



## Production d'acide propionique à partir de *Propionibacterium acidipropionici* dans un bioréacteur BIOSTAT® A



#09

Note  
d'application

#10

#11

#12

#13

Carlos H Luna-Flores, Lars Nielsen  
et Esteban Marcellin\*

Australian Institute for Bioengineering and  
Nanotechnology (AIBN), The University of  
Queensland, Brisbane, Qld 4072, Australie

\* Auteur correspondant  
Dr. Esteban Marcellin, Australian Institute  
for Bioengineering and Nanotechnology,  
The University of Queensland,  
Brisbane, QLD 4072, Australie.  
Téléphone : +61 7 334 64298,  
Fax : +61 7 3346 3973,  
Email : e.marcellin@uq.edu.au

## Introduction

Issu traditionnellement des combustibles fossiles, l'acide propionique (PA) est largement utilisé dans les industries agroalimentaire et pharmaceutique. Le PA s'emploie comme conservateur et, de plus en plus souvent, dans la synthèse des monomères. Le marché du PA a récemment connu une croissance et représente plus de 410 000 tonnes par an à un taux de croissance annuel stable de 3%. Face aux préoccupations environnementales croissantes, les utilisateurs finaux se tournent vers des alternatives durables au PA, ce qui ouvre une nouvelle niche pour la production biologique de PA (Liu et al., 2012). Cette dernière répond aux nombreuses inquiétudes environnementales actuelles et représente une alternative écologique à la production de substances chimiques C3 comme le propylène, le propanol et le propionate de vinyle.

*Propionibacterium acidipropionici* (*P. acidipropionici*) est une bactérie en forme de bâtonnet, anaérobie à Gram positif, qui produit naturellement du PA comme produit de fermentation principal dans le cycle de Wood-Werckman (Liu et al., 2012; Parizzi et al., 2012). Le PA est produit, de manière native, avec d'autres acides organiques comme le lactate, le succinate et l'acétate.

La fermentation anaérobie de *P. acidipropionici* est sensible à des facteurs environnementaux, physico-chimiques et hydrodynamiques, notamment la température, le pH, l'oxygène dissous et aux contraintes de cisaillement. Ils doivent faire l'objet d'un rigoureux contrôle au cours de la fermentation. *P. acidipropionici* utilise un mélange complexe de nutriments pour fabriquer du PA de manière optimale. Cela engendre un métabolisme dynamique à chaque phase de croissance. Au cours de cette étude, nous avons démontré la robustesse du BIOSTAT® A pour la culture de *P. acidipropionici*. L'équipement a pu maîtriser le pH avec succès malgré la production élevée de PA. Les paramètres de contrôle du pH ont dû être ajustés afin d'obtenir une bonne régulation. Une injection constante d'azote dans le réacteur a garanti des conditions anaérobies. La régulation de température a été assurée grâce à un collier chauffant et un doigt de refroidissement alimenté par un cryostat. Le cryostat a aussi permis de

limiter l'évaporation en refroidissant les gaz de sortie. Les conditions hydrodynamiques ont été maintenues grâce à l'utilisation de deux turbines Rushton

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1 Bactéries et milieux

*P. acidipropionici* ATCC 55737 sélectionné parmi 17 souches (Stowers, Cox, et Rodriguez, 2014). La souche a été maintenue à -80°C en utilisant du glycérol (20 %) comme cryoprotecteur. Le milieu de culture (PAM) a été réalisé à partir de (g/l) : extrait de levure (10), trypticase de soja (5), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,05), MnSO<sub>4</sub> (0,05) et glucose (75). Les composants du milieu et la source de carbone ont été stérilisés séparément à 121°C pendant 20 minutes.

### 1.2 Culture

Les cultures souches ont été ranimées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant 1 ml de milieu PAM inoculé avec 0,8 % (v/v) de la souche. Cette culture s'est développée pendant 24 heures à 32°C. Elle a ensuite été transférée dans un tube Falcon de 15 ml contenant 14 ml de milieu PAM dans lequel elle a poursuivi sa croissance pendant 24 heures supplémentaires. 5 % (v/v) de cette culture a servi à inoculer un flacon de sérum de 250 ml contenant 100 ml de culture PAM qui s'est développée pendant 24 heures de plus. Les cellules des flacons de sérum en phase semi-exponentielle ont servi à inoculer le fermenteur à un OD<sub>600nm</sub> initial de 0,3. La fermentation s'est déroulée avec un fermenteur BIOSTAT® A de 1 l. Le fermenteur était équipé de sondes et de contrôleurs standard pour le pH, l'oxygène dissous, la température et l'agitation. La vitesse d'agitation a été maintenue à 300 tr./min. Le pH a été maintenu à 6,4 par une injection de 10 M NaOH. La température était régulée à 32°C via l'utilisation d'un collier chauffant et d'un doigt de refroidissement alimenté par un cryostat. Le condenseur a été réglé sur 20 % pour éviter l'évaporation du milieu. Avant l'inoculation, de l'azote a été injecté dans le fermenteur pendant 15 minutes. Un débit d'azote constant a été maintenu à 300 ccm pendant toute la durée de la fermentation à l'aide d'un facteur de correction pour le débitmètre massique régulateur de 0,992.

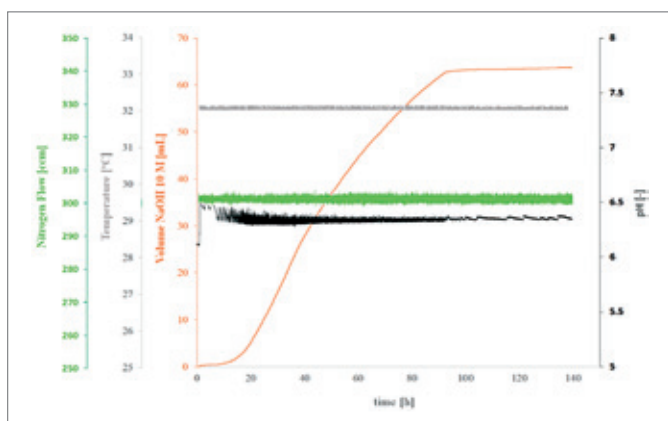
### 1.3. Méthodes d'analyse

Un spectrophotomètre Biochrom Libra S12 UV/Vis a permis de mesurer la densité optique de la culture à 600 nm. Les acides organiques et les hydrates de carbone ont été quantifiés par chromatographie par exclusion ionique avec un système Agilent 1200 HPLC et une colonne Agilent Hiplax H (300 × 7,7 mm, PL1170-6830) avec une précolonne (SecurityGuard Carbo-H, Phenomenex PN: AJO-4490). Les sucres ont été soumis au contrôle par un détecteur à indice de réfraction (Agilent RID, G1362A) réglé sur une polarité positive et une température du bloc optique de 40°C, tandis que les acides organiques étaient réglés à 210 nm (Agilent MWD, G1365B). 30 µl de l'échantillon ont été injectés dans la colonne avec un échantillonneur automatique (Agilent HiP-ALS, G1367B) et la température de la colonne maintenue à 65°C [70°C] avec un compartiment de colonne thermostatée (Agilent TCC, G1316A). Il s'en est suivi une élution isocratique des analytes avec 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 0,6 ml/minute pendant 26 minutes. Les chromatogrammes ont été intégrés avec ChemStation (Rev B.03.02[341]).

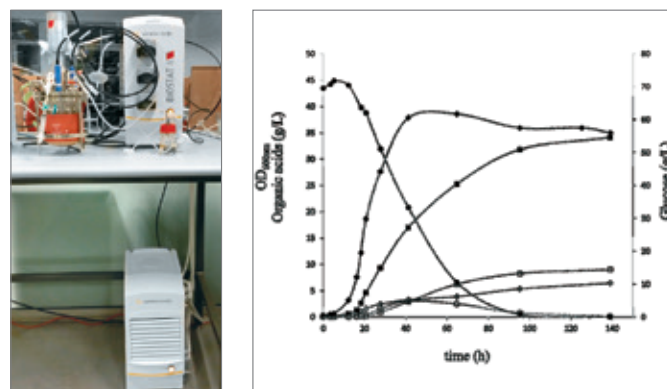
### 2. Résultats

Le *P. acidipropionici* produit des acides organiques, ce qui génère une grande variation de pH qui nécessite d'être régulé. La Figure 1 illustre les paramètres de contrôle dans le bioréacteur avec le BIOSTAT® A. Le pH a été régulé par une adjonction de base NaOH 10M à l'aide de la pompe péristaltique intégrée. Les paramètres de contrôle PID ont été ajustés sur P : 300 %, I : 0 % et D : 0 %. Le maintien de l'environnement anaérobie dans le fermenteur a exigé un apport continu en azote. La température et l'agitation ont aussi été régulées et surveillées.

La Figure 2 représente les profils cinétiques de la croissance de *P. acidipropionici*. Le PA était le principal produit de fermentation associé à de faibles quantités d'acide acétique et d'acide succinique. Comme illustré dans la figure, la croissance s'est arrêtée après 40 heures. Toutefois, la production de PA s'est poursuivie jusqu'à la fin de la fermentation, qui se traduit par l'apport de NaOH jusqu'à la 96<sup>ème</sup> heure.



**Figure 1 :** Paramètres de contrôle du BIOSTAT® au cours de la fermentation de *P. acidipropionici*. Indication du débit d'azote, de la température, du pH et du volume de NaOH 10 M.



**Figure 2 :** Cinétique de croissance de la fermentation de *P. acidipropionici* dans un BIOSTAT® A.

(A) Équipement BIOSTAT® A.

(b) Cinétique de croissance et de production.

- Densité optique : Ligne noire et ◆ ;
- Acide propionique : Ligne noire et ■ ;
- Glucose : Ligne noire et ● ;
- Acide succinique : Ligne grise et □ ;
- Acide acétique : Ligne grise et ◇ ;
- Pyruvate : Ligne grise et ○.

### 3. Conclusion

La fermentation de *P. acidipropionici* pour la production de PA peut être réalisée dans un BIOSTAT® A. Le principal paramètre de contrôle était le pH qui a été régulé en modifiant les PID. Pour conclure, le BIOSTAT® A peut être utilisé pour cultiver les microorganismes anaérobies pour produire plus de 30 g/l d'acide propionique.

### Références

- Liu, L., Zhu, Y., Li, J., Wang, M., Lee, P., Du, G., & Chen, J. (2012). Microbial production of propionic acid from propionibacteria: current state, challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4), 374–81. doi:10.3109/07388551.2011.651428
- Parizzi, L. P., Grassi, M. C. B., Llerena, L. a, Carazzolle, M. F., Queiroz, V. L., Lunardi, I., ... Pereira, G. a G. (2012). The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its biotechnological and industrial potential. *BMC Genomics*, 13, 562. doi:10.1186/1471-2164-13-562
- Stowers, C. C., Cox, B. M., & Rodriguez, B. a. (2014). Development of an industrializable fermentation process for propionic acid production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(5), 837–52. doi:10.1007/s10295-014-1423-6

# Sales and Service Contacts

For further contacts, visit [www.sartorius-stedim.com](http://www.sartorius-stedim.com)

## Europe

**Germany**  
Sartorius Stedim Biotech GmbH  
August-Spindler-Strasse 11  
37079 Goettingen  
Phone +49.551.308.0  
Fax +49.551.308.3289

Sartorius Stedim Systems GmbH  
Robert-Bosch-Strasse 5 – 7  
34302 Guxhagen  
Phone +49.5665.407.0  
Fax +49.5665.407.2200

**France**  
Sartorius Stedim FMT S.A.S.  
ZI des Paluds  
Avenue de Jouques – CS 91051  
13781 Aubagne Cedex  
Phone +33.442.845600  
Fax +33.442.845619

Sartorius Stedim France SAS  
ZI des Paluds  
Avenue de Jouques – CS 71058  
13781 Aubagne Cedex  
Phone +33.442.845600  
Fax +33.442.846545

**Austria**  
Sartorius Stedim Austria GmbH  
Modecenterstrasse 22  
1030 Vienna  
Phone +43.1.7965763.18  
Fax +43.1.796576344

**Belgium**  
Sartorius Stedim Belgium N.V.  
Rue Colonel Bourg 105  
1030 Bruxelles  
Phone +32.2.756.06.80  
Fax +32.2.756.06.81

**Hungary**  
Sartorius Stedim Hungária Kft.  
Kagyó u. 5  
2092 Budakeszi  
Phone +36.23.457.227  
Fax +36.23.457.147

**Italy**  
Sartorius Stedim Italy S.p.A.  
Via dell'Antella, 76/A  
50012 Antella-Bagno a Ripoli (FI)  
Phone +39.055.63.40.41  
Fax +39.055.63.40.526

**Netherlands**  
Sartorius Stedim Netherlands B.V.  
Phone +31.30.60.25.080  
Fax +31.30.60.25.099  
[filtratie.nederland@sartorius-stedim.com](mailto:filtratie.nederland@sartorius-stedim.com)

**Poland**  
Sartorius Stedim Poland Sp. z o.o.  
ul. Wrzesinska 70  
62-025 Kostrzyn  
Phone +48.61.647.38.40  
Fax +48.61.879.25.04

**Russian Federation**  
LLC "Sartorius Stedim RUS"  
Uralskaya str. 4, Lit. B  
199155 St. Petersburg  
Phone +7.812.327.53.27  
Fax +7.812.327.53.23

**Spain**  
Sartorius Stedim Spain, S.A.U.  
Avda. de la Industria, 32  
Edificio PAYMA  
28108 Alcobendas (Madrid)  
Phone +34.913.586.098  
Fax +34.913.589.623

**Switzerland**  
Sartorius Stedim Switzerland AG  
Ringstrasse 24 a  
8317 Tagelswangen  
Phone +41.52.354.36.36  
Fax +41.52.354.36.46

**U.K.**  
Sartorius Stedim UK Ltd.  
Longmead Business Centre  
Blenheim Road, Epsom  
Surrey KT19 9 QQ  
Phone +44.1372.737159  
Fax +44.1372.726171

**Ukraine**  
LLS "Sartorius RUS"  
Post Box 440 "B"  
01001 Kiev, Ukraine  
Phone +380.44.411.4918  
Fax +380.50.623.3162

## Americas

**USA**  
Sartorius Stedim North America Inc.  
5 Orville Drive, Suite 200  
Bohemia, NY 11716  
Toll-Free +1.800.368.7178  
Fax +1.631.254.4253

**Argentina**  
Sartorius Argentina S.A.  
Int. A. Avalos 4251  
B1605ECS Munro  
Buenos Aires  
Phone +54.11.4721.0505  
Fax +54.11.4762.2333

**Brazil**  
Sartorius do Brasil Ltda  
Avenida Senador Vergueiro 2962  
São Bernardo do Campo  
CEP 09600-000 - SP- Brasil  
Phone +55.11.4362.8900  
Fax +55.11.4362.8901

**Mexico**  
Sartorius de México, S.A. de C.V.  
Libramiento Norte de Tepotzotlan s/n,  
Colonia Barrio Tlacateco,  
Municipio de Tepotzotlan,  
Estado de México,  
C.P. 54605  
Phone +52.55.5562.1102  
Fax +52.55.5562.2942  
[leadsmex@sartorius.com](mailto:leadsmex@sartorius.com)

**Peru**  
Sartorius Peru S.A.C.  
Av. Emilio Cavenecia 264 San Isidro  
15073 Lima, Perú  
Phone +51.1.441 0158  
Fax +51.1.422 6100

## Asia | Pacific

**Australia**  
Sartorius Stedim Australia Pty. Ltd.  
Unit 5, 7-11 Rodeo Drive  
Dandenong South Vic 3175  
Phone +61.3.8762.1800  
Fax +61.3.8762.1828

**China**  
Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.  
No. 33 Yu'an Road  
Airport Industrial Park Zone B  
Shunyi District, Beijing 101300  
Phone +86.10.80426516  
Fax +86.10.80426580

Sartorius Stedim (Shanghai)  
Trading Co., Ltd.  
3rd Floor, North Wing, Tower 1  
No. 4560 Jinke Road  
Zhangjiang Hi-Tech Park  
Pudong District  
Shanghai 201210, P.R. China  
Phone +86.21.6878.2300  
Fax +86.21.6878.2882

Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.  
Guangzhou Representative Office  
Unit K, Building 23  
Huihua Commerce & Trade Building  
No. 80 Xianlie Middle Road  
Guangzhou 510070  
Phone +86.20.37618687 | 37618651  
Fax +86.20.37619051

**India**  
Sartorius Stedim India Pvt. Ltd.  
#69/2-69/3, NH 48, Jakkasandra  
Nelamangala Tq  
562 123 Bangalore, India  
Phone +91.80.4350.5250  
Fax +91.80.4350.5253

**Japan**  
Sartorius Stedim Japan K.K.  
4th Fl., Daiwa Shinagawa North Bldg.  
8-11, Kita-Shinagawa 1-chome  
Shinagawa-ku, Tokyo, 140-0001 Japan  
Phone +81.3.4331.4300  
Fax +81.3.4331.4301

**Malaysia**  
Sartorius Stedim Malaysia Sdn. Bhd.  
Lot L3-E-3B, Enterprise 4  
Technology Park Malaysia  
Bukit Jalil  
57000 Kuala Lumpur, Malaysia  
Phone +60.3.8996.0622  
Fax +60.3.8996.0755

**Singapore**  
Sartorius Stedim Singapore Pte. Ltd.  
1 Science Park Road,  
The Capricorn, #05-08A,  
Singapore Science Park II  
Singapore 117528  
Phone +65.6872.3966  
Fax +65.6778.2494

**South Korea**  
Sartorius Korea Biotech Co., Ltd.  
8th Floor, Solid Space B/D,  
PanGyoYeok-Ro 220, BunDang-Gu  
SeongNam-Si, GyeongGi-Do, 463-400  
Phone +82.31.622.5700  
Fax +82.31.622.5799



▶ [www.sartorius-stedim.com](http://www.sartorius-stedim.com)