

# **Production d'acide muconique par fermentation bactérienne. Screening de souches et analyse métabolique**

Ing. C. BRUNI  
Lic. B. Pirson  
ISICht - Mons

*Un moyen de diminuer l'impact environnemental de la fabrication du nylon serait d'éviter la production chimique de l'acide adipique en le produisant via la valorisation de ressources renouvelables (lignine) et l'utilisation de microorganismes. Dès lors, ce travail repose sur la recherche de souche(s) bactérienne(s) ayant les capacités de se développer dans un milieu contenant une grande quantité de benzoate, et de transformer le benzoate, par voie enzymatique, en acide muconique. L'avantage est que l'acide muconique peut facilement être transformé par hydrogénation en acide adipique à 3,5 bars et à température ambiante.*

*Mots clefs : nylon, lignine, acide adipique, acide muconique, benzoate, catéchol, GC/MS.*

*A means to decrease the environmental impact of the manufacturing of the nylon would be to avoid the chemical production of the adipic acid by producing it via the valuation of renewable resources (lignin) and the use of microorganisms. Thus, the purpose of this work is to find bacterial strains which are able to develop in the presence of a large quantity of benzoate, and to transform enzymatically the benzoate into muconic acid. The benefit is that muconic acid can easily be transformed into adipic acid by hydrogenation at 3.5 bars and at room temperature.*

*Keywords : nylon, lignin, adipic acid, muconic acid, benzoate, catechol, GC/MS.*

## 1. Introduction

### 1.1. Contexte

La biotechnologie blanche a pour objet l'utilisation de ressources renouvelables ainsi que de biomasse dans le but de produire, à l'échelle industrielle, des substances pouvant être par la suite utilisées dans les industries.

Travailler avec des microorganismes et des enzymes permet, à cette chimie durable, de présenter une alternative aux énergies fossiles trop souvent utilisées dans les processus de productions classiques. En effet, mettre en place des technologies respectueuses de l'environnement fait partie de nos priorités à ce jour.

Un exemple connu concerne la fabrication d'une matière plastique, le nylon, employé dans le domaine du textile. Le nylon 6,6 est un polyamide obtenu par polycondensation d'une molécule possédant deux fonctions acides (l'acide adipique) et d'une molécule possédant deux fonctions amines (l'hexaméthylène diamine). La synthèse chimique de l'acide adipique (fig.1) se réalise par oxydation d'un mélange de cyclohexanol-cyclohexanone par l'acide nitrique. Néanmoins, ce processus rejette du protoxyde d'azote gazeux ( $N_2O$ ) dans l'atmosphère et par conséquent, cause un impact néfaste à l'environnement.

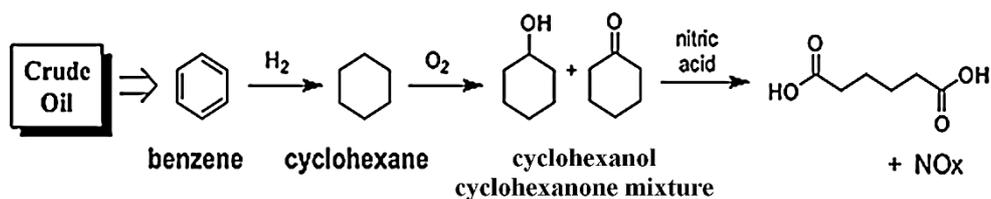


Figure 1 : Synthèse chimique de l'acide adipique [1]

Un moyen de diminuer l'impact environnemental de la production de nylon serait d'éviter la production chimique d'acide adipique et de le produire via la valorisation de ressources naturelles renouvelables. Comme matière de

départ renouvelable, nous pouvons citer l'exemple de la lignine provenant de déchets industriels. Cette idée est très prometteuse.

En effet, la lignine est un polymère naturel (constituant du bois par ex.) qui est composé de motifs aromatiques. Elle peut donc être dégradée en monomères d'acides par voie enzymatique, biologique ou thermique. Ces petites molécules peuvent ensuite être employées par les microorganismes soit pour être polymérisées et former des plastiques biodégradables, soit pour être converties en diverses substances intéressantes industriellement. Dans notre cas, la lignine peut être la source de carbone permettant la synthèse, via la biotechnologie blanche, d'acide adipique ou plus exactement d'acide muconique dont la structure est proche.

## **1.2. Objectifs**

Beaucoup de substances naturelles produites par la décomposition de la lignine sont des dérivés phénoliques et des dérivés de l'acide benzoïque [2]. Il est donc intéressant de rechercher des souches bactériennes possédant un métabolisme de dégradation de ces dérivés. Ces bactéries utilisent une voie métabolique spécifique pour convertir l'acide benzoïque en acide muconique par l'intermédiaire du catéchol [3].

L'intérêt est que l'acide muconique peut être facilement converti en acide adipique par hydrogénation à 3,5 bars et à température ambiante.

L'objectif de ce travail était de trouver différentes souches bactériennes ayant la capacité enzymatique de transformer l'acide benzoïque en un intermédiaire (le catéchol) qui sera lui-même converti en acide muconique. Les conditions de fermentation microbienne devaient être définies de telle manière à visualiser la production de cet acide dicarboxylique. Il était donc primordial que les souches en question aient une bonne croissance dans un milieu contenant une grande quantité d'acide benzoïque.

Parmi les souches de microorganismes découvertes, la plus intéressante a été mise en culture batch en fermenteur afin de comprendre son fonctionnement aussi bien en termes de croissance qu'en termes de métabolisme. Des tests d'inhibitions enzymatiques ont également été effectués afin d'observer les effets d'inhibitions sur le métabolisme de dégradation du benzoate.

## 2. Aspects théoriques

### 2.1. L'acide muconique

L'acide muconique ou acide hexa-2,4-diénoïque (fig.2) est un acide dicarboxylique linéaire à six atomes de carbone présentant deux doubles liaisons. Sa formule brute est  $C_6H_6O_4$ .

Sa structure du point de vue chimique implique trois diastéréoisomères :

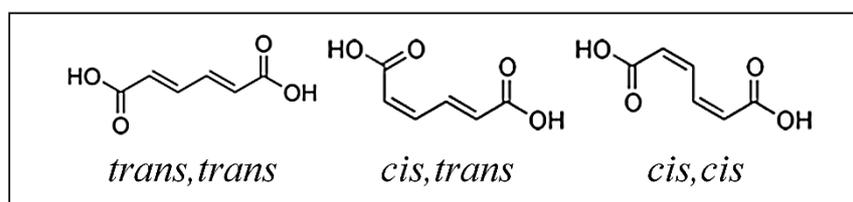


Figure 2 : L'acide muconique et ses isomères [4]

Les isomères trans,trans et cis, cis possèdent chacun une application connue. L'acide trans, trans muconique représente un intérêt biologique en tant que métabolite de la dégradation du benzène chez l'homme. Sa détection dans l'urine constitue un marqueur de l'exposition au benzène dans l'environnement du patient [5].

L'acide cis, cis muconique, quant à lui, provient de la dégradation microbiologique des molécules organiques aromatiques (benzène, toluène,...) présentes dans l'environnement via une voie métabolique spécifique. En effet, la bioremédiation est une technique consistant à favoriser le développement et la croissance des microorganismes dans les milieux pollués (sols, effluents,...) afin d'améliorer et de favoriser au mieux les processus de dégradations biologiques des substances polluantes [6].

### 2.2. Le métabolisme de dégradation des composés aromatiques en aérobie

La dégradation aérobie des composés aromatiques se fait en deux étapes importantes. La première consiste en l'oxydation du cycle benzénique afin de le fragiliser, puisqu'il est très stabilisé par l'énergie de résonance provenant de la délocalisation des électrons. La deuxième consiste à

l'ouverture du cycle et aux transformations successives conduisant au métabolisme central cellulaire [2]. Nous avons pris le benzoate (fig.3) comme molécule test tout au long de ce travail. Celui-ci pénètre dans le microorganisme par l'intermédiaire de transporteurs actifs situés au niveau de la membrane. L'hydroxylation du cycle benzénique forme un intermédiaire réactionnel nommé le catéchol. Ce dernier peut ensuite être clivé enzymatiquement de deux manières différentes, à savoir :

- le clivage en méta, catalysé par la catéchol-2,3-dioxygénase produisant un composé semi aldéhydique non intéressant, et
- le clivage en ortho, catalysé par la catéchol-1,2-dioxygénase produisant l'acide muconique qui est notre composé d'intérêt.

La dernière étape du schéma en figure 3 consiste en la transformation de ces deux molécules en substituants utilisables par le métabolisme énergétique du microorganisme.

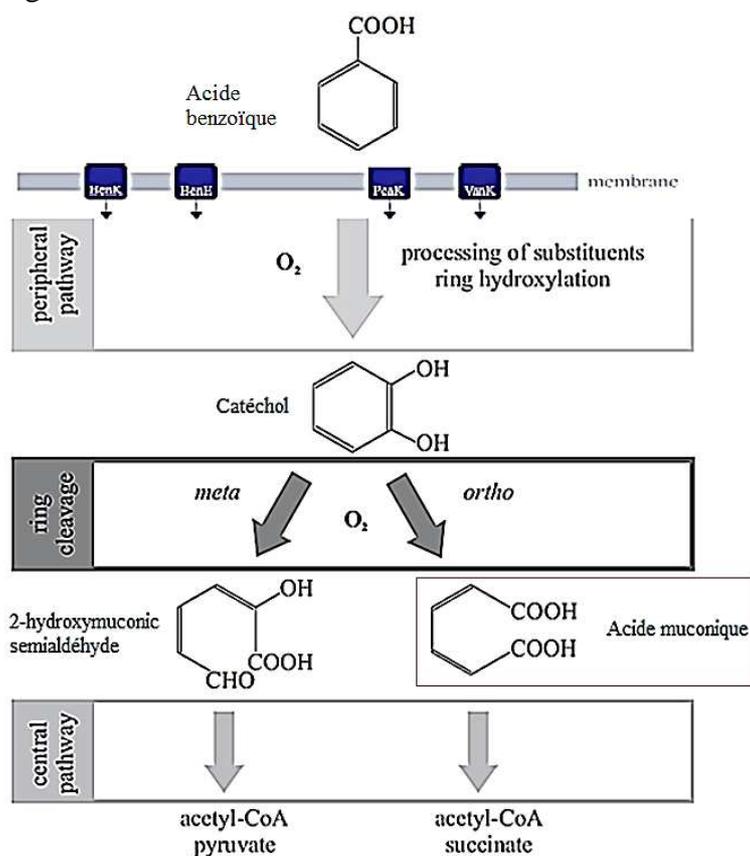


Figure 3 : Métabolisme de dégradation du benzoate en aérobiose [7]

### 3. Résultats

#### 3.1. Recherche de souches productrices d'acide muconique à partir de benzoate

Les buts de cette expérience ont été :

- de rechercher parmi les souches préalablement sélectionnées, celles ayant la capacité de croître facilement en présence de benzoate,
- de rechercher la concentration maximale en benzoate admissible par les différentes souches, et
- de rechercher des souches produisant de l'acide muconique.

*Remarque* : Comme l'acide muconique est un métabolite intermédiaire dans le métabolisme de dégradation du benzoate (fig.3), l'absence de pic chromatographique de production de cet acide ne signifie pas forcément que la souche en question est non productrice. De ce fait, l'observation de la présence d'acide muconique permet de confirmer et de s'assurer que la souche en question est productrice.

#### *Les différentes étapes de l'étude*

Nous avons consulté la littérature afin de trouver des espèces de microorganismes susceptibles de dégrader les composés aromatiques dans l'environnement.

Les souches en question sont mentionnées dans le tableau 1 ci-dessous :

<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Clostridium sporosphaeroïde</i>
<i>Arthrobacter oxydans</i>	<i>Desulfobacula toluolica</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Frateuria aurantia</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Pseudonocardia autotrophica</i>
<i>Rhodococcus opacus</i>	<i>Sphingomonas haloaromaticamans</i>
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Trichococcus palustris</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Wolinella succinogenes</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	

Tableau 1 : Liste des souches à tester

Tous ces microorganismes sont présents dans l'environnement (sols, eaux,...) et aussi dans des milieux pollués. Ils peuvent dès lors, participer à la bioremédiation des sites pollués. Ils ont des fonctions dans l'environnement telles que la dégradation de composés aromatiques, la dégradation des phénols, de la cellulose, de la lignine.

Les souches sont sous forme lyophilisées dans des ampoules en verre provenant de l'entreprise DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und zellkulturen GmbH). Ces souches ont d'abord fait l'objet d'une « ressuscitation ou retour à l'état cultivable » et ensuite d'un isolement sur boîte de pétri (Nutrient Agar<sup>1</sup>). Enfin, une colonie est placée en culture en milieu liquide dans un milieu nutritif à 33°C avec une agitation de 100 rpm pendant 48h.

À partir des boîtes de pétri, au départ d'une colonie, une coloration de Gram est réalisée afin de pouvoir mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et afin d'observer les différentes souches au microscope.

À partir du milieu liquide, chaque souche a fait l'objet d'une culture sur microplaque 24 puits (fig.4) à 33°C avec une agitation de 250 rpm pendant 48 à 72h. Chaque souche a été mise en présence d'un milieu de culture appelé Minimal medium (inspiré de la littérature [8]) et de différentes concentrations en acide benzoïque sous forme de benzoate de sodium (4 essais pour chaque concentration testée allant de 0 à 5 g/l de benzoate). Après 48h de croissance, une mesure d'absorbance et une analyse de chaque puits de la microplaque ont été effectuées.



*Figure 4 : Microplaque de culture du system Duetz [9]*

---

<sup>1</sup> Le Nutrient Agar est un milieu nutritif constitué d'extrait de viande, de peptone, de chlorure de sodium, d'extrait de levure et d'agar.

Le Minimal medium est constitué :

- d'une source de phosphore et de potassium venant du  $K_2HPO_4$ ,
- d'une source d'azote et de soufre venant du  $(NH_4)_2SO_4$  et de  $MgSO_4$ ,
- d'une source de vitamines, d'azote et de quelques polysaccharides venant de l'extrait de levure,
- de fer venant de  $FeCl_3$  jouant le rôle de cofacteur de l'enzyme (catéchol-1,2-dioxygénase) catalysant la conversion du catéchol en acide muconique. L'EDTA ajouté améliore la solubilisation du fer dans le milieu,
- d'une source de carbone venant de l'acide succinique et de différentes concentrations en benzoate de sodium ajoutées.

Après culture sur microplaque, les échantillons des différents puits sont d'abord dérivatisés à l'isobutylchloroformate. Par cette technique, l'acide muconique est transformé en un ester constitué de deux groupements isobutyl. Après extraction des esters à l'aide d'un solvant d'extraction (le t-butyl méthyl éther), ce dernier est évaporé et les composés à doser sont remis en solution dans un solvant de récupération identique au solvant d'extraction. L'échantillon est finalement injecté au GC/MS (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse).

La méthode SIM (Selected Ion Monitoring) a été employée pour la détection du composé d'intérêt. Cette méthode permet de sélectionner certaines masses caractéristiques, augmentant dès lors la sensibilité de la détection. Les masses caractéristiques choisies pour l'acide muconique sont spécifiques et correspondent aux rapports  $m/z$  97, 143 et 181.

Une analyse en GC/MS des différents puits montre la présence ou l'absence d'acide muconique produit par la souche. La présence d'acide adipique (standard interne) nous donne l'assurance du bon fonctionnement de la dérivatisation, de l'extraction et de la récupération des produits dérivatisés.

*Remarque :* Les conditions expérimentales (quantités de réactifs ajoutées) ont été déterminées et fixées de telle manière à assurer le bon fonctionnement de la méthode. Une droite d'étalonnage a également été réalisée dans la gamme de concentrations allant de 0 à 0,166g/l d'acide muconique. Celle-ci a conduit à la détermination des limites de détection ( $C_s/C_i=0,072$ ) et de quantification ( $C_s/C_i=0,240$ ) ( $C_s$  étant la concentration

en acide muconique et Ci la concentration en acide adipique valant 0,166g/l (standard interne)).

Le standard interne choisi, à savoir l'acide adipique, a répondu à plusieurs exigences :

- molécule non endogène (non produite par le microorganisme lui-même),
- molécule de structure semblable au composé à doser à savoir l'acide muconique,
- molécule qui possède un pic chromatographique bien résolu et suffisamment grand en termes de hauteur pour permettre sa détection et son identification visuelle immédiate.

Au terme de ces étapes, les souches intéressantes devaient respecter les critères suivants :

- une structure simple afin de permettre une standardisation aisée lors des expériences (les champignons et actinomycètes sont dès lors proscrits),
- un milieu de culture enrichi simple ne contenant pas de sources carbonées trop complexes,
- une bonne croissance dans un milieu minimal en présence d'une haute concentration en benzoate (substrat métabolisé en acide muconique),
- une production d'acide muconique détectable par GC/MS.

### ***Résultats concernant la souche Acinetobacter radioresistens***

*Acinetobacter radioresistens* est une bactérie aérobie du genre *Acinetobacter*. La culture sur boîte de pétri montre des colonies incolores, de forme ronde, d'aspect lisse et brillant. Cette bactérie Gram négative s'organise en bacilles groupés pouvant former de courtes chaînes. La souche en question possède un temps de croissance rapide dans un milieu liquide enrichi. En effet, 24h d'incubation à 33°C suffisent pour obtenir une densité optique d'une unité (valeur utilisée pour la standardisation de la quantité de bactéries lors de la culture en microplaque).

Après 48h d'incubation de la microplaque à 33°C, la croissance d'*Acinetobacter radioresistens* a principalement révélé un développement dans les puits ayant les concentrations de 0, 0,5, 1, 2 et 4 g/l en benzoate.

L'absorbance des puits augmente au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en benzoate présent, cela montre que la bactérie est capable d'utiliser cette source de carbone afin de croître.

Notons que, cette souche est capable de se développer après 3 jours d'incubation, dans les puits où 5 g/l de benzoate sont présents. Le milieu prenait une coloration brunâtre de plus en plus forte au fil des jours. Le métabolisme de dégradation du benzoate et de formation de catéchol de cette bactérie est donc bien visible.

Après analyse par GC/MS des puits, nous avons détecté un pic d'acide muconique à 13,7 minutes dans un puits ayant une concentration de 4g/l de benzoate (fig.5). De plus, l'observation de l'absence d'un pic chromatographique de benzoate<sup>2</sup> dans le puits est la preuve que ce dernier est consommé par la souche et est bel et bien utilisé pour former l'acide muconique.

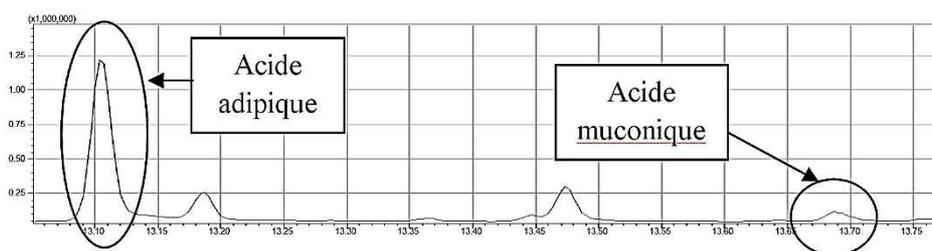


Figure 5 : Chromatogramme du puits à 4g/l de benzoate (*Acinetobacter radioresistens*)

Après 6 jours d'incubation de la microplaque, l'intensité de croissance d'*Acinetobacter radioresistens* en présence de benzoate à 4g/l et à 5g/l a été suffisante afin de réaliser des tests complémentaires. *Acinetobacter radioresistens* est une souche capable de se développer facilement et rapidement en présence de benzoate. Il est donc intéressant de poursuivre les recherches à partir de cette souche.

Néanmoins, la quantité produite d'acide muconique par la souche est très faible (quelques milligrammes) au point qu'elle se situe en dessous de la

<sup>2</sup> L'absence du pic chromatographique du benzoate vers 12 minutes n'est pas visible en fig.5, mais ce fait a pu être vérifié sur un autre chromatogramme qui n'est pas montré dans cet article.

limite de détection de la méthode d'analyse ( $C_s/C_i=0,072$ ). D'où, des repiquages successifs dans des volumes croissants de Minimal medium en présence de benzoate (5g/l) ont été réalisés afin d'adapter la souche choisie au milieu de culture d'intérêt. Cette adaptation a permis d'accroître la quantité d'acide muconique produite et d'atteindre des concentrations détectables par la méthode d'analyse.

### **3.2. Tests complémentaires réalisés avec la souche *Acinetobacter radioresistens***

#### ***Tests d'inhibitions enzymatiques***

Le but de ces expériences d'inhibition consistait à observer une augmentation de l'intensité du pic chromatographique de l'acide muconique produit par *Acinetobacter radioresistens*.

Afin de favoriser au mieux la production d'acide muconique, deux enzymes doivent être inhibées (fig.6) :

- la catéchol-2,3-dioxygénase catalysant le clivage en méta du catéchol conduisant à la formation d'un composé non intéressant (2-hydroxy muconique semialdéhyde),
- et la muconate cycloisomérase catalysant la cyclisation en muconolactone de l'acide muconique une fois qu'il est produit.

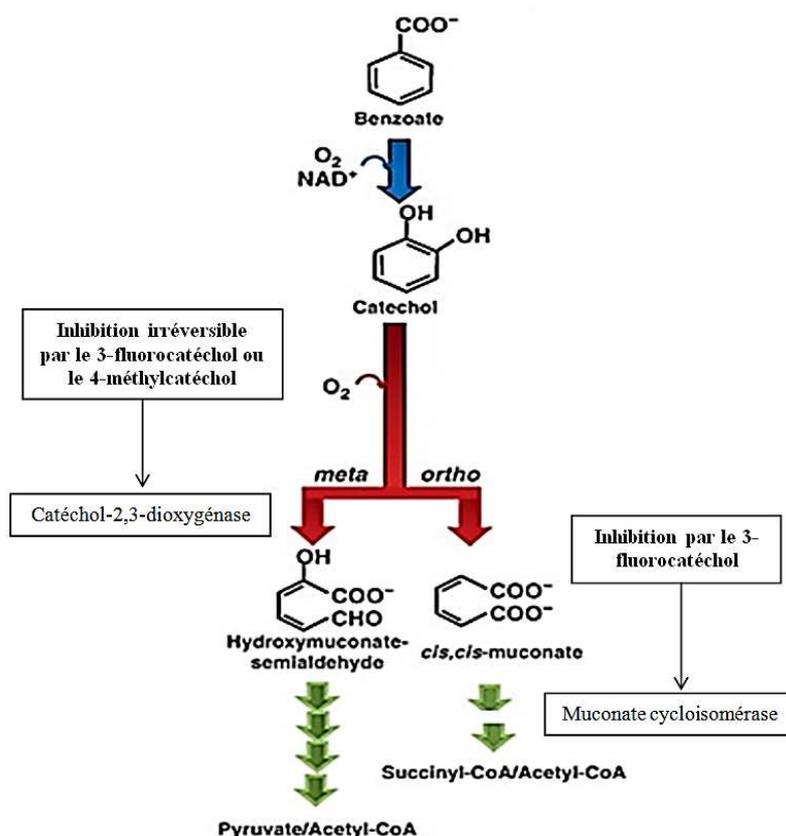


Figure 6 : Stratégie d'inhibitions sur le métabolisme de dégradation du benzoate [10]

Lors de cette expérience, deux inhibiteurs ont été utilisés à savoir, le 3-fluorocatéchol et le 4-méthylcatéchol réalisant tous les deux des inhibitions irréversibles des enzymes ciblées en figure 6.

#### **Exemple : Utilisation de l'inhibiteur 3-fluorocatéchol**

Cette expérience consistait à ajouter un inhibiteur d'enzyme, le 3-fluorocatéchol. Celui-ci réalise une inhibition « suicide » de l'enzyme catéchol-2,3-dioxygénase. L'emploi de cette substance inhibitrice a pour conséquence le blocage du clivage en méta du catéchol produisant le 2-hydroxymuconic semialdéhyde. En effet, l'inhibition suicide est un mécanisme où l'inhibiteur forme un complexe stable avec l'enzyme qui inactive celle-ci de façon permanente. L'enzyme reconnaît l'inhibiteur

comme son substrat et entame le processus de modification de ce dernier. Intervient alors une étape au cours de laquelle l'inhibiteur modifié devient très réactif et se lie de façon très stable à l'enzyme.

Dans notre cas, le 3-fluorocatéchol s'oxyde lorsqu'il se lie à l'enzyme, il devient alors un acide (acide 5-fluoroformyl penta-2,4-diénoïque) très réactif en présence de groupements amines de l'enzyme qui devient inactive irréversiblement [11].

De plus le 3-fluorocatéchol est converti par la bactérie en 2-fluoro-cis, cis-muconate. Ce dernier est capable d'inhiber l'action de la muconate cycloisomérase. Le 2-fluoro-cis, cis-muconate a pour rôle de bloquer la transformation de l'acide muconique en muconolactone.

Des bactéries de la souche *Acinetobacter radioresistens* ont été mises en culture en microplaque en présence de benzoate (5g/l) et de différentes concentrations en inhibiteur 3-fluorocatéchol allant de 0 à 3g/l. Le but était de connaître la concentration maximale en inhibiteur à ajouter dans le milieu afin d'éviter la mort des microorganismes et afin d'obtenir un pic détectable d'acide muconique. L'inhibiteur est ajouté à deux moments différents ; l'un dès le début de la croissance et l'autre au cours de la croissance bactérienne.

La première étape consistait à déterminer la concentration maximale en inhibiteur admissible par la souche bactérienne en ajoutant différentes concentrations en inhibiteur au démarrage de la croissance bactérienne. La concentration maximale admissible ou concentration minimale inhibitrice en 3-fluorocatéchol par la souche s'est révélée de 0,1g/l.

La deuxième étape consistait à observer les effets d'inhibitions sur le métabolisme de dégradation du benzoate en ajoutant différentes concentrations en inhibiteur en fin de croissance bactérienne (environ 72h).

Les figures 7 et 8 démontrent que l'ajout d'inhibiteur permet de former l'acide muconique suite à l'arrêt de la conversion de celui-ci en muconolactone, ainsi que par l'inhibition du clivage en méta du catéchol.

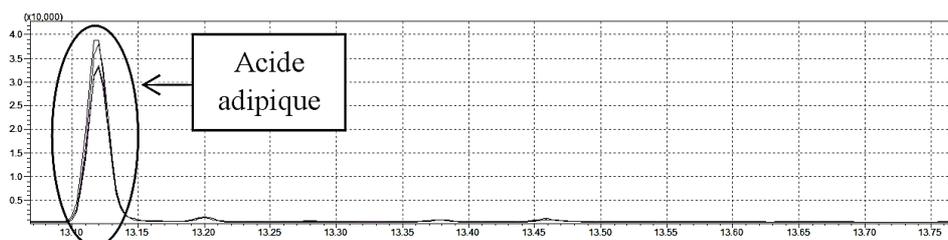


Figure 7 : Test 3-fluorocatéchol : Résultats des puits en absence de 3-fluorocatéchol

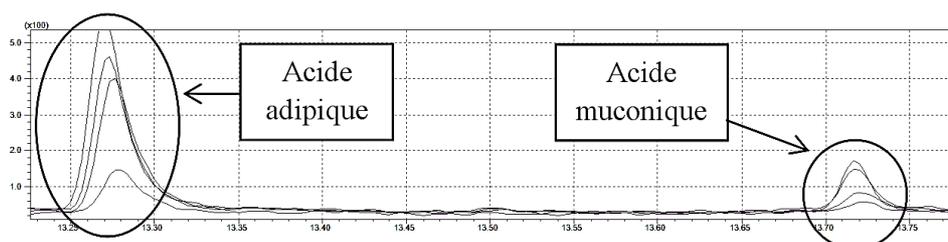


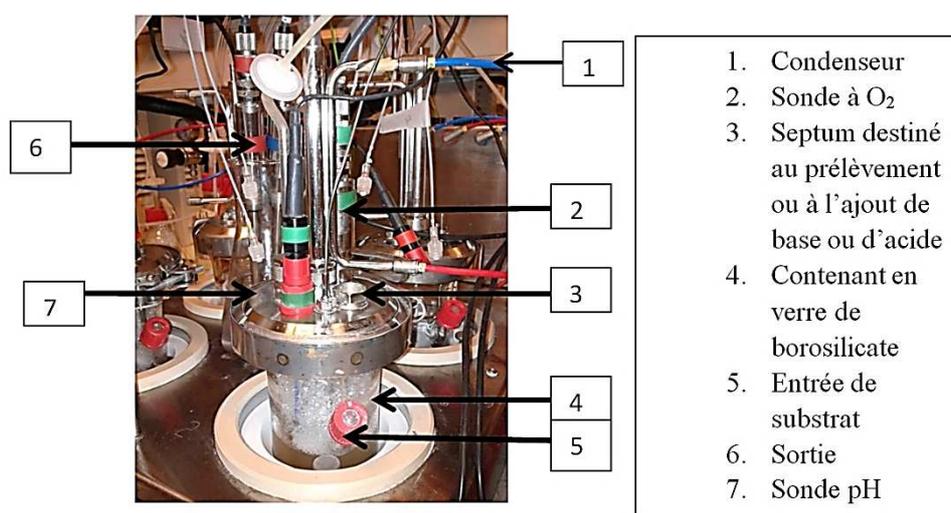
Figure 8 : Test 3-fluorocatéchol : Résultats des puits en présence de 3-fluorocatéchol

L'ajout de 3-fluorocatéchol est bénéfique pour la production d'acide muconique. Ceci est la preuve qu'il existe des voies de dégradation de l'acide muconique au niveau du métabolisme d'intérêt.

Informations supplémentaires : En ce qui concerne l'autre inhibiteur testé, à savoir le 4-méthylcatéchol, la souche est capable de croître en présence d'une concentration maximale en 4-méthyl catéchol de 0,03g/l. Au-delà de cette concentration, il y a inhibition de la croissance bactérienne. Tout comme le 3-fluorocatéchol, l'ajout de 4-méthylcatéchol est bénéfique pour la production d'acide muconique. Dans le métabolisme de dégradation du benzoate, une partie du catéchol subit un clivage en méta, l'ajout d'inhibiteur permet d'empêcher l'action de la catéchol-2,3-dioxygénase.

### ***Culture en fermenteur de la souche *Acinetobacter radioresistens****

La dernière étape du travail consistait à réaliser la culture d'*Acinetobacter radioresistens* dans des petits réacteurs de 200ml de type *Das Gip* (fig. 9) en présence du Minimal medium et de 5g/l de benzoate et en absence d'inhibiteur. Ce système permettait d'une part, de contrôler avec précision l'aération, l'agitation et la température du milieu et d'autre part, de suivre au cours du temps le pourcentage d'oxygène dissout, le pH et l'absorbance. Par le biais des analyses, les évolutions du glucose, de l'acide succinique, du benzoate et de l'acide muconique pouvaient être mises en évidence. Cette manipulation avait pour objectif de mieux comprendre le fonctionnement de la souche choisie en termes de croissance et de métabolisme.



*Figure 9: Réacteur Das Gip*

À différents temps, des échantillons de la culture ont été prélevés et chaque échantillon a fait l'objet :

- d'une mesure d'absorbance à 600nm dans le but de tracer une courbe de croissance,
- d'une analyse GC/MS afin de visualiser et de quantifier la production d'acide muconique au cours du temps, et
- de deux analyses HPLC (chromatographie liquide à haute performance) afin de visualiser et de quantifier les consommations de benzoate, d'acide succinique et de glucose au fur et à mesure de la croissance bactérienne.

La souche *Acinetobacter radioresistens* provenant de la firme DSMZ ne consomme pas le glucose. Cette constatation a pu être vérifiée dans la littérature (fig. 10).

Des souches d'*Acinetobacter radioresistens* ont été isolées d'échantillons de coton et de sol. La résistance aux radiations gamma a été examinée sur trois souches dont l'une est la souche que nous possédons [12].

Characteristic	RRA (3 strains) <sup>a</sup>
Assimilation of:	
Citrate	— <sup>b</sup>
Malonate	+
L-Arabinose	—
L-Leucine	+
Acid from:	
L-Arabinose	—
D-Ribose	—
D-Xylose	—
D-Galactose	—
<b>D-Glucose</b>	—
D-Mannose	—
L-Rhamnose	—
D-Glucosamine	—
Lactose	—
Growth at 42°C	+
Major fatty acids	C <sub>18:1</sub> , C <sub>16:1</sub> , C <sub>16:0</sub>
Guanine-plus-cytosine content of DNA (mol%)	44.1–44.8 <sup>c</sup>

Figure 10 : Métabolisme d'*Acinetobacter radioresistens* [12]

Les courbes à la figure 11 montrent que la bactérie commençait à consommer l'acide succinique après 1h d'adaptation dans le milieu de culture. Après 22h de croissance, les bactéries se situaient en phase stationnaire (absorbance de 2,5 unités) et la totalité de l'acide succinique est assimilée (ce temps de culture correspondait également au moment où le pourcentage d'oxygène dissout est au plus bas). Quant au benzoate, il a été converti en acide muconique par le métabolisme de dégradation. Nous avons observé une augmentation de la quantité d'acide muconique produite et une diminution de benzoate significative jusqu'à 22h de croissance. La plus grande concentration d'acide muconique (30 mg/l) a été détectée après 22h de croissance. Au-delà de ce temps, l'acide muconique produit était dégradé.

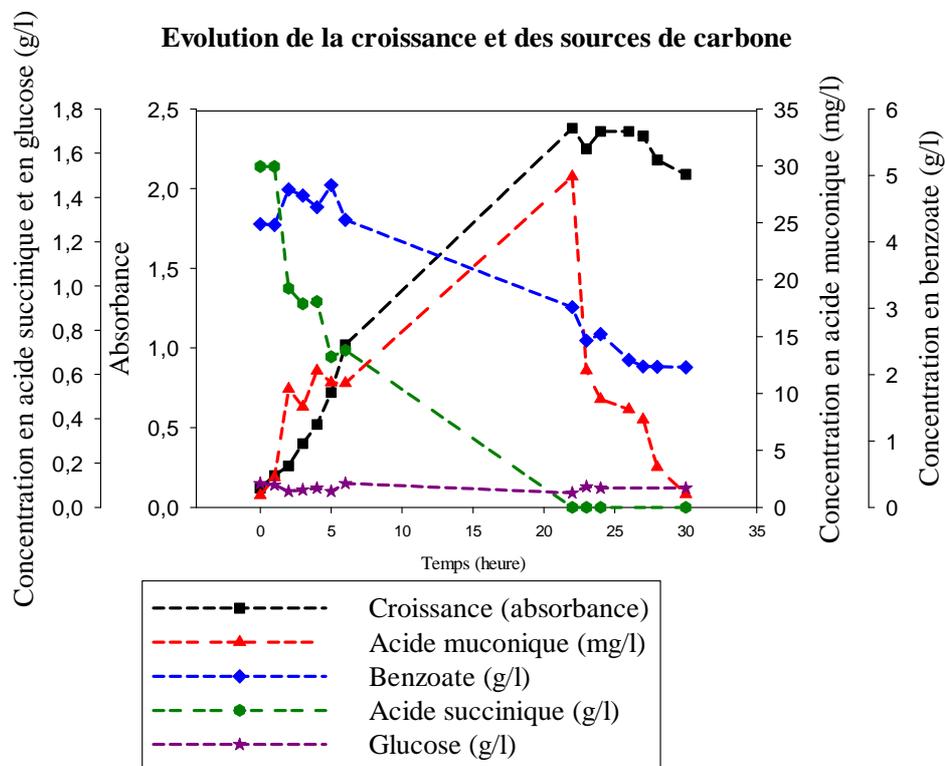


Figure 11 : Evolution des différentes sources de carbone (réacteur Das Gip)

Remarque : Une mesure du poids sec de 5 ml de culture a été réalisée dans le but de connaître le pourcentage d'acide muconique produit. Au maximum, 1 gramme de bactéries produisait 30 milligrammes d'acide muconique soit presque 3% en masse, ce qui n'est pas anecdotique.

#### 4. Conclusion et perspectives

Parmi les microorganismes sélectionnés, seules les souches aérobies ont été testées, car la production d'acide muconique requiert la présence d'oxygène. Les souches recherchées devaient être capables d'une part de se développer dans un milieu minimal en présence d'une haute concentration en benzoate et d'autre part de produire de l'acide muconique détectable.

Le tableau 2 est un récapitulatif des critères de croissance qui ont été recherchés.

Souche	Croissance à 33°C dans Nutrient broth	Croissance à 33°C en présence d'une basse concentration en benzoate (2g/l)	Croissance à 33°C en présence d'une haute concentration en benzoate (5g/l)	Production d'acide muconique
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Oui	Oui	Non	Non
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Oui	Oui	Non	Non
<i>Rhodococcus opacus</i>	Oui	Oui	Non	Oui
<i>Sphingomonas haloaromaticamans</i>	Oui	Non	Non	Non

Tableau 2 : Récapitulatif des critères de croissance recherchés

Grâce à ses capacités de croissance dans un milieu contenant une haute concentration en benzoate et de production d'acide muconique, la souche *Acinetobacter radioresistens* a été retenue.

Certes, l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes est intéressante et bénéfique pour la production d'acide muconique. Ceci démontre l'existence de voies de dégradation au niveau du métabolisme.

Enfin, la souche *Acinetobacter radioresistens* est une bactérie aérobie non consommatrice de glucose. Au cours des premières heures de croissance,

celle-ci consomme à la fois l'acide succinique et le benzoate. La consommation de benzoate se traduit par la production d'acide muconique. Ce dernier ne s'accumule pas dans le milieu et est à son tour dégradé par le métabolisme énergétique.

Bref, la souche *Acinetobacter radioresistens* est un microorganisme intéressant pour la suite des recherches. Les prochaines étapes consisteront à :

- optimiser la croissance bactérienne en présence d'acide succinique et tester d'autres sources de carbone,
- optimiser la production d'acide muconique,
- procéder à la mutagenèse et l'analyse génétique de la souche concernée afin de former des clones ayant une forte capacité de production et d'accumulation d'acide muconique.

## 5. Remerciements

Mes premiers remerciements sont adressés à Monsieur Langer, Directeur Général de Materia Nova, qui m'a offert l'opportunité de réaliser ce stage au sein de son entreprise.

Je remercie vivement mon maître de stage et coordinateur de l'unité Biotechnologie, Monsieur Onderwater, pour son aide, sa disponibilité et son suivi tout au long de mon travail de fin d'études.

J'adresse aussi des remerciements à l'ensemble du personnel du Centre de recherches, et plus particulièrement à l'équipe de Biotechnologie, pour ses chaleureux conseils, l'aide fournie et son envie de partager ses connaissances.

## 6. Sources

- [1] MACHEIX J-J., FLEURIET A., JAY-ALLEMAND C., 2005, *Les composés phénoliques des végétaux – Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*, Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes
- [2] PELMONT Jean, 2005, *Biodégradation et métabolismes- Les bactéries pour les technologies de l'environnement*, France, EDP Sciences

- [3] POLEN T., SPELBERG M., BOTT M., 2012, *Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables*, Science Direct, juillet
- [4] SIGMA-ALDRICH, (consulté le 06.10.12), *Cis, Cis Muconic acid et Trans, Trans Muconic acid*,  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ALDRICH/>
- [5] HUMAN METABOLOME DATABASE, (consulté le 06.10.12),  
*trans-trans-Muconic acid*,  
<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB02349>
- [6] TECHNO-SCIENCES, (consulté le 23.09.12), *Bioremédiation*,  
<http://www.techno-science.net/?onglet=glossaire&definition=3430>
- [7] HAUSMANN U., et al., 2009, *Physiological adaptation of Corynebacterium glutamicum to benzoate as alternative carbon source – a membrane proteome-centric view*  
*Proteomics*, Wiley Proteomics-journal, pp. 9.14, 3635-3651
- [8] WU C-M., et al., 2004, *Microbial synthesis of cis, cis-muconic acid by sphingobacterium sp. GCG generated from effluent of a styrene monomer (SM) production plant*, 35, Science Direct, décembre, pp. 598-604
- [9] ENZYSCREEN, (consulté le 13.10.12) “*System Duetz*”,  
<http://www.enzymscreen.com/1994231.htm>  
<http://www.techno-science.net/?onglet=glossaire&definition=3430>
- [10] DIAZ Eduardo, et al., 2012, *Aerobic degradation of aromatic compounds*, Science Direct, November
- [11] BARTELS I., KNACKMUSS H-J., and REINEKE W., 1984, *Suicide Inactivation of Catechol 2,3-Dioxygenase from Pseudomonas putida mt-2 by 3-Halocatechols*, 47(3) Applied and environmental microbiology, mars, pp. 500-505
- [12] YUKIMASA N., TAKESHI I., HIROSHI I., 1988, *Acinetobacter radioresistens sp. nov. Isolated from Cotton and Soil*, 38(2), International Journal Of Systematic Bacteriology, avril, pp. 209-211