utilisée pour la suite de l'étude.

### *III.1.2. - Etude de l'influence du contrôle de la concentration en acide phénylacétique dans le milieu de culture sur la croissance et la production de pénicilline acylase*

Dans cette partie, nous exposons 3 analyses de sensibilité de la croissance et de la production de PA à la concentration de consigne en APA. Différentes conditions de cultures sont testées, mais dans tous les cas, le glucose est absent du milieu de culture de manière à étudier l'influence de la concentration de consigne en APA.

➔ La **figure E 39** représente l'influence de la concentration de consigne en APA sur la biomasse, la PA et la production spécifique en PA pour 3 fermentations semi-continues réalisées avec initialement 0 (a), 5 (b), et 19 g/l (FB n° 6) (c) de glucose. La consigne pour l'APA est modifiée entre 0,03 et 1,5 g/l (la valeur de référence est de 0,3 g/l). Quel que soit le temps d'étude, une augmentation ou une diminution de la concentration de référence en APA (0,3 g/l) a un effet négatif sur la production de biomasse et de PA. La production spécifique en enzyme et la concentration de consigne en APA varient de la même façon. La concentration initiale en glucose n'a pas d'influence sur les résultats de l'analyse de sensibilité.

La concentration de consigne en APA de 0,3 g/l permet d'obtenir la meilleure production de biomasse et d'enzyme. Lorsque cette valeur est dépassée, et notamment lorsqu'elle est supérieure à 0,5 g/l (valeur de la constante d'inhibition de la consommation du glucose par l'APA), la croissance et la production de PA sont diminuées. Une consigne en APA de 1,5 g/l permet d'obtenir une production spécifique en PA plus élevée.

### *III.1.3. - Etude de l'influence du contrôle de la concentration en glucose dans le milieu de culture sur la croissance et la production de pénicilline acylase*

Nous utilisons pour cette étude une concentration de consigne en APA de 1,5 g/l, car dans ces conditions, la production de biomasse et de PA ne dépend pas de la concentration en APA. Les mêmes conditions de culture initiales sont employées pour étudier l'influence de la concentration de consigne en glucose sur la biomasse, la PA et la production spécifique en enzyme.

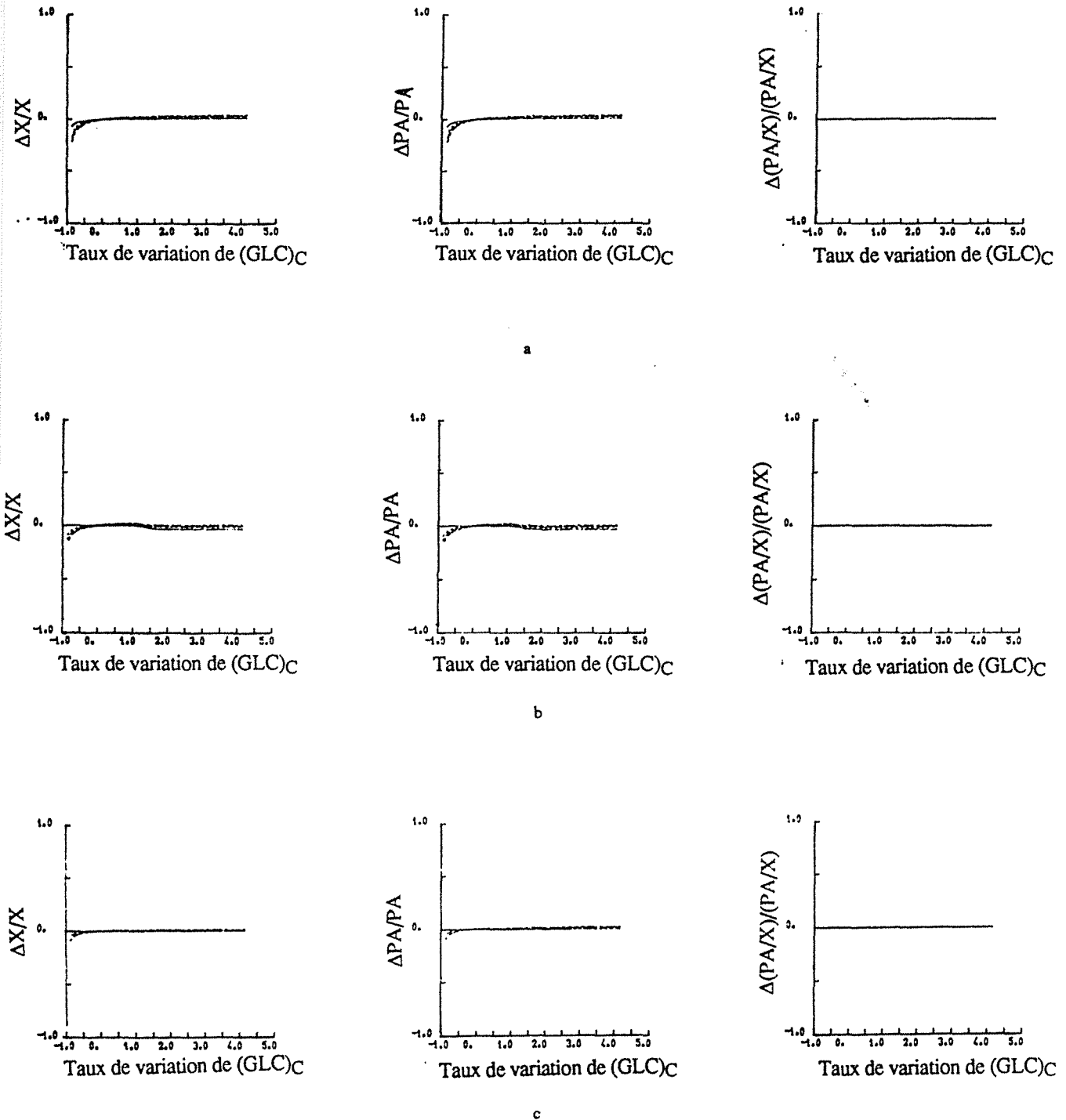


Figure E 40 : Influence de la concentration de consigne en glucose sur les concentrations en biomasse et en PA ainsi que sur la production spécifique (temps d'étude : 15ème, 25ème, 35ème et 45ème heure).

Les concentrations initiales en glucose sont de 0 g/l (a), 5 g/l (b) et 19 g/l (c).

➔ La figure E 40 représente les sensibilités de la biomasse, de la PA et de la production spécifique en enzyme à la concentration de consigne en glucose pour 3 fermentations semi-continues réalisées contenant initialement 0 (a), 5 (b), et 19 g/l (c) de glucose. La consigne pour le glucose est modifiée entre 0,2 et 10 g/l (la valeur de référence est de 2 g/l). Nous constatons que les concentrations initiale et de consigne en glucose n'ont pas d'influence sur les performances des cultures semi-continues.

#### III.1.4. - Conclusion

Suite à cette première étude de l'influence des concentrations de consigne en ions ammonium, en glucose et en APA sur la production de biomasse, d'enzyme et la production spécifique en PA, nous constatons que :

- ☞ la concentration de consigne optimale en ions ammonium est de 0,2 g/l,
- ☞ une concentration de consigne en APA de 0,3 g/l permet de maximiser les concentrations en biomasse et en PA,
- ☞ une augmentation de la concentration de consigne en APA permet d'améliorer la production spécifique en PA,
- ☞ dans la mesure où le milieu de culture contient de l'APA, les concentrations initiale et de consigne en glucose n'ont pas d'influence sur les performances de la souche G271.

A partir de ces résultats, des fermentations semi-continues sont simulées afin de comparer les performances obtenues en fonction du mode d'alimentation.

#### III.2. - Résultats des simulations de cultures semi-continues avec un contrôle des concentrations en substrats dans le milieu de fermentation

Des fermentations semi-continues sont simulées afin de tester des nouvelles conditions de culture et différents types d'alimentation. Le temps d'étude est de 45 heures.

➔ Les performances, les quantités des différents substrats ajoutés et les volumes finaux sont reportés dans le tableau E 6. Les résultats de la première partie du tableau ont été obtenus pour des fermentations semi-continues réalisées avec initialement 1,2 g/l d'APA (FB n°6). Trois concentrations initiales en glucose sont testées : 19 (FB n°6), 5 et 0 g/l. Dans la deuxième partie du tableau, deux concentrations initiales en APA sont testées : 0 et 4 g/l. La concentration initiale en glucose est constante (19 g/l).





**TEMPS FINAL : 45 h**  
**CONCENTRATION CONSIGNE EN AMMONIUM : 0,2 g/l**

**concentration initiale en APA : 1,2 g/l**

concentration initiale en glucose (g/l)	CONSIGNES glucose	CONSIGNES (g/l)		BIOMASSE (g/l)	PA (U/l)	PA/X (U/g)	SUBSTRAT AJOUTE (g)			VOLUME FINAL (l)
		APA					Glucose	APA	ammonium	
<b>19</b>	0	0,29		13,2	1 844	139	0	361	29	15,4
	0	1,45		8,7	1 346	155	0	371	16	14,6
<b>A</b>	1	0,29		17,8	2 483	140	700	432	36	17,7
	<b>B</b>	5	0,29	18,1	2 526	140	834	440	37	18,1
	5	1,45		8,7	1 346	155	0	371	16	14,6
<b>5</b>	0	1,45		8,6	1 337	155	0	371	16	14,7
	5	1,45		8,5	1 325	155	0	371	16	14,9
<b>C</b>	0	0,29		9,8	1 359	139	0	250	19	13,7
	5	0,29		17,8	2 488	140	960	437	37	18,3
<b>0</b>	0	1,45		8,5	1 321	155	0	369	16	14,8
	0	0,29		7,5	1 035	139	0	174	12	12,5
<b>D</b>	5	1,45		8,5	1 325	155	0	371	16	14,9
	5	0,29		17,8	2 479	139	960	437	37	18,3
<b>E</b>	10	0,29		17,8	2 484	140	1 019	441	37	18,5
<b>F</b>	0	3,00		8,8	1 415	161	0	449	18	15,7
	1	1,45		8,6	1 327	155	0	371	16	14,8
<b>G</b>	1	3,00		8,8	1 414	161	0	449	18	15,7

**concentration initiale en glucose : 19 g/l**

concentration initiale en APA (g/l)	CONSIGNES glucose	CONSIGNES (g/l)		BIOMASSE (g/l)	PA (U/l)	PA/X (U/g)	SUBSTRAT AJOUTE (g)			VOLUME FINAL (l)
		APA					Glucose	APA	ammonium	
<b>0</b>	<b>H</b>	5	0	19,6	2 317	118	837	158	35	15,2
<b>4</b>	<b>I</b>	5	0	17,9	2 370	133	623	122	28	14,0

**Tableau E.6 :** Résultats des simulations des fermentations semi-continues avec un contrôle des concentrations en glucose, en acide phénylacétique et en ions ammonium.

	batch réf.	glc+APA FB n° 5	APA FB n° 6	FB A	FB B	FB C	FB D	FB E	FB F	FB G	FB H	FB I
Coût du batch (F/l)	2,9	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,3	3,3	3,3	3,3	3,4	3,5
Coût du batch (F)	2,9	34,0	34,0	34,0	33,0	33,0	33,0	33,0	34,0	35,0	34,0	35,0
Glucose ajouté (g)	0,0	500,0	0,0	699,0	833,0	960,0	960,0	1019,0	0,0	0,0	836,8	623,0
Glc. ajouté (F)	0,0	2,8	0,0	3,8	4,6	5,3	5,3	5,6	0,0	0,0	4,6	3,4
APA ajouté (g)	0,0	100,0	100,0	432,0	439,8	437,0	437,0	441,0	449,0	449,0	158,0	122,0
APA ajouté (F)	0,0	1,2	1,2	5,3	5,4	5,3	5,3	5,4	5,5	5,5	1,9	1,5
(NH4)2SO4 ajouté (g)	0,0	52,9	0,0	132,4	135,8	134,7	134,7	136,6	65,3	65,3	127,6	101,6
(NH4)2SO4 ajouté (F)	0,00	0,04	0,00	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,05	0,05	0,10	0,08
Coût de l'alim. (F)	0,0	4,0	1,2	9,2	10,1	10,7	10,7	11,1	5,6	5,6	6,6	5,0
Coût de la ferm. (F)	2,9	38,0	35,2	43,2	43,1	43,7	43,7	44,1	39,6	40,6	40,6	40,0
durée de la ferm. (h)	24	39	24	46	46	46	46	46	46	46	46	46
volume final (l)	1,0	11,2	11,0	17,7	18,1	18,3	18,3	18,5	15,7	15,7	15,2	14,0
enzyme fin (U/l)	2 653	1 960	2 800	2 483	2 526	2 488	2 479	2 484	1 415	1 414	2 317	2 370
biomasse fin (g/l)	4,5	15,0	17,6	17,8	18,1	17,8	17,8	17,8	8,8	8,8	19,6	17,9
enzyme (U)	2 653	21 952	30 800	43 949	45 721	45 530	45 366	45 954	22 216	22 200	35 218	33 180
prod. vol. en PA(U/h)	111	50	117	54	55	54	54	54	31	30,7	50,4	51,5
prod. spécifique (U/g X)	590	131	159	139	140	140	139	140	161	161	118	132
coût en mat.premières(cts/U)	0,11	0,17	0,11	0,10	0,09	0,10	0,10	0,10	0,18	0,18	0,12	0,12

**Tableau E 7 :** Performances obtenues pour des fermentations discontinues et semi-continues (expérimentales et simulées).

➤ En grisé : fermentations expérimentales (batch ref. : fermentation discontinue de référence).

➤ FB A, B, C, D, E, F, G, H et I : fermentations semi-continues simulées (conditions de culture Tab. E 6).

→ Pour une concentration initiale en glucose de 19 g/l, la meilleure concentration finale en PA est obtenue avec des valeurs de consigne pour le glucose de 1 ou 5 g/l et de 0,3 g/l pour l'APA. Dans les mêmes conditions, les meilleures productions spécifiques (155 U/l) sont obtenues avec des concentrations de consigne en glucose de 1 et 5 g/l et de 1,45 g/l en APA. Pour des concentrations initiales en glucose de 0 et 5 g/l les mêmes résultats sont obtenus.

Les plus fortes concentrations en PA sont obtenues avec une concentration de consigne en APA de 0,3 g/l (A-B-C-D-E). Les meilleures productions spécifiques sont atteintes en utilisant des consignes plus élevées pour la concentration en inducteur (F-G).

→ Pour une fermentation réalisée sans APA, la concentration finale en APA est de 2300 U/l (H). Les performances atteintes sont semblables pour une concentration initiale en inducteur de 4 g/l et une alimentation sans APA (I).

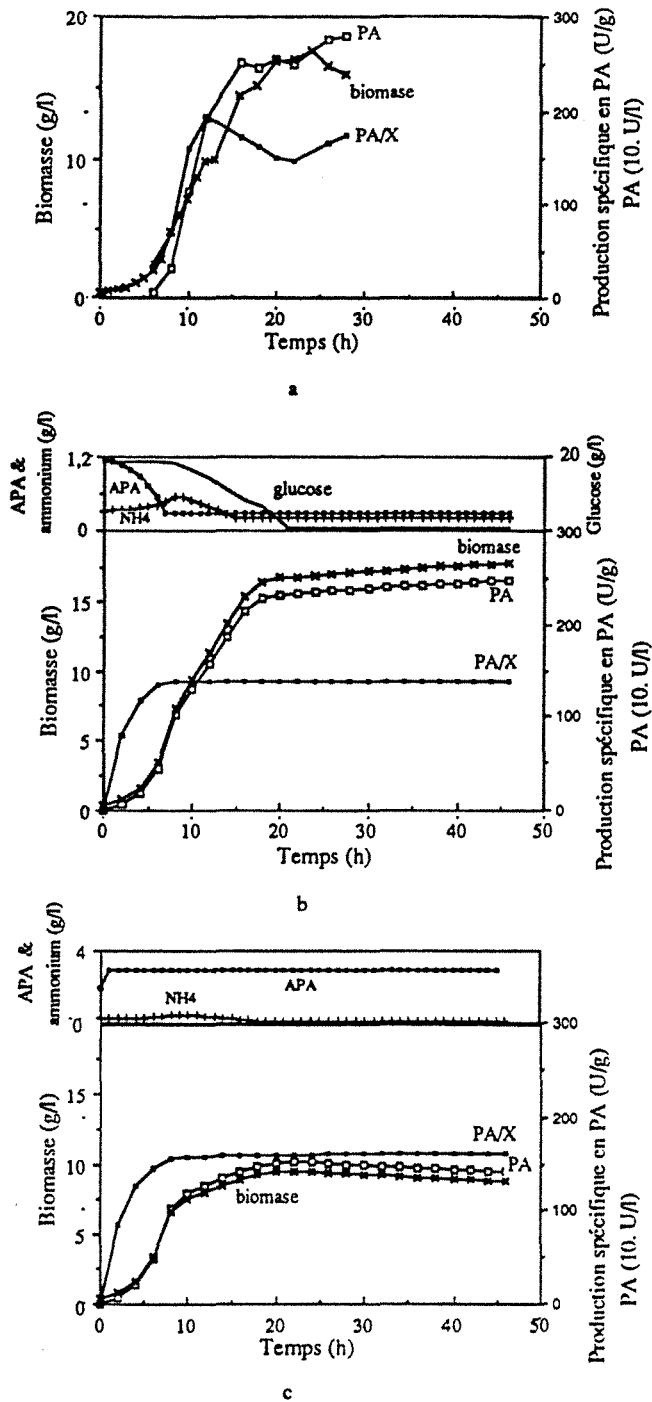
En conclusion, il ressort de cette étude que les conditions d'alimentation sont choisies en fonction du critère à optimiser. Une augmentation de la concentration de consigne du glucose permet d'augmenter les concentrations finales en biomasse et en enzyme mais pas de la production spécifique en PA. Une alimentation contenant de l'APA et éventuellement une faible quantité de glucose permet d'améliorer la production spécifique en PA.

### III.3. - Conclusion : détermination des conditions optimales d'alimentation

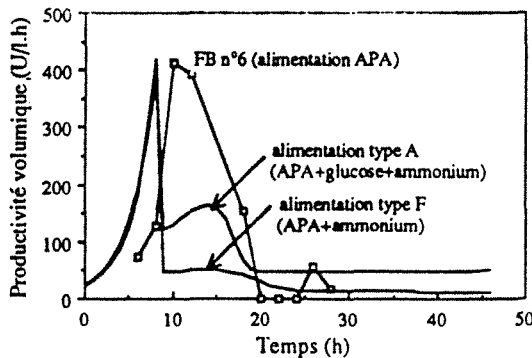
#### III.3.1. - *Comparaison des performances obtenues expérimentalement et théoriquement*

A partir des résultats des simulations des cultures semi-continues, les fermentations les plus intéressantes ont été sélectionnées (A-B-C-D-E-F-G-H-I). Les performances des fermentations théoriques sont comparées aux performances des fermentations réalisées expérimentalement en réacteurs semi-continu et discontinu. Les critères de comparaison sont : la productivité volumique en enzyme, la production spécifique en PA, les concentrations finales en biomasse et en PA ainsi que le coût en matières premières.

→ Les résultats sont reportés dans le tableau E 7. Les productions volumiques en PA des fermentations théoriques sont très faibles (A à I). Les productions spécifiques en PA pour les fermentations simulées sont équivalentes (A-B-C-D-E-H-I) voire même supérieures (F-G) à celle obtenues avec les fermentations semi-continues où une alimentation mixte de glucose et d'APA (FB n°5) voire d'APA seul sont utilisées (FB n°6). Les productions spécifiques des fermentations semi-continues simulées restent très inférieures à celles obtenues en culture



**Figure E 41 :** Evolution de la croissance, de la production de PA et de la production spécifique en enzyme pour 3 fermentations semi-continues :  
 (a) : fermentation semi-continue alimentée avec de l'APA (FB n°6),  
 (b) : fermentation semi-continue simulée alimentée avec de l'APA, du glucose et des ions ammonium (type A),  
 (c) : fermentation semi-continue simulée alimentée avec de l'APA et des ions ammonium (type F).



**Figure E 42 :** Evolution de la productivité volumique en PA pour 3 fermentations semi-continues.  
 > FB n°6 : fermentation semi-continue alimentée avec de l'APA,  
 > type A : fermentation semi-continue simulée alimentée avec de l'APA, du glucose et des ions ammonium,  
 > type F : fermentation semi-continue simulée alimentée avec de l'APA et des ions ammonium.

discontinue. Les coûts en matières premières de production de l'enzyme des fermentations théoriques et expérimentales sont comparables. Lorsque la concentration de consigne en APA est plus importante (F-G), le coût en matières premières de production de l'enzyme ainsi que la production spécifique en PA sont plus élevés.

Il apparaît donc deux types d'alimentation permettant d'obtenir des performances différentes :

- une alimentation de type F, contenant que de l'APA et des ions ammonium, favorable à la production spécifique,
- une alimentation de type A, contenant de l'APA, des ions ammonium et du glucose en faible quantité, favorable à la croissance et la production de PA. Ce type d'alimentation permet de diminuer le coût en matières premières de production de la PA.

### *III.3.2. - Conclusion : détermination des conditions optimales d'alimentation*

Nous prenons comme référence, la culture semi-continue réalisée avec une alimentation ne contenant que de l'APA (FB n°6), qui a permis d'atteindre des performances intéressantes.

➡ La figure E 41 (a, b et c) représente l'évolution de la croissance, de la production de PA et la production spécifique en enzyme pour les fermentations semi-continues obtenues par simulation de type A (alimentation mixte APA et glucose) et F (alimentation en APA seulement) ainsi que pour la fermentation de référence (FB n°6). Pour la culture semi-continue théorique alimentée avec de l'APA et du glucose (type A), la croissance et la production enzymatique sont comparables à celles de la fermentation de référence. A partir de la 20ème heure de culture la croissance et la production enzymatique sont très faibles, la production spécifique en PA se stabilise à 140 U/g. Pour la fermentation obtenue par simulation, avec une alimentation en APA (type F), la croissance et la production de PA s'arrêtent dès la 15ème heure de fermentation. La production spécifique est constante à partir de la 10ème heure de culture (160 U/g). Pour la fermentation de référence, la croissance et la production de PA s'arrêtent à partir de la 20ème heure, lorsque les ions ammonium sont épuisés.

➡ La figure E 42 décrit l'évolution de la production volumique en PA au cours de ces 3 fermentations. Dans tous les cas, la production volumique en PA chute aux alentours de la 10ème heure de culture. Cette baisse est plus importante pour la culture semi-continue obtenue par simulation avec une alimentation en APA (type F) : à la 10ème heure elle est de 50 U/l.h et à la 20ème heure elle diminue encore jusqu'à 10 U/l.h. Pour la fermentation théorique alimentée avec du glucose et de l'APA (type A), la productivité volumique en enzyme se stabilise à 50 U/l.h à

partir de la 20<sup>ème</sup> heure de culture. Entre la 10<sup>ème</sup> et la 20<sup>ème</sup> heure la productivité volumique en PA se maintient à 120 U/l.h. Pour la fermentation de référence, la productivité volumique en PA chute moins rapidement, cependant, à la 20<sup>ème</sup> heure de culture elle est nulle.

Les résultats exposés dans cette partie sont théoriques et limités par les hypothèses du modèle. Une concentration consigne de 10 g/l en APA permettrait d'obtenir théoriquement une production spécifique très élevée alors que pratiquement la souche ne pourrait pas pousser. Connaissant les limites du modèle, nous pouvons l'utiliser de façon prédictive et confirmer ensuite expérimentalement les résultats théoriques. En conclusion, nous constatons que la stratégie d'alimentation optimale pour une culture semi-continue consiste à alimenter séparément le fermenteur avec de l'APA, du glucose et des ions ammonium de manière à contrôler les concentrations dans le milieu de culture de ces 3 substrats respectivement à 0,3 g/l, 1 g/l et 0,2 g/l.

---

*CONCLUSION & PERSPECTIVES*

---





## CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les objectifs de ce travail étaient multiples :

- ⇒ déterminer les conditions de culture favorables à la production de PA par la souche *E. coli* G271,
- ⇒ étudier l'influence du plasmide sur le métabolisme de la souche hôte,
- ⇒ analyser le comportement de la souche *E. coli* G271 et étudier la stabilité du vecteur,
- ⇒ établir un modèle mathématique pour la culture en milieu complexe d'*E. coli* G271,
- ⇒ comparer les performances de la souche en cultures discontinue, semi-continue et continue,
- ⇒ développer une méthodologie pour l'estimation des paramètres.

Nous allons reprendre point par point les résultats obtenus et les contributions apportées par ce travail. Finalement nous terminerons par les perspectives envisageables à ce travail.

### Etude des conditions de culture pour la production de PA :

La production de PA par une souche d'*E. coli* est généralement induite par l'APA et réprimée par le glucose, des températures élevées ou une forte aération. Des concentrations en APA importantes peuvent inhiber la croissance. Pour la souche *E. coli* G271 qui a été mutée et transformée par le plasmide pXL20 (contenant le gène de la PA), nous confirmons le rôle de certains paramètres :

- L'APA induit la production de PA et une concentration supérieure à 2 g/l inhibe la croissance.
- A 37°C, la souche *E. coli* G271 ne produit pas d'enzyme.

L'étude de la production de PA a été complétée pour la souche *E. coli* G271, ainsi, nous avons mis en évidence plusieurs phénomènes :

- La souche G271 produit de la PA en présence de glucose. Une concentration initiale de 5 g/l est optimale.
- La présence d'une source organique complexe dans le milieu est nécessaire à la production de PA, l'utilisation de la peptone est préférable à celle de l'extrait de levure.
- Le pH optimum pour la production de PA est de 7.
- Le pH du milieu de culture a une influence sur la répartition de l'enzyme entre les milieux intracellulaire et extracellulaire.

Cette étude nous a permis d'améliorer la production spécifique par un facteur 8, en 24 heures de culture en réacteur, nous obtenons 2500 U/l de PA et 5 g/l de biomasse.

#### **☞ Influence du plasmide sur le métabolisme de la souche hôte :**

L'introduction d'un plasmide dans une cellule hôte perturbe son métabolisme. En effet, la réplication de l'ADN plasmidique et l'expression des gènes portés par le vecteur utilisent le même arsenal enzymatique que la cellule hôte. En accord avec les résultats de la littérature, nous avons montré que la souche recombinée (*E. coli* G271) était caractérisée par un taux de croissance maximum plus faible que la souche mère. D'autre part, nous précisons que la souche G271 s'adapte plus lentement que la souche sauvage à des changements de composition du milieu de culture. Le travail de comparaison entre la souche sauvage et recombinée nous a permis de quantifier de façon originale le fardeau métabolique que représente le plasmide pour la cellule. La souche recombinée consomme plus rapidement les substrats mais avec un rendement plus faible que la souche mère. La présence du vecteur entraîne une modification des flux de substrats dans la cellule. La synthèse de la PA représente un surplus métabolique pour la cellule hôte plus important que la replication du plasmide.

#### **☞ Analyse du comportement de la souche *E. coli* G271 cultivée sur milieu complexe :**

Le milieu utilisé contient du glucose, de l'APA et une source organique complexe qui est de la peptone auquel nous ajoutons parfois de l'extrait de levure. L'analyse des cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de la PA nous a permis de déterminer les phénomènes primordiaux régissant le comportement de la souche G271 cultivée en discontinu, semi-continu et en continu. Les principaux substrats identifiés ont été séparés en une source de carbone et une source d'azote. La peptone est divisée en 3 composants : les acides aminés, les peptides et une fraction azotée non assimilable. La source de carbone est représentée par les acides aminés, le glucose et l'APA. Les ions ammonium et les peptides constituent la source d'azote. La croissance biphasique de la souche est limitée par les sources de carbone et d'azote. Le contenu plasmidique est stable pendant 50 générations. En culture continue, une augmentation du taux de dilution, une concentration élevée en peptone dans l'alimentation ou un ajout de tétracycline (marqueur pour le plasmide pXL20) permettent de stabiliser le vecteur. La production de PA est associée à la croissance tant que le contenu plasmidique est stable. La consommation de la fraction aminée de la peptone comme source de carbone entraîne une production d'ions ammonium. La fraction peptidique et les ions ammonium sont consommés comme source d'azote en même temps

que le glucose et l'APA. La consommation du glucose est inhibée par l'APA.

### Modélisation :

➤ Un modèle mathématique a été proposé permettant de simuler le comportement de la souche *E. coli* G271 dans les 3 modes de culture. Dans la littérature les modèles élaborés pour des fermentations sur milieu complexe considèrent que la croissance est limitée par un voire deux substrats (glucose ou sucres totaux et les ions ammonium). Dans notre cas, nous avons suivi une approche différente en considérant des "flux de synthèse" pour chaque substrat, c'est-à-dire la contribution de chacun d'eux à la croissance. Ainsi, nous avons exprimé la croissance en fonction des "flux de synthèse" carboné et azoté. Les interactions entre les substrats ont été introduites dans l'expression des lois de consommation de chacun d'eux. L'ajout d'extrait de levure dans le milieu de culture a été modélisé par une modification des pourcentages représentant chaque fraction.

➤ D'autre part, une méthodologie est proposée pour estimer les paramètres cinétiques du modèle. L'analyse de sensibilité des variables d'état aux paramètres du modèle est employée de manière à déterminer qualitativement et quantitativement l'influence des paramètres sur les variables d'état. Cette étude permet de définir pour chaque variable d'état des zones où l'influence des paramètres est maximale. Les paramètres du modèle sont une première fois calculés pour certains d'entre eux et estimés pour les autres. Les résultats de l'analyse de sensibilité sont employés pour corriger cette première estimation.

➤ Finalement, le modèle a été testé sur des cultures discontinues, semi-continues et continues. Il permet de simuler correctement :

- la croissance biphasique sur les différentes sources de carbone et d'azote compétitives,
- la consommation séquentielle des substrats,
- la production et la consommation des ions ammonium,
- le comportement de la souche dans les 3 modes de culture.

Cependant, le modèle ne prend pas en compte la variation du contenu plasmidique et de ce fait, la simulation de la production de PA en culture continue n'est pas satisfaisante.

### Les performances de la souche *E. coli* G271 :

Le mode de culture discontinue permet d'obtenir la production spécifique en PA la plus

élevée. Cependant, en culture semi-continue avec une alimentation en APA, nous obtenons les mêmes productivités volumiques qu'en culture semi-continue et en 24 heures de culture, la concentration en PA est 10 fois plus élevée qu'en culture discontinue.

Une alimentation mixte contenant du glucose et de l'APA se traduit par une diminution de la production de PA (production spécifique et productivité volumique). En fonction du critère à optimiser, il est donc possible de choisir le mode de culture adéquat.

### Perspectives :

➤ D'après les résultats précédemment obtenus, il serait intéressant d'approfondir l'étude de la synthèse de la PA et de compléter certaines observations concernant la croissance. Le modèle mathématique proposé pourrait ainsi être amélioré.

→ L'influence de la peptone sur le contenu plasmidique pourrait être approfondie en effectuant des dosages du contenu plasmidique. Un suivi des cinétiques de disparition des acides aminés permettrait de mettre en évidence une relation entre la production de PA et la qualité de la source organique complexe utilisée. Une meilleure connaissance de l'induction de la PA par l'APA permettrait de préciser la loi de production de la PA.

→ La loi de croissance pourrait être complétée en introduisant un terme d'inhibition par l'APA. Une division de la biomasse en une population active (consommant les substrats et se multipliant) et une population "latente" (ne consommant pas de substrat et ne se multipliant pas) permettrait de simuler la phase de latence. La vitesse de transition entre ces deux types de cellules pourrait être corrélée à la taille de l'inoculum, permettant ainsi de simuler des phases de latence plus ou moins longues.

➤ D'autre part, il serait intéressant de compléter la méthode proposée pour estimer les paramètres du modèle en introduisant une fonction qui permettrait d'évaluer la capacité prédictive du modèle.

➤ Finalement, il serait souhaitable de tester expérimentalement les conditions de cultures optimales déterminées à l'aide du modèle.

---

*ABREVIATIONS*

---



## ABREVIATIONS

AA	: acides aminés
ADN	: acide désoxyribonucléique
APA	: acide phénylacétique
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ATP	: adénosine triphosphate
CPG	: chromatographie gazeuse
D	: taux de dilution (h-1)
GLC	: glucose
HPLC	: chromatographie liquide haute performance
K	: constante
Kb	: kilobase (1000 bases)
K <sub>I</sub>	: constante d'inhibition (g/l)
K <sub>S</sub>	: constante d'affinité pour S (g/l)
lac	: lactose
m <sub>S</sub>	: consommation non associée à la croissance de S (vitesse spécifique en h-1)
NIPAB	: acide 6-nitro-3-aminobenzoïque
np	: nombre de copies de plasmides par cellule
PA	: pénicilline acylase
pb	: paire de bases
PE	: peptides
PEP	: peptone
PN	: peptone non assimilable
RPM	: tour par minute
r <sub>S</sub>	: vitesse de consommation de S (g/l.h)
[S]	: concentration en S (g/l)
[S] <sub>0</sub>	: concentration initiale en S (g/l)
trp	: tryptophane
vvm	: volume/volume/minute
Y <sub>A/B</sub>	: rendement de conversion de B en A

**Alphabet grec :**

$\alpha, \alpha'$  : constantes

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance (h-1)

$\mu_{\max}$  : vitesse spécifique maximum de croissance (h-1)

$\gamma_S$  : vitesse spécifique de consommation de S (h-1)

$\gamma_S^{\max}$  : vitesse spécifique maximum de consommation de S (h-1)

$\Pi_P$  : vitesse spécifique de production de P (h-1)

$\Pi_P^{\max}$  : vitesse spécifique maximum de production de P (h-1)



---

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---



## BIBLIOGRAPHIE

- Aiba S. et Koizumi J. I., *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1026 - 1031, (1984).
- Aiba S., Tsunekawa H. et Imanaka T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 2, 289 - 297, (1982).
- Aisaka K., Tamura S., Arai Y. et Uwajima T., *Biotechnol. Lett.*, **9**, 9, 633 - 637, (1987).
- Alexander P., Oriel P. J., Glassner D. A. et Grulke E. A., *Biotechnol. Lett.*, **2**, 9, 609 - 614, (1989).
- Andersen K. B. et Von Meyenburg K., *J. Bacteriol.*, **144**, 114 - 123, (1980).
- Anicetti V. R., Keyt B. A. et Hancock W. S., *Trends Biotechnol.*, **7**, 342 - 349, (1989).
- Arbige M. V. et Pitcher W. H., *Trends Biotechnol.*, **7**, 330 - 335, (1989).
- Bailey J. E. et Ollis D. F., *Biochemical engineering fundamentals* (second edition). McGraw-Hill Book company, (1986).
- Baneyx F. et Georgiou G., *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 559 - 567, (1989).
- Batchelor F.R., Chain E. B., Richards M. et Robinson G. N. , *Proc. R. Soc. London*, **154**, 522 - 531, (1961).
- Bauer S. et Shiloach J., *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 933 - 941, (1974).
- Bauer S. et White M. D., *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 839 - 846, (1976).
- Bauer S. et Ziv E., *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 81 - 94, (1976).
- Beisman H. B., *Economic analysis of fermentation processes*. CRC Press, (1988).
- Berthier-Bayle Y., *Biofutur*, **85**, 58 - 59, (1989).
- Bibal B., Vayssier Y., Tournon M. and Pareilleux A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 630 - 635, (1989).
- Bihari V. et Buchholz K., *Indian J. Exp. Biol.*, **21**, 27 - 30, (1983).
- Birbaum S., Bülow L., Hardy K. et Mosbach K., *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 601 - 605, (1988).
- Bock A., Wirth R., Schmid G., Schumacher G., Lang G. et Buckel P., *FEMS Microbiol. Lett.*, **20**, 141 - 144, (1983).
- Brow S. W., Meyer H. P. et Fiechter A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 5 - 9, (1985).
- Bruns W., Hoppe J., Tsai H., Bruning H. S., Maywal F., Collins J et Mayer H., *J. Mol. Appl. Genet.*, **3**, 36 - 44, (1985).

- Cachon R., D.E.A. INPL, (1988).
- Caulcott C. A. et Rhodes M., *Trends Biotechnol.*, **4**, 142 - 146, (1986).
- Caulcott C.A., Lilley G., Wright E. M., Robinson M. K. et Yarranton G., *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 3355 - 3365, (1985).
- Caunt P., Impoolsup A. et Greenfield P. F., *J. Biotechnol.*, **8**, 173 - 192, (1988).
- Chiang C. et Bennett R. E., *J. Bacteriol.*, **93**, 302 - 308, (1967).
- Ching T. I., Okos M. R. et Yang S. T., *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1063 - 1074, (1989).
- Claridge C. A., Gourevitch A. et Lein J., *Nature*, **187**, 237 - 238, (1960).
- Cole M., *Biochem. J.*, **115**, 733 - 739, (1969 a).
- Cole M., *Biochem. J.*, **115**, 747 - 756, (1969 b).
- Cutayar J. M. et Poillon D., *Biotechnol. Lett.*, **11**, 3, 155 - 160, (1989).
- Dabora R. L., Eberiel D. T. et Cooney C. L., *Biotechnol. Lett.*, **11**, 12, 845 - 850, (1989).
- Daumy G. O., Danley D. et McColl A. S., *J. Bacteriol.*, **163**, 3, 1274 - 1281, (1985).
- Da Silva A. N. et Bailey J. E., *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 741 - 746, (1986).
- Davies J., *Trends Biotechnol.*, **6**, 4, S1- S49, (1988).
- Davis B. D., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **35**, 1,1 - 10, (1949).
- De Fernandez E. et Dhurjati P., *Bioprocess Eng.*, **3**, 141 - 145, (1988).
- Dennis K., Srienc F. and Bailey J. E., *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1490 - 1494, (1985).
- Dodet B., *Biofutur*, **91**, 20 - 29, (1990).
- Doelle H. W., *Advances in Biotechnology*. Edition Pergamon Press., **1**, 249 - 254, (1981).
- Domach M. M, Leung S. K., Cahn R. E., Cooks G. G. et Shuler M. L., *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 203 - 216, (1984).
- Engberg B. et Nordström K., *J. Bacteriol.*, **23**, 1, 179 - 186, (1975).
- Ensley B. D., *Critical Rev. Biotechnol.*, **4**, 263 - 277, (1986).
- Furman T. C., Epp J., Hsiung H. M., Hoskins J. A., Long G. L., Mendelsohn L. G., Schoner B., Smith D. P. et Smith M. C., *Bio/Technology*, **5**, 1047 - 1051, (1987).
- Gang D. M. et Shaikh K., *Biochim. Biophys. Acta N*, **425**, 110 - 114, (1976).

- Gareis H., *Le Génie Génétique plus qu'une simple méthode*. Edition du Parc (Höchst), (1989).
- Gearing D. P., Nicola N. A., Metcalf D., Foote S., Wilson T. A., Gough N. M. et Williams L., *Bio/Technology*, **7**, 1157 - 1161, (1989).
- Gebauer A., Scheper T. et Schugerl K., *Bioprocess Eng.*, **2**, 55 - 58, (1987).
- Georgiou G., Palumbo T., Wilson D. B. et Shuler M. L., *Biotechnol. Lett.*, **10**, 6, 377 - 382, (1988).
- Gerdes K., *Bio/Technology*, **6**, 1402 - 1405, (1988).
- Gleiser I. E. et Bauer S., *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1015 - 1021, (1981).
- Godwin D. et Slater J. H., *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 201 - 210, (1979).
- Golub E. et Bel'Kind A. M., *Mikrobiologiya*, **46**, 363 et suiv., (1977).
- Gottschalk G., *Bacterial Metabolism* (second edition). Springer Verlag, (1979).
- Greenfield L., Dovey H. F., Lawyer F. C. et Gelfand D. H., *Bio/Technology*, **4**, 1006 - 1011, (1986).
- Harder A. et Roels J. A., *Advances in Biochemical Engineering*. Fiechter ed., Springer Verlag, Berlin, **21**, 55 - 107, (1982).
- Harder W. et Dijkhuisen L., *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 1 - 23, (1983).
- Harrison F. G. et Gibson E. D., *Process Biochem.*, **19**, 1, 33 - 36, (1984).
- Helling R. B., Kinney T. et Adams J., *J. Gen. Microbiol.*, **123**, 129 - 141, (1981).
- Holms W. H. et Bennett, *J. Gen. Microbiol.*, **65**, 57 - 68, (1971).
- Hopkins D. J., Betengaugh M. J. et Dhurjati P., *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 85 - 91, (1987).
- Hsiung H. M., Mayne N. G. et Becker G. W., *Bio/Technology*, **4**, 991 - 995, (1986).
- Huang H.T., English A. R., Seto T. A., Shull G. M. et Sobin B. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3790 - 3791, (1960).
- Husted H., Kroner K. H., Menge U. et Kula M. R., *Trends Biotechnol.*, **3**, 6, 139 - 144, (1985).
- Iijima S., Kawai S., Mizutani S., Taniguchi M. et Kobayashi T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 542 - 545, (1987).
- Imanaka T. et Aiba S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **369**, 1 - 14, (1981).
- Iversen L. J. J., *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 352 - 362, (1987).
- Jones S. A. et Melling J., *FEMS Microbiol. Lett.*, **22**, 239 - 243, (1984).

- Jones S. A., Dearnley K., Bennett P. H. et Melling J., *Soc. for Gen. Microbiol.*, **8**, 44,144, (1980).
- Joshi A. et Palsson B. O., *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 102 - 116, (1988).
- Jung G., Denèfle P., Becquart J. et Mayaux J. F., *Ann. Inst. Pasteur*, **139**, 129 - 146, (1988).
- Kadam K. L., Wollweber K. L., Grooch J. C. et Jao Y. C., *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 859 - 872, (1987).
- Kahru A., Paalme T. et Vilu R., *FEMS Microbiol. Lett.*, **41**, 305 - 308, (1987).
- Kashket E. R., *Ann. Rev. Microbiol.*, **39**, 219 - 42, (1985).
- Kaufman W. et Bauer K., *Naturwissenschaften*, **47**, 474 - 475, (1960).
- Klein J. et Wagner F., *Enzyme Eng.*, **5**, 535, (1980).
- Kleinman M. J., Gingold E. B. et Stanbury P., *Biotechnol. Lett.*, **8**, 4, 225 - 230, (1986).
- Koizumi J. I. et Aiba S., *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 311 - 313, (1986).
- Koizumi J. I., Monden Y. et Aiba S., *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 721 - 728, (1985).
- Kole M. M., Thompson B. G. et Gerson D. F., *J. Ferment. Technol.*, **63**, 2, 211 - 214, (1985).
- Kole M. M., Ward D. et Gerson D. F., *J. Ferment. Technol.*, **64**, 3, 233 - 238, (1986).
- Koller K. P., Reiß G., Sauber K., Uhlman E. et Wallmeier H., *Bio/Technology*, **7**, 1055 - 1059, (1989).
- Kutzbach C. et Rauenbusch E., *Physiol. Chem.*, **354**, 45 - 53, (1974).
- Lallai A., Mura G. Millidi R. et Mastinu C., *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 130 - 134, (1988).
- Landwall P. et Holme T., *J. Gen. Microbiol.*, **103**, 345 - 352, (1977 a).
- Landwall P. et Holme T., *J. Gen. Microbiol.*, **103**, 353 - 358, (1977 b).
- Lauffenburger D., *Trends Biotechnol.*, **5**, 87 - 89, (1987).
- Lecocq J. P., *Ann. Med. Vet.*, **131**, 321 - 327, (1987).
- Lee A. L., Ataaï M. M. et Shuler M. L., *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1398 - 1401, (1984).
- Lee S. B. et Bailey J. E., *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 66 - 73, (1984).
- Lee S. B., Seressiotis A. et Bailey J. E., *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1699 - 1709, (1985).

- Lee S. W. et Edlin G, *Gene*, **39**, 173 - 180, (1985).
- Lin K. H., Iijima S., Shimizu K., Hishinuma F. et Kobayashi T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 313 - 316, (1989).
- Luedeking R. et Piret E. L., *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, **1**, 4, 303 - 412, (1959).
- MacInnes R., D.E.A. INPL, (1989).
- Mainzer S. E. et Hempfling W. P., *J. Bacteriol.*, **126**, 1, 251 - 256, (1976).
- Maiorella B., Inlow D., Shauger A. et Harano D., *Bio/Technology*, **6**, 1406 - 1410, (1988).
- Marquet M., Alouani S. et Brown S. W., *Biotechnol. Lett.*, **8**, 8, 535 - 540, (1986).
- Marullo S., Delavier-Klutchko C., Guillet J. G., Charbit A. , Strosberg A. D. et Emorine L. J., *Bio/Technology*, **7**, 923 - 927, (1989).
- Mason C. A. et Bailey J. E., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 54 - 60, (1989).
- Meacock P. et Cohen S., *Cell*, **20**, 529 - 542, (1980).
- Meevootisom V. et Saunders J. R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 372 - 378, (1987).
- Meulien P., Faure T., Mischler F., Harrer H., Ulrich P., Bouderbaler B., Dott K., Mazurier C., Wiesel M. L., Van de Pol H., Cazenave J. M. et Courtney M., *Protein Eng.*, **2**, 4, 301 - 306, (1988).
- Meyer H. P., Leist C. et Fiechter A., *J. Biotechnol.*, **1**, 355 - 358, (1984).
- Mitchell P., *J. Bioenerg.*, **4**, 63 - 91, (1973).
- Mizutani S., Mori H., Shimizu S., Sakaguchi K. et Kobayashi T., *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 204 - 209, (1986).
- Monod J., *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, 4, 350 - 410, (1950).
- Monot F., Engasser J. M. et Petitdemange H., *Appl. Environ. Microbiol.*, **19**, 422 - 426, (1984).
- Morgan M. J., *Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells*. Plenum Press, (1986).
- Mori H., Yano T., Kobayashi T. et Shimizu S., *J. Chem. Eng. Jpn.*, **12**, 4, 313 - 319, (1979).
- Nasri N., Sayadi S., Barbotin J. N. et Thomas D., *J. Biotechnol.*, **6**, 147 - 157, (1987).
- Neijssel O. M. et Tempest D.W., 20th symposium of the Society for General Microbiology. Eds. A.T. Bull, D. C. Ellwood et C. Ratlidge. Cambridge University Press, (1979).

- Nielsen J., Emborg C. Halberg K. et Villadsen J., *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 478 - 486, (1989).
- Nudel B. C., Corradini C., Fraile E. et Giulietti A. M., *Biotechnol. Lett.*, **9**, 2, 77 - 82, (1987).
- Oh S.J., Kim Y.C., Park Y.W., Min S.Y., Kim I.S. et Kang H.S., *Gene*, **56**, 87 - 97, (1987).
- Okita B., Arcuri E., Turner K., Sharr D., Del Tito B., Swanson J., Shatzman A. et Zabriskie D., *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 854 - 862, (1989).
- Ollis D. F. et Chang H. T., *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2583 - 2586, (1982).
- Palsson B. O. et Joshi A., *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 789 - 792, (1987).
- Pan J. G., Rhee J.S. et Lebeault J. M., *Biotechnol. Lett.*, **9**, 2, 89 - 84, (1987).
- Parker C. et Dibiaso D., *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 215 - 221, (1987).
- Pavlou S et Fredrickson A. G., *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 971 - 989, (1989).
- Peretti S. W. et Bailey J. E., *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 316 - 328, (1987).
- Peretti S. W. et Bailey J. E., *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1672 - 1689, (1986).
- Peretti S. W., Bailey J. E. et Lee J. J., *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 902 - 908, (1989).
- Primrose S. B., *J. Appl. Bacteriol.*, **61**, 99 - 116, (1986).
- Primrose S. B., Derbyshire P., Jones I. M., Robinson A. et Ellwood D. C., Continuous culture (chapter 14). Edition Ellis Horwood Limited, **8**, (1984).
- Ramkrishna D., Foundations of Biochemical Engineering Kinetics and Thermodynamics in Biological System. American Chemical Society, Washington DC., 161 - 178, (1983).
- Ratkowsky D. A., Lowry R. L., McMeekin T. A., Stokes A. N. et Chandler R. E., *J. Bacteriol.*, **154**, 3, 1222 - 1226, (1983).
- Ratkowsky D. A., Olley J., McMeekin T. A. et Ball A., *J. Bacteriol.*, **149**, 1, 1 - 5, (1982).
- Reinikainen P., Korpela K., Wissinen V., Olkku J. et Söderlund H., *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 386 - 393, (1989).
- Rinas U., Krache-Helm H. A. et Schügerl K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 163 - 167, (1989).
- Robbins J. W. et Taylor K. B., *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1284 - 1294, (1989).
- Robinson G. N., Batchelor F. R., Butterworth D., Cameron-Wood S., Cole M. , Eustace G. C., Hart M. V., Richards M. et Chain E. B., *Nature*, **187**, 236 - 237, (1960).
- Ryan W., Parulekar S. J. et Stark B. C., *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 309 - 319, (1989).



- Sakaguchi K. et Murao S., *J. Agri. Chem. Soc. Jpn.*, **23**, 411 et suiv., (1950).
- San K. Y. et Weber A. E., *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 451 - 459, (1989).
- Sato N., Kawazoe I., Tamai T., Inoue Y., Murata K., Kimura S., Nonaka M. et , Kimura A., *J. Ferment. Technol.*, **68**, 2, 79 - 83, (1989).
- Sawada T. et Nakamura Y., *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 742 - 746, (1987).
- Sayadi S., Narsi N., Barbotin J. N. et Thomas D., *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 801 - 808, (1989).
- Schein C. H., *Bio/Technology*, **7**, 1141 - 1149, (1989).
- Schewale J. G. et Sivaraman H., *Process Biochem.*, **24**, 4, 146 - 154, (1989).
- Schiloach J. et Bauer B., *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 227 - 239, (1975).
- Schlegel H. G., *General Microbiology*. Ed. Cambridge University Press, (1988).
- Scriban R., *Biotechnologie (2ème édition)*. Technique et Documentation Lavoisier, (1984).
- Seo J. H. et Bailey J. E., *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1668 - 1674, (1985).
- Seo J. H. et Bailey J. E., *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1590 - 1594, (1986).
- Shengli Y., Ruping W., Jingxing W., Jiansen H. et Jibao Z., *Chin. J. Biotechnol.*, **4**, 1, 21 - 28, (1989).
- Shiloach J. et Bauer S., *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 227 - 239, (1975).
- Shu J. et Shuler M.L., *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1117 - 1126, (1989).
- Shuler M. L., Leung S. et Dick C. C. , *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **326**, 35 - 55, (1979).
- Siegel R. et Ryu D. D. Y., *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 28 - 33, (1985).
- Sikyta B. et Slezak J., *Biotechnol. Bioeng.*, **6**, 309 - 319, (1964).
- Sinclair N. A. et Stokes J. L., *J. Bacteriol.*, **83**, 1147 - 1154, (1962).
- Stueber D. et Bujard H., *EMBO J.*, **1**, 11, 1399 - 1404, (1982).
- Tachibana K., Imai M., Okamoto H., Yoda K., Kadokura K. , Katayama Y. et Yamasaki M., *Biotechnol. Lett.*, **8**, 10, 677 - 682, (1986).
- Taguchi S., Kumagai I., Nakayama J., Suzuki A. et Miura K. I., *Bio/Technology*, **7**, 1063 - 1066, (1989).
- Taha S., D.E.A. INPL, (1987).
- Thompson B. G., Kole M. et Gerson D. F., *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 818 - 824, (1985).
- Thomson J. A., *Recombinant DNA and Bacterial Fermentation*. CRC Press, (1988).

- Tsai L. B., Mann M., Morris F., Rotgers C. et Fenton D., *J. Ind. Microbiol.*, **2**, 181 - 187, (1987).
- Turner B. G., Ramkrishna D. et Jansen B. N., *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 46 - 54, (1988).
- Turner B. G., Ramkrishna D. et Jansen N. B., *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 252 - 261, (1989).
- Uri J., Valu G. et Bekesi I., *Naturwissenschaften*, **51**, 298, (1964).
- Venema G. et Kok J., *Trends Biotechnol.*, **5**, 144 - 149, (1987).
- Vojtisek V. et Slezak J., *Folia Microbiol.*, **20**, 224 - 230, (1975 a).
- Vojtisek V. et Slezak J., *Folia Microbiol.*, **20**, 289 - 297, (1975 b).
- Vojtisek V. et Slezak J., *Folia Microbiol.*, **20**, 298 - 306, (1975 c).
- Walker J. M. et Gingold E. B., *Molecular Biology and Biotechnology* (second edition), The Royal Society of Chemistry, (1988).
- Wang G. et Wang. D. I. C., *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 294, (1984).
- Weber A. E. et San K. Y., *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1104 - 1113, (1989 a).
- Weber A. E. et San K. Y., *Biotechnol. Tech.*, **3**, 6, 397 - 400, (1989 b).
- Weber A. E. et San K. Y., *Biotechnol. Lett.*, **10**, 8, 531 - 536, (1988).
- Wojskowicz J., *Acta Microbiol. Pol.*, **33**, 179, (1984).
- Wojskowicz J., *Acta Microbiol. Pol.*, **30**, 1, 12 - 23, (1981).
- Wouters J. T. M., Driehuis F. L., Polaczek P. J., Van Oppenraay M. L. H. A. et Van Andel J. G., *Antonie Leeuwenhoek*, **46**, 353 - 362, (1980).
- Zabriskie D. W. et Arcuri E. J., *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 706 - 717, (1986).
- Zouheyri H., Thèse, (Décembre 1990).

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE**  
**DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame BRANLANT, Chargé de Recherche, Université Nancy I,  
Monsieur SIMON, Docteur Ingénieur, Centre Recherche Vitry.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**M**ademoiselle CAYUELA Chantal

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse  
intitulée :

"Cinétique et modélisation de la production de pénicilline acylase  
par Escherichi coli recombinée sur milieu complexe".


en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**


Spécialité : "Génie des Procédés"

Fait à Vandoeuvre, le 23 Octobre 1990

Le Président de l'I.N.P.L.,



M. GABTOIS





## RESUME :

Les progrès réalisés en biologie moléculaire et plus particulièrement dans l'expression des gènes hétérologues chez les bactéries ont permis d'exploiter les microorganismes recombinés pour la production industrielle de protéines. La souche d'*E. coli* étudiée contient un plasmide dérivé du pBR322 dans lequel le gène de la pénicilline acylase (PA) a été cloné. La PA immobilisée est utilisée pour la production industrielle d'acide 6-aminopénicillanique (intermédiaire clé dans la production des pénicillines semi-synthétiques). Nous avons étudié et modélisé le comportement de cette souche cultivée sur un milieu complexe contenant du glucose, de l'acide phénylacétique et une source organique complexe (peptone, extrait de levure).

Après avoir déterminé les conditions de culture favorables à la production de PA, nous avons étudié l'influence du plasmide sur le comportement de la souche hôte. Pour cela, nous avons comparé les paramètres cinétiques (vitesses spécifiques et rendements) entre la souche sauvage et la souche recombinée.

Ensuite, des cultures discontinues, semi-continues et continues ont été réalisées. Nous avons comparé les performances de la souche entre ces trois modes de culture et analysé les cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de production de la PA afin de comprendre le comportement de la souche.

A partir de ces informations, un modèle non structuré a été élaboré. Il permet de modéliser correctement en cultures discontinue, semi-continue et continue la croissance, les consommations successives des différentes sources carbonées et d'azotées ainsi que la production de l'enzyme.

## ABSTRACT :

Advances in molecular biology and especially in expression of heterologous genes in bacteria allow recombinant microorganisms to be used for industrial production of proteins. The *E. coli* strain studied contains a plasmid related to pBR322 including penicillin acylase (PA) gene. Immobilised PA is used in industrial production of 6-aminopenicillanic acid, a key intermediate for the manufacture of semi-synthetic penicillins. We studied and modelled this strain behaviour on complex medium including glucose, phenylacetic acid and complex organic source (peptone, yeast extract).

First, we chose culture conditions for PA production. Then, we studied plasmid influence on host strain metabolism comparing kinetic parameters (specific rate and yield) of both wild and recombinant strain.

Batch, fed-batch and continuous cultures were performed in order to compare strain performances and analyse kinetics of growth, substrate uptake and PA production to understand this strain behaviour.

Gathering all this data, we settled an unstructured model. For batch, fed-batch and continuous cultures, we achieved modelling growth, successive consumption of carbon and nitrogen sources as well as PA production.

## MOTS-CLES :

*Escherichia coli* recombinée, pénicilline acylase, modèle non structuré.