



**HAL**  
open science

# Amélioration des connaissances de la physiologie de *Candida shehatae* pour une quantification des phénomènes biologiques et leur modélisation lors de la fermentation alcoolique des pentoses

Julie Montheard

► **To cite this version:**

Julie Montheard. Amélioration des connaissances de la physiologie de *Candida shehatae* pour une quantification des phénomènes biologiques et leur modélisation lors de la fermentation alcoolique des pentoses. Mycologie. INSA de Toulouse, 2013. Français. NNT : 2013ISAT0048 . tel-04416478

**HAL Id: tel-04416478**

**<https://theses.hal.science/tel-04416478>**

Submitted on 25 Jan 2024

**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.



THÈSE DE  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées

Discipline : Ingénierie Microbienne et Enzymatique

---

Présenté par Julie MONTHÉARD

Soutenu le : 26/09/2013

Titre : **Amélioration des connaissances de la physiologie de *Candida shehatae*  
pour une quantification des phénomènes biologiques  
et leur modélisation lors de la fermentation alcoolique des pentoses**

---

**Jury**

Marielle BOUIX – professeur – AgroParisTech (rapporteur)

Emmanuel GUEDON – chargé de recherche – CNRS LRGP ENSAIA Nancy (rapporteur)

Jean Claude SIGOILLOT – professeur – ESIL Marseille (examineur)

Frédéric MARTEL – directeur de Procéthol 2G – (examineur)

Carine BIDEAUX – ingénieur de recherche – INSA Toulouse (examinatrice)

Claire DUMON – chargé de recherche – INSA Toulouse (invitée)

Carole MOLINA-JOUE – professeur – INSA Toulouse (directrice de thèse)

Sandrine ALFENORE – maître de conférences – INSA Toulouse (co-directrice de thèse)

---

École doctorale : Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Biologiques (SEVAB)

Unité de recherche : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

Directeurs de thèse : Carole MOLINA-JOUE en co-direction avec Sandrine ALFENORE

Rapporteurs : Pr. Marielle BOUIX et Dr. Emmanuel GUEDON



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Marielle BOUIX et Emmanuel GUEDON d'accepter le rôle de rapporteurs et l'ensemble des membres du jury, Jean Claude SIGOILLOT Frédéric MARTEL et Claire DUMON, d'avoir apporter un regard critique sur mon travail. Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet FUTUROL et grâce au soutien du partenaire OSEO Innovation.

Je remercie tout particulièrement mes encadrantes, Sandrine ALFENORE, Carine BIDEAUX et Carole JOUVE pour leurs encouragements et l'aide qu'elles m'ont apporté tout au long des ces trois années dans l'EAD8. Elles m'ont permis d'exprimer le meilleur de moi-même et ont toujours été présentes lorsque je les ai sollicitées.

Je remercie l'équipe FAME pour son accueil chaleureux au sein du LISBP, et plus particulièrement mes collègues, Xavier, Eric, Nathalie, César, Stéphane, Luc, Julie B, Elodie, Estelle, Cuong, Léa, Maud, Céline, Lannig, Jillian, Elodie B, Sandrine, Julie L, Alexis, Damien, Jan, Madalen, Rhana, Mélodie, Julien, Lucie, Greg, et les anciens, Yannick, Bérangère, Emilie. Mon séjour au LISBP aura été riche en bon moments et en enthousiasme.

Un grand merci à Sandy, car plus qu'une collègue, elle est devenue une amie, et que nos moments partagés dans ce labo et en dehors me sont chers. Nous n'aurons pas succombé d'overdose de bonbons au cours de nos nuits de fermentation !

Je remercie ensuite tout mes amis qui ont réussi à me porter, ces trois années ont été synonyme de changement pour moi, Camille, Gille, Sakina, Romain, Audrey, Anthony, Ben, Simon, Victor, Boris.... Et enfin merci aux membres de la CREA, qui sont désormais ma famille d'adoption et mes camarades de lendemains qui chantent.



Nom : MONTHEARD

Prénom : Julie

Titre : « Amélioration des connaissances de la physiologie de *Candida shehatae* pour une quantification des phénomènes biologiques et leur modélisation lors de la fermentation alcoolique des pentoses »

Année : 2013

Lieu : INSA Toulouse

---

Résumé :

Ces travaux visaient à étudier le métabolisme du xylose chez *Candida shehatae*, afin de comprendre les relations entre la répartition des flux de carbone intracellulaires et la vitesse de consommation d'oxygène et/ou de substrat xylose dans un premier temps et d'étudier la possibilité de définir des conditions expérimentales pour l'optimisation de la conversion du carbone en éthanol dans un second temps. Les rendements théoriques limites ainsi que la description des flux intracellulaires en condition de croissance et de production d'éthanol ont été décrit à l'aide d'un modèle métabolique. Ce modèle a été développé spécifiquement dans le cadre de cette étude, puis validé en conditions expérimentales.

Une stratégie couplant la description des flux intracellulaires et l'expérimentation a permis de définir des conditions expérimentales d'optimisation du rendement en éthanol à partir de xylose, en modulant le ratio du flux d'oxygène sur le flux de substrat consommé. La mise en œuvre de cette stratégie a permis d'obtenir un rendement en éthanol de 0.51 Cmol.Cmol<sup>-1</sup> au cours d'une culture continue atteignant ainsi 85 % du rendement théorique prévu par le modèle.

L'analyse fine des résultats grâce au modèle métabolique a permis de mettre en évidence la distribution des flux intracellulaire et la flexibilité métabolique en rapport avec les flux de xylose et d'oxygène et les cofacteurs de la XR et ainsi d'améliorer les connaissances du métabolisme de *Candida shehatae*, notamment en ce qui concerne les aspects énergétiques et la balance oxydo-réductive.

Mots-clés :

métabolisme du xylose, *Candida shehatae*, flux métabolique, éthanol, cofacteurs, modélisation métabolique, fermentation



Name: MONTHEARD

First name: Julie

Title: « Improvement of knowledge about *Candida shehatae* physiology to quantified biological phenomenon and model them during alcoholic fermentation of pentose »

Year: 2013

Place: INSA Toulouse

---

Abstract:

This work deals with the xylose metabolism of *Candida shehatae* in order to: first understanding the relationships between the distribution of intracellular carbon fluxes and the oxygen and/or substrate consumption rates to determine experimental conditions optimizing the carbon conversion into ethanol. The maximum theoretical yields, and the description of intracellular fluxes both for growth and ethanol production conditions were described using a metabolic model. This model was developed specifically in this study, and validated towards experimental conditions.

A strategy coupling intracellular fluxes analysis (by the modeling approach) and experiments allowed to propose experimental conditions to optimize the ethanol yield from xylose modulating the ratio between oxygen and xylose fluxes. This strategy resulted in an ethanol yield of 0.51 Cmol.Cmol<sup>-1</sup> during a continuous culture, reaching 85 % of the theoretical yield predicted by the model. Thanks to the metabolic model, the results highlighted the intracellular fluxes distribution, and the metabolic flexibility in relation with the oxygen and xylose fluxes, and contributed to improve the knowledge of the metabolism of *Candida shehatae*, especially regarding energy issues and the oxydo-reductive balances.

Key words:

xylose metabolism, *Candida shehatae*, ethanol yield optimization, metabolic flux analysis



# SOMMAIRE

---

SOMMAIRE .....	9
Liste des figures.....	12
Liste des tableaux.....	17
Introduction générale .....	19
Chapitre 1. Bibliographie .....	26
1.1. Les pentoses et le métabolisme microbien du xylose : généralités .....	27
1.2. Physiologie et métabolisme de <i>Candida shehatae</i> sur xylose .....	36
1.2.1. Conditions environnementales de culture .....	36
1.2.2. Performances sur substrat xylose .....	37
1.2.3. Production de métabolites autres que l'éthanol .....	40
1.2.3.1. Production de xylitol et glycérol .....	40
1.2.3.2. Production d'acides organiques.....	41
1.2.4. Viabilité de <i>C.shehatae</i> .....	42
1.2.5. Tolérance à l'éthanol.....	43
1.3. Les points clés du métabolisme de <i>Candida shehatae</i> sur xylose .....	48
1.3.1. Généralités sur la régulation des sucres.....	48
1.3.2. Mécanisme de transport des sucres .....	50
1.3.3. Cofacteurs : les étapes clés dans l'équilibre oxydo-réductif .....	52
1.3.3.1. La xylose réductase .....	52
1.3.3.2. Métabolisme du xylulose .....	53
1.3.3.3. Métabolisme du pyruvate et voies fermentaires .....	55
1.3.4. Rôles de l'oxygène.....	58
1.3.4.1. Généralités .....	58
1.3.4.2. Quantification de l'effet oxygène .....	59
1.4. Modélisation .....	66
1.4.1. Le modèle de Nakamura <i>et al.</i> , (2001) .....	68
1.4.2. Modèle d'Alexander <i>et al.</i> , (1988a).....	69
1.4.3. Modèle de Rizzi <i>et al.</i> ,(1989).....	69

1.4.4.	L'Analyse de Flux Métabolique.....	71
1.4.4.1.	Application de MFA à l'étude de la fermentation du xylose .....	72
1.4.4.2.	Points forts et points faibles de chaque modèle .....	74
1.5.	Analyse critique de la bibliographie.....	76
Chapitre 2.	Matériels et Méthodes Expérimentales.....	81
2.1.	Souches et milieux de fermentation.....	81
2.2.	Propagation.....	83
2.3.	Mise en œuvre de <i>Candida shehatae</i> en bioréacteur .....	84
2.3.1.	Culture continue.....	84
2.3.2.	Culture discontinue alimentée .....	85
2.3.3.	Apport d'oxygène .....	86
2.3.4.	Évaluation de l'évaporation.....	87
2.4.	Méthodes analytiques .....	88
2.4.1.	Prélèvement des échantillons de culture.....	88
2.4.2.	Mesure de la biomasse.....	88
2.4.3.	Dosages des sucres et produits de fermentation.....	89
2.4.4.	Dosage du xylose extracellulaire .....	91
2.4.5.	Dosage des solutions de xylose .....	91
2.4.6.	Mesure des gaz.....	92
2.4.7.	Mesure de l'activité métabolique et de la perméabilité cellulaire .....	93
2.5.	Traitement des données .....	101
2.5.1.	Calcul des vitesses des métabolites en solution .....	101
2.5.2.	Calcul des vitesses de consommation d'O <sub>2</sub> et de production de CO <sub>2</sub> .....	103
2.5.3.	Rendements globaux et instantanés .....	103
2.5.4.	Lissage .....	104
2.5.5.	Bilans carbonés et élémentaires .....	104
2.5.6.	Réconciliation des données.....	105
Chapitre 3.	Modélisation du réseau métabolique.....	107
3.1.	Rappel du principe des modèles MFA .....	109
3.2.	Formulation et écriture mathématique.....	111
3.3.	Construction et validation du réseau métabolique .....	115
3.4.	Les résultats des modèles.....	142

3.4.1.	Calcul du rendement théorique limite de production de biomasse .....	142
3.4.2.	Calcul du rendement théorique limite de production d'éthanol .....	145
3.5.	Etude de l'impact des cofacteurs de la xylose réductase sur le métabolisme .....	150
3.5.1.	Impact du <i>coeffnadph</i> en condition de croissance.....	150
3.5.2.	Impact en condition de production d'éthanol .....	154
3.6.	Conclusion et discussion sur la construction de deux modèles pour <i>Candida shehatae</i> .....	160
Chapitre 4.	Caractérisation du métabolisme du xylose chez <i>C.shehatae</i> en condition aérobie, oxygène limité et anaérobie .....	167
4.1.	Cultures de <i>C.shehatae</i> en environnement contrôlé : analyses quantitatives macroscopiques et dynamiques .....	169
4.1.1.	Analyses macroscopiques.....	169
4.1.2.	Analyse comparée des distributions macroscopiques du carbone en fonction des conditions de culture .....	177
4.1.3.	Analyse des cinétiques de cultures .....	179
4.1.4.	Tolérance à l'éthanol et viabilité .....	188
4.2.	Analyse comparée.....	191
4.2.1.	Analyse comparée lors de la croissance.....	192
4.2.2.	Analyse comparée en production d'éthanol .....	196
4.2.3.	Analyse de la bascule respiro-fermentaire.....	199
4.2.4.	Etude sur l'impact du rendement oxygène .....	207
4.2.5.	Analyse des flux intracellulaires en condition anaérobie.....	211
Discussion.....		217
Perspectives .....		222
Références bibliographiques.....		225
Annexe.....		237

## Liste des figures

---

Figure 1. Voies de dégradation du xylose .....	28
Figure 2. Quatre hypothèses du métabolisme réductif du xylose prenant en compte l'équilibre oxydo-réductif. Les couleurs indiquent les voies principales : rouge : partie oxydative de la voie des PP ; bleu : partie non-oxydative de la voie des PP ; vert : glycolyse. Abréviations : C6P : hexose-6-phosphate, C5P : pentose-5-phosphate, C3P : triose-3-phosphate. Hypothèses : (a) XR NADPH-dépendante en présence d'oxygène comme accepteur final d'électrons ; (b) XR NADPH-dépendante en absence d'oxygène, la production de glycérol est nécessaire pour l'équilibre redox mais entraîne un bilan énergétique négatif, ce qui rend ce scénario impossible ; (c) XR NADPH et NADH dépendante (50/50) en absence d'oxygène, L'excès de NADH est compensé par une production de xylitol ; (d) XR NADH dépendante (équivalent à la XI) sans oxygène. Source : Kuyper et al., (2004).....	32
Figure 3. Représentation schématique du métabolisme du xylose indiquant les conséquences d'une XR strictement NADPH dépendante et de la présence d'une phosphokétolase. La formation d'éthanol en condition anaérobie est possible uniquement dans le cas où l'acétyl-phosphate est converti en éthanol via des enzymes NADH/NAD <sup>+</sup> dépendantes. Source : Van Dijken & Scheffers, (1986). Le décompte de l'ATP est réalisé dans le cadre de l'analyse bibliographique, en accord avec la figure 4. ....	34
Figure 4. Schéma général des voies métaboliques principales. Les cofacteurs et molécules énergétiques indiquées sont celles produites au cours de la réaction lorsque celle-ci a lieu dans le sens indiqué par la flèche. ....	35
Figure 5. Profils des taux de croissance (A : $\triangle$ - B : $\bullet$ ), vitesse volumique de production d'éthanol (A : $\blacksquare$ ) et vitesses spécifiques de production d'éthanol (A : $\square$ et B : $\blacksquare$ ) en fonction de la concentration en éthanol lors de production d'éthanol endogène. Les conditions de cultures sont : (A) Fermentation en mode discontinu alimenté ( $pO_2 = 0.7\%$ de pression partielle saturante) de <i>C.shehatae</i> CSIR-Y981 à 30°C – pH 4.5 sur substrat xylose - (B) Fermentation en mode discontinu alimenté en limitation d'oxygène ( $qO_2 = 1.19 \pm 0.09 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) de <i>C.shehatae</i> ATCC22984 à 30°C – pH 4.5 sur substrat xylose (symboles clairs) ou glucose (symboles noirs). Sources : (A) DuPreez et al., (1989a) – (B) Fromanger et al., (2010). ....	44
Figure 6. Concentrations critiques en éthanol pour la croissance et la production d'éthanol pour différentes souches de <i>C.shehatae</i> . Source : DuPreez et al., (1989a). ....	45
Figure 7. Schéma des deux systèmes de transport des sucres chez <i>C.shehatae</i> . A/ Diffusion facilitée par une protéine de transport en fonction du gradient de sucre entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. B/ Ose-proton symport fonction du gradient de concentration et de la force proton motrice. Sur la base de l'ouvrage de Singh & Mishra, (1995).....	50
Figure 8. Paramètres cinétiques du transport du glucose et du xylose pour <i>C.shehatae</i> IGC 3607 à pH 5 et à 25°C. Source : Lucas & van Uden (1986). ....	51
Figure 9. Voie des pentoses phosphates. Le segment oxydatif est encadré en jaune. Source : <a href="http://flipper.diff.org/app/pathways/info/1557">http://flipper.diff.org/app/pathways/info/1557</a> .....	54

Figure 10. Métabolisme du pyruvate. Les enzymes sont : PDH complexe de la pyruvate déshydrogénase, LDH lactate déshydrogénase, ADH alcool déshydrogénase, Ald.DH acétaldéhyde déshydrogénase. Source : sur la base de <a href="http://guweb2.gonzaga.edu">http://guweb2.gonzaga.edu</a> . .....	56
Figure 11. Activités spécifique (U/mg) des enzymes PDC, ADH et Ald.DH après une diminution de la quantité d'oxygène disponible de 80 à 0 % lors d'une culture de <i>C.utilis</i> sur xylose. Source : Passoth et al, (1996). .....	58
Figure 12. (A) Consommation du xylose et (B) production d'éthanol lors de fermentation discontinues de <i>C.tropicalis</i> en fonction de la vitesse de transfert d'O <sub>2</sub> (●) 0.5 mmolO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ; (▲) 5 mmolO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ; (□) 7 mmolO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ; (■) 13 mmolO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> . Source : Lohmeier-Vogel et al, 1989. (C) Rendements en éthanol, xylitol et biomasse et (D) vitesses spécifiques (Q <sub>s</sub> ) et volumiques (Q <sub>v</sub> ) de production d'éthanol et xylitol en fonction de la vitesse de transfert d'O <sub>2</sub> (mmolO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) lors de cultures de <i>C.shehatae</i> en fioles. Les valeurs sur le graphique C correspondent aux concentrations maximales observées. Source : Hinfray et al, 1995.....	60
Figure 13. Vitesses spécifiques de consommation de xylose et d'O <sub>2</sub> en fonction du taux de dilution lors de cultures de <i>C.shehatae</i> en mode continu (pH 4.5) en aérobie stricte (à gauche) ou en limitation d'O <sub>2</sub> (à droite). Source : Alexander et al, (1988a). .....	63
Figure 14. Distribution du carbone en Cmol.Cmol <sup>-1</sup> de xylose ou glucose en cultures discontinues alimentées limitées en oxygène pour <i>C.shehatae</i> (pH 4.5, 30°C). La moyenne de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène est exprimée en mmolO <sub>2</sub> .gX <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> . Source : Fromanger et al, (2010). .....	64
Figure 15. Rendements en éthanol (A) et biomasse (B) en fonction du rendement en O <sub>2</sub> . Les résultats expérimentaux sont donnés en triangles pleins. Les autres symboles correspondent à des simulations sur la base des réseaux métaboliques possibles. Les résultats sont obtenus lors de cultures discontinues sur glucose et xylose (pH 6, 30°C). Source : Unrean & Nguyen, (2012). .....	64
Figure 16. Constante de temps des phénomènes d'adaptation biologique et des processus physiques. Source : sur la base des travaux de Roels, (1983).....	67
Figure 17. Relation entre le flux d'oxygène entrant et le pourcentage d'azote dans le mélange de gaz entrant. ....	86
Figure 18. Evolution de la vitesse d'évaporation de l'éthanol en fonction de la concentration en éthanol et du couple aération/agitation dans un réacteur 5L dans les conditions décrites ci-dessus. ....	87
Figure 19. Corrélation concentration = f(densité) obtenue expérimentalement pour le xylose .....	92
Figure 20. Réseaux métaboliques et types de métabolites du système. ....	110
Figure 21. Conventions de notations et frontière des systèmes considérés. Source : Conférence de C.Bideaux, (2012) École thématique « Ingénierie des biosystèmes : de la cellule au procédé » Avril 2012, Saint Nazaire. ....	113
Figure 22. Représentation symbolique des matrices de travail. Source : Conférence de C.Bideaux, (2012) École thématique « Ingénierie des biosystèmes : de la cellule au procédé » Avril 2012, Saint Nazaire.....	113
Figure 23. Mécanisme de transport du NADH entre le cytosol et la mitochondrie par les deux navettes insérées dans les modèles métaboliques : A, navette malate-aspartate ENZYMES : aspartate amino-transférase (r23 et r96) ; malate déshydrogénase cytosolique (r79) ; malate déshydrogénase mitochondriale (r95). B, navette éthanol-acétaldéhyde. Enzymes : alcool déshydrogénases (r10 et r79).....	116
Figure 24. Formation de la biomasse à partir des précurseurs anaboliques.....	117
Figure 25. Rendement en biomasse (■), flux r15 dans la partie oxydative des PP r15 (□) et du FADH <sub>2</sub> dans la chaîne respiratoire r98 (○) simulés en mode oxydatif pur (i.e. production de biomasse et CO <sub>2</sub> exclusivement). Le	

coeffnadph est fixé à 0.67. Le flux r63 varie entre 0 et 800 mol.h <sup>-1</sup> et chaque point correspond à une valeur de flux r63 imposée. Les flèches correspondent aux limites imposées par le sens thermodynamique possible des réactions r98 et r15. ....	143
Figure 26. Simulation du rendement théorique limite en éthanol (●), du flux via la pyruvate déshydrogénase (r88) (△) et du flux de glucose-6-phosphate dans la voie oxydative des pentoses phosphates (r15) (□) en fonction du rendement oxygène sur xylose (mol.mol <sup>-1</sup> ) avec le coeffnadph fixé à 0.67. Les flèches indiquent les limites de validité de la relation due au sens thermodynamique. ....	147
Figure 27. Rendement biomasse sur xylose en Cmol.Cmol <sup>-1</sup> (●), flux du FADH <sub>2</sub> dans la chaîne respiratoire r98 (trait plein) et du flux pour la maintenance cellulaire r63 (trait pointillé) en fonction du coeffnadph traduisant la dualité de l'activité XR NADH et NADPH dépendantes. Calculs obtenus avec le modèle intégrant la navette éthanol-acétaldéhyde.....	151
Figure 28. Carte des flux intracellulaires pour quatre valeurs différentes de coeffnadph 0/0.5/0.67/1; les valeurs de flux identifiées sont normées par rapport au flux de biomasse produite (1000 g <sub>biomasse</sub> .h <sup>-1</sup> ). Les calculs sont réalisés avec les 2 modèles construits : les valeurs données sur la ligne supérieure sont obtenues avec le modèle navette éthanol-acétaldéhyde, les valeurs données sur la ligne inférieure sont celles obtenues avec le modèle navette malate-aspartate. Si les flux obtenus par les 2 modèles sont identiques, une seule ligne est présentée. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la réaction. Les flux sont exprimés en mol.h <sup>-1</sup> excepté le flux de biomasse (g.h <sup>-1</sup> ). n.a. = non attribué (n'est pas calculé selon le modèle considéré). Plus de 94 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes le reste étant contenu au niveau des réactions minoritaires non indiquées sur les cartes.....	153
Figure 29. Surface des solutions thermodynamiquement acceptables reliant le rendement éthanol (Cmol.Cmol <sup>-1</sup> ), le rendement oxygène (mol.mol <sup>-1</sup> ) et l'activité NADH et NADPH dépendante de la XR. Le Y <sub>oxygène/xylose</sub> varie entre 0 et 3 mol.mol <sup>-1</sup> et le coeffnadph entre 0 et 1, l'équation du plan est Y <sub>éthanol/xylose</sub> = -4.5495.10 <sup>-16</sup> *coeffnadph - 0.1333*Y <sub>oxygène/xylose</sub> . La surface grisée représentent l'ensemble des solutions et la surface triangulaire délimitée (trait plein) les solutions thermodynamiquement acceptables. ....	155
Figure 30. Carte des flux intracellulaires pour quatre valeurs différentes de coeffnadph 0/0.5/0.67/1; les valeurs de flux identifiées sont normées par rapport au flux de xylose entrant (100 mol <sub>xylose</sub> .h <sup>-1</sup> ). Les calculs sont réalisés avec les 2 modèles construits : les valeurs données sur la ligne supérieure sont obtenues avec le modèle navette éthanol-acétaldéhyde, les valeurs données sur la ligne inférieure sont celles obtenues avec le modèle navette malate-aspartate. Si les flux obtenus par les 2 modèles sont identiques, une seule ligne est présentée. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la réaction. Les flux sont exprimés en mol.h <sup>-1</sup> excepté le flux de biomasse (g.h <sup>-1</sup> ). n.a. = non attribué (n'est pas calculé selon le modèle considéré). 100 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes. ....	158
Figure 31. Quantités de NADH produites ou consommées exprimées en mol <sub>NADH</sub> pour 100 moles de xylose consommé à trois valeurs différentes coeffnadph (0, 0.5, 1). Les résultats sont obtenus avec le modèle possédant la navette éthanol. Les réactions cytosolique sont : r1 xylose → xylitol ; r2 xylitol → xylulose-5-phosphate ; r8 glycéraldéhyde-3-phosphate → pyruvate ; r10 acétaldéhyde → éthanol. Les réactions mitochondriales sont : r79 éthanol → acétaldéhyde ; r97 NADH + 1/2 O <sub>2</sub> → NAD <sup>+</sup> + ATP.....	159

Figure 32. Evolution de la masse de xylose consommé (◆), des masses de biomasse (○), xylitol (▲), éthanol (●) et acide succinique (◻) produites au cours de la culture « A » de C.shehatae en mode discontinu alimenté. Les symboles correspondent aux données brutes et les lignes aux données réconciliées. Les flèches correspondent aux ajouts de xylose : t = 17.1h – 46.9 g ; t = 18.8h – 40 g ; t = 21.4h – 40.7 g ; t = 22.7h – 110.6 g ; t = 25.4h – 312.5 g ; t = 30.1h – 301.7 g.....	170
Figure 33. Evolution de la masse de xylose consommé (◆), des masses de biomasse (○), xylitol (▲), et éthanol (●) produites au cours de la culture « B » de C.shehatae en mode discontinu alimenté. Les symboles correspondent aux données brutes et les lignes aux données réconciliées. Les flèches correspondent à la zone de limitation en xylose. ....	173
Figure 34. Evolution de la concentration en xylose (◆), des concentrations en biomasse (○), xylitol (▲), et éthanol (●) au cours de la culture « C » de C.shehatae en mode continu. Données expérimentales, les flèches représentent les zones définies en régime permanent. ....	175
Figure 35. Rendements moyens calculés en Cmole pour les différentes phases identifiées au cours des cultures A, B et C de C.shehatae. ....	177
Figure 36. Vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de xylose et de production de dioxyde de carbone au cours de la culture « A » de C.shehatae en mode discontinu alimenté. Les flèches correspondent aux ajouts de xylose. ....	180
Figure 37. Vitesses spécifiques de productions des métabolites principaux (éthanol, xylitol, succinate) et du quotient respiratoire (noir) au cours de la culture « A » de C.shehatae en mode discontinu alimenté.....	181
Figure 38. Vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de xylose et de production de dioxyde de carbone au cours de la culture « B » de C.shehatae en mode discontinu alimenté. Les flèches correspondent à la zone de limitation en xylose. ....	183
Figure 39. Vitesses spécifiques de production des métabolites principaux (éthanol, xylitol, succinate, acétate) et du quotient respiratoire (noir) au cours de la culture « B » de C.shehatae en mode discontinu alimenté. Les flèches correspondent à la zone de limitation en xylose. ....	184
Figure 40. Vitesses spécifiques de consommation de xylose, d'oxygène et de production de CO <sub>2</sub> (A), quotient respiratoire et vitesses de production d'éthanol, xylitol et succinate (B) en fonction du temps au cours de la culture en continue - les flèches correspondent aux trois régimes permanents. ....	187
Figure 41. Vitesses spécifiques de production d'éthanol (—), taux de croissance (---) en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu au cours de la culture « B » de C.shehatae en mode discontinu alimenté. ....	189
Figure 42. Pourcentage de cellules vivantes (●), stressées (■) et mortes (●) déterminés par la méthode de cytométrie développée dans ce travail (Monthéard et al., 2012) dans le milieu de culture en fonction de la concentration en éthanol.....	190
Figure 43. Représentation schématique des différents points pour lesquels une carte de flux sera présentée, chaque numéro correspondant à un calcul de flux. ....	192
Figure 44. Carte des flux intracellulaires pour quatre points de fonctionnement (2/3/4/10) : simulation en condition théorique limite de croissance (à coeffnadph = 0.67), conditions de $\mu_{max}$ pour les culture « A » et « B » et troisième régime permanent pour la culture « C ». Les flux sont normés par la biomasse (1000 g <sub>biomasse</sub> ·h <sup>-1</sup> ). Les valeurs sont obtenues avec le modèle possédant la navette éthanol. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la	

réaction. Les flux sont exprimés en mol.h<sup>-1</sup> excepté le flux de biomasse (g.h<sup>-1</sup>). Plus de 94 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes le reste étant contenu au niveau des réactions minoritaires non indiquées sur les cartes. .... 194

Figure 45. Carte des flux intracellulaires pour quatre points de fonctionnement (5/6/7/8) : simulation en condition théorique limite de production d'éthanol (à coeffnadph = 0.67), conditions de qETHANOL<sub>max</sub> pour les culture « A » et « B » et premier régime permanent pour la culture « C ». les valeurs de flux identifiées sont normées par rapport au flux de xylose entrant (100 mol<sub>xylose</sub>.h<sup>-1</sup>). Les valeurs sont obtenues avec le modèle possédant la navette éthanol. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la réaction. Les flux sont exprimés en mol.h<sup>-1</sup> excepté le flux de biomasse (g.h<sup>-1</sup>). Plus de 94 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes le reste étant contenu au niveau des réactions minoritaires non indiquées sur les cartes..... 198

Figure 46. Carte des flux intracellulaires pour quatre points de fonctionnement (13/14/11/12) : points avant la bascule respiro-fermentaire pour la culture « A », points avant la bascule respiro-fermentaire pour la culture « B ». Les valeurs de flux identifiées sont normées par rapport au flux de xylose entrant (100 mol<sub>xylose</sub>.h<sup>-1</sup>). Les valeurs sont obtenues avec le modèle possédant la navette éthanol. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la réaction. Les flux sont exprimés en mol.h<sup>-1</sup> excepté le flux de biomasse (g.h<sup>-1</sup>). Plus de 94 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes le reste étant contenu au niveau des réactions minoritaires non indiquées sur les cartes. .... 202

Figure 47. Pourcentage de carbone consommé converti en éthanol (●) et flux via la pyruvate décarboxylase (r12) normé par l'entrée de xylose (R1) (■) en fonction de la valeur du QR expérimental. .... 203

Figure 48. Répartition du pyruvate dans les différentes voies métaboliques en fonction du régime permanent : de haut en bas RP1, RP2, RP3. PC : pyruvate carboxylase, PDH : pyruvate déshydrogénase, PDC : pyruvate décarboxylase. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du flux total de pyruvate consommé. .... 205

Figure 49. Carte des flux intracellulaires pour trois points de fonctionnement (10/9/8): valeurs obtenues pour les trois régimes permanents de la culture continue ». Les valeurs de flux identifiées sont normées par rapport au flux de xylose entrant (100 mol<sub>xylose</sub>.h<sup>-1</sup>). Les valeurs sont obtenues avec le modèle possédant la navette éthanol. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la réaction. Les flux sont exprimés en mol.h<sup>-1</sup> excepté le flux de biomasse (g.h<sup>-1</sup>). Plus de 94 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes le reste étant contenu au niveau des réactions minoritaires non indiquées sur les cartes..... 208

Figure 50. Correlation entre les rendements oxygène et éthanol sur xylose. Valeurs des rendements obtenus à qETHANOL max pour la culture « A » (▲), à qETHANOL max pour la culture « B » (■), valeurs moyennes lors des régimes permanents pour la culture « C » (●). Régression linéaire à partir des points expérimentaux (R<sup>2</sup>=0.9808) en traits discontinus et relation théorique en condition théorique limite de production d'éthanol issue de la modélisation en trait plein. .... 210

Figure 51. Carte des flux intracellulaires pour deux points de fonctionnement (16/15) : valeurs obtenues lors de la culture « A » à qXYLITOL<sub>max</sub> et qSUCCINATE<sub>max</sub>. Les flux sont normés par le xylose (100 mol<sub>xylose</sub>.h<sup>-1</sup>). Les valeurs sont obtenues avec le modèle possédant la navette éthanol. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la réaction. Les flux sont exprimés en mol.h<sup>-1</sup> excepté le flux de biomasse (g.h<sup>-1</sup>). Plus de 94 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes le reste étant contenu au niveau des réactions minoritaires non indiquées sur les cartes. .... 213

## Liste des tableaux

---

Tableau 1. Composition de différentes biomasses lignocellulosiques. Source : Lee, 1997 .....	27
Tableau 2. Synthèse des différentes conditions de calculs, rendements et bilans énergétiques proposés dans la littérature pour le métabolisme oxydatif et réductif du xylose. ....	34
Tableau 3. Meilleures performances recensées dans la littérature pour les taux de croissance, les rendements en éthanol et biomasse, ou les titres en éthanol. ....	37
Tableau 4. Principaux mécanismes de régulation des substrats (carbone et oxygène) lors de la fermentation alcoolique. Source : sur la base des travaux de Weusthuis et al., (1994).....	48
Tableau 5. Activités enzymatiques de la xylose réductase reportées dans la littérature. ....	53
Tableau 6. Comparaison des rendements de fermentation en fonction du $K_L a$ , de l'aération, de la pression partielle en oxygène dans le milieu pour différentes cultures de <i>C. shehatae</i> sur xylose. <sup>a</sup> vitesses spécifique de production d'éthanol ( $g_{\text{éthanol}} \cdot g_X^{-1} \cdot h^{-1}$ ). ....	62
Tableau 7. Comparaison de trois modèles MFA pour le métabolisme du xylose .....	73
Tableau 8. Solutions composants le milieu de culture de <i>C. shehatae</i> . ....	82
Tableau 9 Composition élémentaire de la biomasse .....	89
Tableau 10. Condition opératoires d'analyse par HPLC .....	89
Tableau 11. Temps de rétention et détection des métabolites dosés par HPLC.....	90
Tableau 12 Formules brutes, formules élémentaires, masses molaires et degrés de réduction des composés intervenants dans les calculs de bilan. ....	104
Tableau 13. Profil des vitesses d'apport en xylose imposées lors de la culture B .....	172
Tableau 14. Caractéristiques macroscopiques et cinétiques des points de fonctionnement à $\mu_{\text{max}}$ lors des cultures « A » et « B », du troisième régime permanent de la culture « C » et de la simulation à $\text{coeffnadh} = 0.67$ en condition théorique limite de production de biomasse.....	193
Tableau 15. Valeur du flux d'ATP dissipé via la maintenance en $\text{mol}_{\text{ATP}}/\text{mol}_{\text{xylose}}$ .....	195
Tableau 16. Caractéristiques macroscopiques et cinétiques des points de fonctionnement à $q_{\text{ETHANOL}_{\text{max}}}$ lors des cultures « A » et « B », des trois régimes permanents de la culture « C » et de la simulation en condition théorique limite de production d'éthanol à $\text{coeffnadh} = 0.67$ et à $Y_{\text{O}_2/\text{xylose}}$ de $0.33 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ . ....	197
Tableau 17. Valeur du flux d'ATP dissipé en $\text{mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{h}^{-1} / \text{mol}_{\text{xylose}} \cdot \text{h}^{-1}$ .....	199
Tableau 18. Caractéristiques macroscopiques et cinétiques des points de fonctionnement au moment de la bascule respiro-fermentaire au cours des cultures « A » et « B ».....	200
Tableau 19. Répartition du pyruvate dans les différentes voies métaboliques en fonction des différentes simulations et cultures. PC : pyruvate carboxylase, PDH : pyruvate déshydrogénase, PDC : pyruvate décarboxylase. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du flux total de pyruvate consommé.....	206
Tableau 20. Répartition de l'acétaldéhyde dans les différentes voies métaboliques en fonction des différentes simulations et cultures. ADH : alcool déshydrogénase, Ald.DH : acétaldéhyde déshydrogénase.....	207



## Introduction générale

---

En 2009, les biocarburants ont été incorporés dans le secteur du transport à hauteur de 5.1 %. Cependant, le bioéthanol de première génération, produit à partir des organes de réserve des plantes, est désormais remis en cause en raison de son impact sur les marchés agricoles et de ses faibles performances écologiques. Dans ce contexte, l'éthanol de seconde génération, qui valorise la biomasse ligno-cellulosique non alimentaire, est étudié de l'échelle du laboratoire à l'échelle du pilote (Gnansounou, 2010). Ces travaux de recherche sont ainsi inscrits dans le projet Futurol, premier projet français qui vise à mettre au point et valider un procédé de production d'éthanol dit de seconde génération à partir de la lignocellulose, issue de coproduits agricoles, forestiers, de résidus ou de biomasse dédiée. Ce projet associe 11 partenaires avec le soutien financier d'OSEO, dont le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés.

Le bioéthanol de seconde génération est produit selon le procédé suivant : une première étape de prétraitement de la biomasse permet de rendre la cellulose et l'hémicellulose accessibles aux enzymes ; le traitement par des enzymes permet d'extraire les sucres de la matrice végétale ; vient ensuite l'étape de conversion des sucres en alcool par voie biologique ; enfin l'éthanol est extrait par distillation. Les points clés de diminution du coût du procédé de fabrication de l'éthanol ligno-cellulosique sont l'amélioration des techniques de prétraitement pour réduire les coûts énergétiques et l'usage de produits chimiques, la réduction du coût enzymatique et l'augmentation du rendement et de la concentration en éthanol pendant la fermentation.

Pour augmenter le rendement en éthanol, la totalité du carbone substrat, libéré sous forme de glucose et pentoses majoritairement, doit être converti. La conversion du glucose a fait l'objet de très nombreux travaux au niveau international et *Saccharomyces cerevisiae* est la levure choisie à la fois du point de vue académique et industriel pour ses très hautes performances. Toutefois, la fermentation par la levure sauvage *Saccharomyces cerevisiae* ne permet pas la conversion des pentoses en éthanol. Or, lorsque la fraction hémicellulosique de la biomasse

lignocellulosique est digérée par les enzymes, des pentoses sont libérés dont la valorisation en éthanol permettrait indéniablement d'améliorer la rentabilité économique du procédé. Ces sucres à 5 atomes de carbone présentent une part importante du carbone total contenu dans la biomasse lignocellulosique, jusqu'à 30% (m/m). Deux voies de conversion microbienne des pentoses en éthanol sont étudiées : l'utilisation de levures génétiquement modifiées qui convertissent à la fois les pentoses et les hexoses avec des performances maximales ou bien l'utilisation de levures sauvages fermentant naturellement les pentoses.

En France, l'utilisation des MGM (micro-organismes génétiquement modifiés) est soumise à une réglementation stricte imposant le confinement de la production et une gestion spécifique des déchets. Dans ce contexte réglementaire, une levure non-modifiée est une voie intéressante pour le développement industriel du procédé de production de bioéthanol. L'étude développée dans ce document se focalise sur une souche de *Candida* fermentant naturellement les pentoses. La souche *Candida shehatae* a été choisie pour (1) ses performances potentielles concernant le rendement de conversion du xylose en éthanol, le titre en éthanol et la productivité volumique, (2) le savoir-faire de l'équipe d'accueil concernant cette souche, qui avait fait l'objet de travaux préalables.

Des travaux antérieurs réalisés dans l'équipe FAME (Fermentation Advances in Microbial Engineering) du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (L.I.S.B.P) ont permis d'identifier que le niveau de limitation en oxygène permet de faire varier les flux de carbone dans le métabolisme. Ces travaux ont pour objectif de répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les effets des flux de substrats xylose/oxygène sur l'orientation du métabolisme et la distribution des flux de carbone ?
- Comment les cofacteurs de la xylose réductase influencent-ils l'organisation du métabolisme cellulaire ?
- Est-il possible d'améliorer le rendement de conversion du xylose en éthanol par la gestion des flux de substrats ?

La stratégie développée dans ce manuscrit est de coupler une approche de génie microbiologique avec des outils de modélisation métabolique afin d'identifier les mécanismes sous-jacents à la production d'éthanol. La compréhension de la physiologie de la levure permet d'identifier les conditions expérimentales favorables à une production optimisée d'éthanol. Ce manuscrit s'articule en 4 chapitres.

Le premier chapitre correspond à l'étude bibliographique du sujet, présentant l'état général des connaissances sur la physiologie de *C. shehatae* et des souches consommatrices de xylose, les conséquences métaboliques de l'utilisation de ce substrat et les différentes approches de modélisation existantes.

Le second chapitre décrit la souche, les milieux et les modes de cultures utilisés, les outils d'analyse expérimentale et le traitement des données. Il présente également les outils de réconciliation et leur base théorique.

Le troisième chapitre expose l'approche de modélisation, de la construction du modèle à sa validation puis à son exploitation lors de simulations.

Le dernier chapitre traite de la partie expérimentale avec la mise en œuvre de cultures en bioréacteurs. L'ensemble des cinétiques propres à chaque condition est détaillée et les données sont analysées au regard des informations apportées par le modèle métabolique. Les flux intracellulaires sont calculés afin de répondre aux questions scientifiques posées par l'étude du métabolisme du xylose.

Enfin une conclusion générale soulignera les principaux résultats et répondra aux questions scientifiques de la thèse et dégagera des perspectives pour la valorisation de ces travaux.



---

# Chapitre 1. Analyse bibliographique

---





## Chapitre 1. Bibliographie

---

Ces travaux de doctorat portent sur l'étude du métabolisme de *Candida shehatae* sur xylose. L'étude bibliographique concerne plus largement d'autres substrats et d'autres souches métaboliquement proches. Cette étude bibliographique s'articule en quatre parties. La première partie traite des substrats carbonés présents dans la biomasse lignocellulosique ainsi que du métabolisme oxydatif et réductif du xylose, en présentant notamment les bilans carbonés calculés dans la littérature. La seconde partie s'intéresse à la physiologie générale de la souche d'intérêt *C.shehatae* dont les performances obtenues en croissance et production d'éthanol mais également lors des productions de co-métabolites. Cette partie décrit aussi les conditions de cultures optimales de *C.shehatae* et sa tolérance vis-à-vis de l'éthanol. La troisième partie focalise l'étude sur les points clés du métabolisme à savoir l'équilibre oxydo-réductif et le rôle de l'oxygène dans le métabolisme du xylose. La dernière partie propose une analyse des outils de modélisation disponibles pour décrire la fermentation alcoolique des pentoses en focalisant sur le type de modèle susceptible de répondre aux questions posées dans ces travaux.

### 1.1. Les pentoses et le métabolisme microbien du xylose : généralités

Les pentoses sont issus de la dégradation des hémicelluloses lors du traitement de la biomasse lignocellulosique. La composition en pentoses est fonction de la nature de la matière première et du traitement appliqué à celle-ci (Mosier *et al.*, 2005). Le xylose étant le pentose majoritaire issu du traitement de la biomasse lignocellulosique (Tableau 1), sa conversion représente un des enjeux principaux de la consolidation du procédé de fermentation alcoolique des pentoses (Lee, 1997).

**Tableau 1. Composition de différentes biomasses lignocellulosiques. Source : Lee, 1997**

	Corn stover	Wheat straw	Rice straw	Rice hulls	Bagasse fiber	Cotton gin trash	Newsprint	Populus tristis	Douglas fir
Carbohydrate (% of sugar equivalent)									
Glucose	39.0	36.6	41.0	36.1	38.1	20.0	64.4	40.0	50.0
Mannose	0.3	0.8	1.8	3.0	NA	2.1	16.6	8.0	12.0
Galactose	0.8	2.4	0.4	0.1	1.1	0.1	NA	NA	1.3
Xylose	14.8	19.2	14.8	14.0	23.3	4.6	4.6	13.0	3.4
Arabinose	3.2	2.4	4.5	2.6	2.5	2.3	0.5	2.0	1.1
Non-carbohydrate (%)									
Lignin	15.1	14.5	9.9	19.4	18.4	17.6	21.0	20.0	28.3
Ash	4.3	9.6	12.4	20.1	2.8	14.8	0.4	1.0	0.2
Protein	4.0	3.0	NA	NA	3.0	3.0	NA	NA	NA

NA, not available.

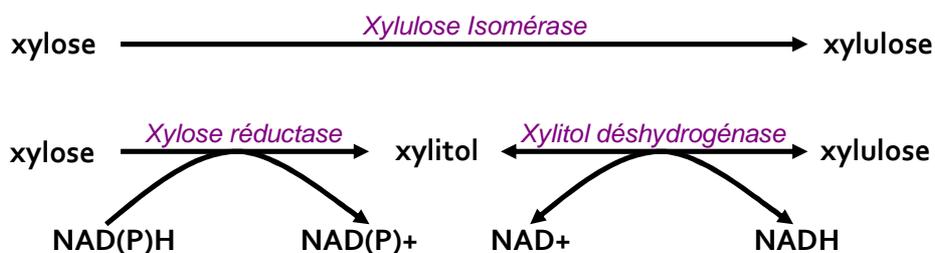
L'arabinose est le troisième ose, en termes de concentration, présent dans les hydrolysats de biomasse lignocellulosique (Tableau 1). Cependant, la fermentation de l'arabinose par des souches sauvages telles que *Candida arabinofermentans*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* ou *Pichia guilliermondii* entraîne une forte production d'arabitol sans production d'éthanol. Ce pentose peut être utilisé uniquement pour la croissance (Delgenes *et al.*, 1988; DuPreez *et al.*, 1986b; Fonseca *et al.*, 2007).

Les micro-organismes sont connus pour métaboliser une grande variété de carbohydrates via des réseaux métaboliques spécifiques à chaque substrat. Néanmoins, tous les micro-organismes ne sont pas capables d'utiliser les pentoses et de les convertir en métabolite d'intérêt, ici l'éthanol. Des criblages de souches potentiellement capables de croître sur xylose et de le fermenter en éthanol ont été réalisés. Plusieurs genres ont été identifiés tels que : *Pachysolen tannophilus*, plusieurs espèces de *Candida* et de *Pichia*, ou *Kluyveromyces* pour les

espèces levuriennes ; *Fusarium oxysporum* ou *Neurospora crassum* pour les champignons filamenteux et des bactéries comme *Clostridium thermocellum* ou *Bacillus macerans* (Maleszka *et al.*, 1982; Suihko & Dražić, 1983; Toivola *et al.*, 1984).

Les micro-organismes identifiés peuvent donc oxyder et fermenter le xylose avec des performances différentes. Ils peuvent être séparés en deux groupes en fonction de la première étape d'assimilation du xylose. Le premier groupe, majoritairement des bactéries, transforme directement le xylose en xylulose via une xylose isomérase (XI). L'autre groupe, composé principalement des levures, transforme le xylose en xylulose via deux activités enzymatiques, la xylose réductase (XR) et la xylitol déshydrogénase (XDH) (Verduyn *et al.*, 1985). Le produit de la réaction de la XR est le xylitol, qui est converti en xylulose par la xylitol déshydrogénase, très fortement  $\text{NAD}^+$  dépendante tandis que la XR peut être  $\text{NADH}$  ou  $\text{NADPH}$  dépendante. Ces deux voies sont représentées sur la Figure 1.

Le L-arabinose est quant à lui réduit par une aldose réductase  $\text{NADPH}$ -dépendante formant du L-arabitol, qui est ensuite converti en L-xylulose par une arabitol déshydrogénase  $\text{NAD}^+$ -dépendante. Le L-xylulose est réduit en xylitol, l'intermédiaire commun de la dégradation des pentoses.



**Figure 1. Voies de dégradation du xylose**

La fermentation alcoolique étant traditionnellement réalisée par les levures, les espèces *Pachysolen*, *Candida* et *Pichia* ont été particulièrement étudiées et présentent souvent les meilleures performances de production d'alcool sur xylose (Toivola *et al.*, 1984). Ces levures consommatrices de pentoses sont isolées du sol, de matrice de bois ou d'insectes par exemple (Jeffries & Kurtzman, 1994).

Trois types de métabolismes sont possibles chez les levures : le métabolisme oxydatif ou respiratoire, le métabolisme fermentaire ou réductif et le métabolisme oxydo-réductif. La levure peut passer d'un métabolisme à l'autre en fonction du substrat et des conditions environnementales, on parle alors de « bascule métabolique ».

### Respiration

Le métabolisme respiratoire est actif en présence d'oxygène qui sert d'accepteur final d'électrons lors de la dernière réaction de la chaîne respiratoire. Le substrat xylose est conduit à travers la voie des pentoses-phosphates (PP, également appelée voie de Warburg-Dickens-Honecker), puis oxydé via la glycolyse (voie d'Embden Meyerhof Parnas) jusqu'au pyruvate. Le pyruvate est ensuite dirigé dans la mitochondrie et oxydé dans le Cycle de Krebs fournissant de nombreux intermédiaires anaboliques utilisés pour la synthèse de biomasse. L'ensemble du substrat sera décomposé en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  et production d'ATP et servira à la régénération des cofacteurs et la formation d'intermédiaires carbonés pour la croissance.

Le bilan énergétique de l'oxydation complète du xylose ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) est décrit par Rizzi *et al.*, (1989), en considérant une XR NADH dépendante:

- dégradation du xylose + PPP :  $3 \text{ XYLOSE} + 3 \text{ ATP} = 1 \text{ G3P} + 2 \text{ F6P} + 3 \text{ ADP}$
- glycolyse :  $1 \text{ G3P} + 2 \text{ F6P} + 5 \text{ NAD}^+ + 5 \text{ ADP} = 5 \text{ PYRUVATE} + 5 \text{ NADH} + 5 \text{ ATP} + 5 \text{ H}_2\text{O}$
- cycle de Krebs :  $5 \text{ PYRUVATE} + 10 \text{ H}_2\text{O} + 20 \text{ NAD}^+ + 5 \text{ FAD}^+ + 5 \text{ ADP} = 5 \text{ ATP} + 20 \text{ NADH} + 5 \text{ FADH}_2 + 15 \text{ CO}_2$
- Bilan :  $\text{XYLOSE} + 5/3 \text{ H}_2\text{O} = 25/3 \text{ NADH} + 5/3 \text{ FADH}_2 + 7/3 \text{ ATP} + 5 \text{ CO}_2$

Les cofacteurs produits sont oxydés dans la chaîne respiratoire d'après le bilan suivant :

- chaîne respiratoire :  $\text{NADH} + 1/2 \text{ O}_2 = (P/O)_{\text{NADH}} \text{ ATP} + \text{H}_2\text{O}$
- chaîne respiratoire :  $\text{FADH}_2 + 1/2 \text{ O}_2 = (P/O)_{\text{FADH}_2} \text{ ATP} + \text{H}_2\text{O}$

Sur la base de ce métabolisme respiratoire décrit dans la littérature et en posant l'hypothèse d'une XR uniquement NADPH dépendante et d'une production de NADPH assurée uniquement par la voie des PP, le calcul suivant peut être posé :

- dégradation du xylose :  $6 \text{ XYLOSE} + 6 \text{ ATP} + 6 \text{ NADPH} + 6 \text{ NAD}^+ = 4 \text{ G3P} + 3 \text{ F6P} + 6 \text{ ADP} + 6 \text{ NADP}^+ + 6 \text{ NADH}$
- voie des PP :  $3 \text{ F6P} + 6 \text{ NADP}^+ = 2 \text{ F6P} + 1 \text{ G3P} + 3 \text{ CO}_2 + 6 \text{ NADPH}$

- glycolyse :  $5 \text{ G3P} + 2 \text{ F6P} + 9 \text{ NAD}^+ + 16 \text{ ADP} = 9 \text{ PYRUVATE} + 9 \text{ NADH} + 16 \text{ ATP}$
- Cycle de Krebs :  $9 \text{ PYRUVATE} + 9 \text{ ADP} + 36 \text{ NAD}^+ + 9 \text{ FAD}^+ = 9 \text{ ATP} + 36 \text{ NADH} + 9 \text{ FADH}_2 + 27 \text{ CO}_2$
- Bilan : XYLOSE = 17/2 NADH + 3/2 FADH<sub>2</sub> + 19/6 ATP + 5 CO<sub>2</sub>

Les cofacteurs sont oxydés dans la chaîne respiratoire d'après les relations ci-dessus. L'efficacité énergétique du métabolisme oxydatif est donc caractérisée par la quantité d'ATP produit par atome d'oxygène consommé (le rapport  $P/O$  en moles d'ATP par mole d'atome d'oxygène).

Les travaux de Stouthamer & Verduyn (1992) et Verduyn *et al.*, (1991) fournissent des précisions concernant l'efficacité de la respiration sur substrats glucose et éthanol par *C.utilis* et *S.cerevisiae*. Les auteurs affirment que l'efficacité de la respiration (ratio  $P/O$ ) est en général indépendante du substrat et leurs calculs montrent que le ratio  $P/O$  de *C.utilis* est 30 à 50 % plus élevé que celui de *S.cerevisiae*. Les différentes hypothèses de calcul amènent à un ratio entre 1.4 et 2 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>O</sub><sup>-1</sup> pour *C.utilis* sur substrat glucose. Sur xylose, un ratio  $P/O$  de 1.35 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>O</sub><sup>-1</sup> est estimé sur la base de donnée expérimentales obtenues lors de cultures immobilisées de *Candida guilliermondii* (Santos *et al.*, 2003), proche de la valeur obtenu lors de cultures sur xylose de *Debaryomyces hansenii* (1.32 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>O</sub><sup>-1</sup>) (Rivas *et al.*, 2009).

D'après les relations ci-dessus et en considérant un même ratio  $P/O$  de 1.35 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>O</sub><sup>-1</sup> pour l'oxydation de NADH ou FADH<sub>2</sub> dans la chaîne respiratoire :

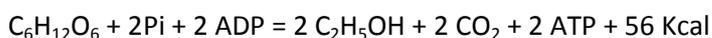
$$7/3 \text{ ATP (glycolyse)} + 25/3 * 1.35 \text{ (NADH)} + 5/3 * 1.35 \text{ (FADH}_2\text{)} = 95/6 = 15.8$$

$$19/6 \text{ ATP (glycolyse)} + 17/2 * 1.35 \text{ (NADH)} + 3/2 * 1.35 \text{ (FADH}_2\text{)} = 50/3 = 16.7$$

Entre 15.8 et 16.7 moles d'ATP par mole de xylose seraient produites lors de l'oxydation complète du xylose pour des XR respectivement NADH et NADPH dépendantes.

#### Production d'éthanol

Le métabolisme réductif ou fermentaire se déroule en anaérobiose pour *S.cerevisiae* sur glucose et le bilan énergétique en absence de croissance est :



Il est caractérisé par la réduction totale du substrat en éthanol et CO<sub>2</sub> et par un faible gain énergétique. Le bilan énergétique du métabolisme réductif sur substrat xylose repose sur plusieurs hypothèses, dont quatre sont présentées sur la Figure 2.

Rizzi *et al.*, (1989) écrivent un bilan correspondant à l'hypothèse d'une XR NADH dépendante permettant l'équilibre oxydo-réductif sur les deux premières étapes de dégradation du xylose en accord avec la Figure 2.d. (Kuyper *et al.*, 2004).

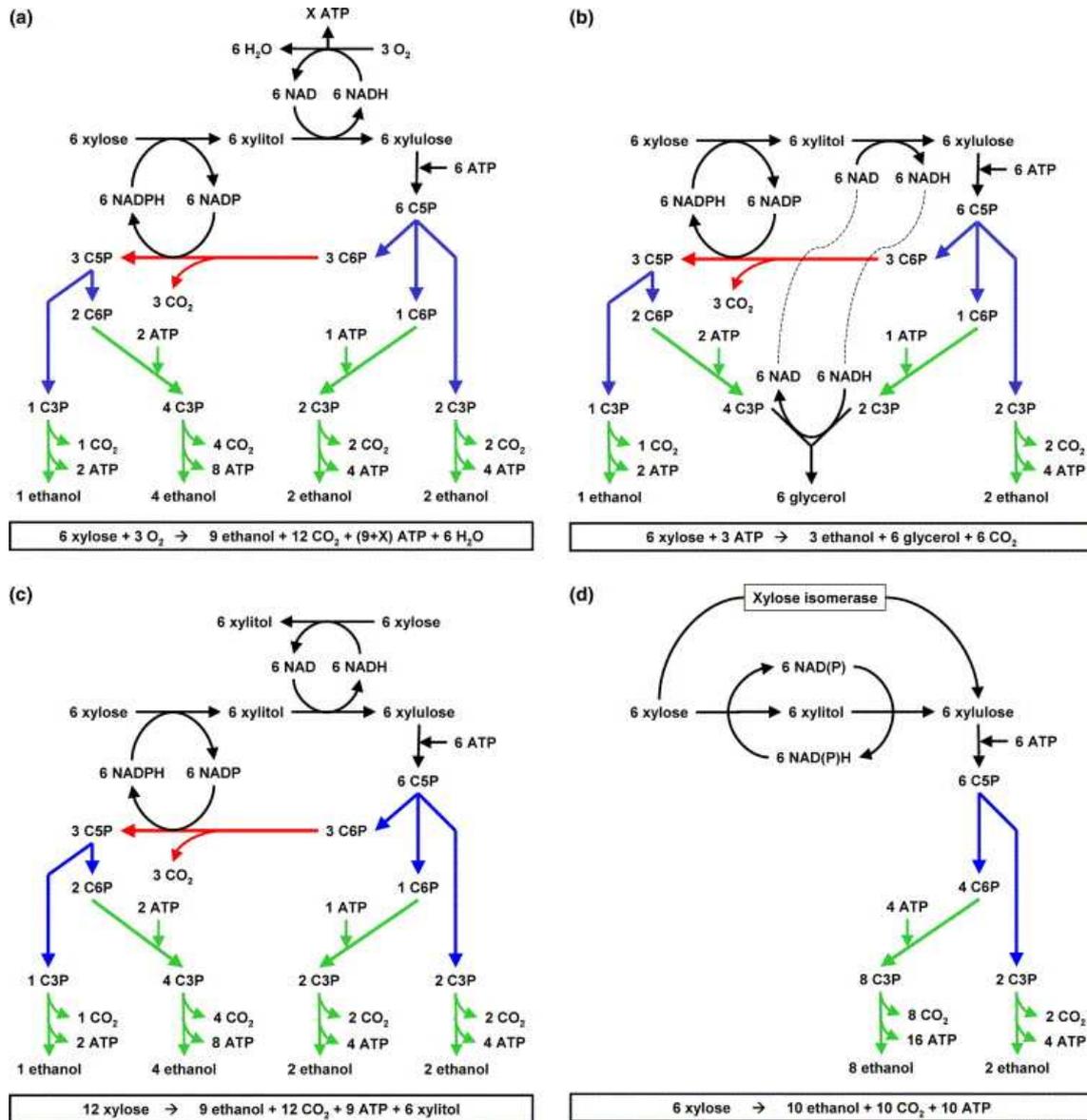
- dégradation du xylose + PP :  $3 \text{ XYLOSE} + 3 \text{ ATP} = 1 \text{ G3P} + 2 \text{ F6P} + 3 \text{ ADP}$
- glycolyse :  $1 \text{ G3P} + 2 \text{ F6P} + 5 \text{ NAD}^+ + 8 \text{ ADP} = 5 \text{ PYRUVATE} + 5 \text{ NADH} + 8 \text{ ATP} + 5 \text{ H}_2\text{O}$
- PDC + ADH :  $5 \text{ PYRUVATE} + 5 \text{ NADH} = 5 \text{ ETHANOL} + 5 \text{ CO}_2 + 5 \text{ NAD}^+$
- Bilan :  $\text{XYLOSE} = 5/3 \text{ CO}_2 + 5/3 \text{ ETHANOL} + 5/3 \text{ ATP} + 5/3 \text{ H}_2\text{O}$

Le bilan énergétique de la réduction complète du xylose ( $1.67 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ ) est donc inférieur à celui du glucose ( $2 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) mais le rendement en éthanol est équivalent ( $0.511 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Sur la base de ces équations et en posant l'hypothèse d'une XR uniquement NADPH dépendante et d'une production de NADPH assurée uniquement par la voie des PP (Figure 2.a), le calcul suivant peut être posé pour la réduction du xylose :

- dégradation du xylose :  $6 \text{ XYLOSE} + 6 \text{ ATP} + 6 \text{ NADPH} + 6 \text{ NAD}^+ = 2 \text{ G3P} + 4 \text{ F6P} + 6 \text{ ADP} + 6 \text{ NADH} + 6 \text{ NADP}^+$
- voie des PP :  $3 \text{ F6P} + 6 \text{ NADP}^+ = 2 \text{ F6P} + 1 \text{ G3P} + 3 \text{ CO}_2 + 6 \text{ NADPH}$
- glycolyse :  $3 \text{ G3P} + 3 \text{ F6P} + 9 \text{ NAD}^+ + 15 \text{ ADP} = 9 \text{ PYRUVATE} + 9 \text{ NADH} + 15 \text{ ATP} + 9 \text{ H}_2\text{O}$
- PDC + ADH :  $9 \text{ PYRUVATE} + 9 \text{ NADH} = 9 \text{ CO}_2 + 9 \text{ ETHANOL} + 9 \text{ NAD}^+$
- Bilan :  $\text{XYLOSE} + 1 \text{ NAD}^+ = 2 \text{ CO}_2 + 3/2 \text{ ETHANOL} + 3/2 \text{ ATP} + 1 \text{ NADH} + 3/2 \text{ H}_2\text{O}$

Le rendement en éthanol est alors de  $0.460 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Par contre, on observe une surproduction de NADH qui peut être oxydé par la chaîne respiratoire en présence d'oxygène si le métabolisme est oxydo-réductif. Le bilan énergétique est alors de  $(9 + X)$  moles d'ATP produites pour 6 moles de xylose consommées (Kuyper *et al.*, 2004) soit  $2.85 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  en considérant un ratio *P/O* de  $1.35 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_O^{-1}$ .



**Figure 2. Quatre hypothèses du métabolisme réductif du xylose prenant en compte l'équilibre oxydo-réductif. Les couleurs indiquent les voies principales : rouge : partie oxydative de la voie des PP ; bleu : partie non-oxydative de la voie des PP ; vert : glycolyse. Abréviations : C6P : hexose-6-phosphate, C5P : pentose-5-phosphate, C3P : triose-3-phosphate. Hypothèses : (a) XR NADPH-dépendante en présence d'oxygène comme accepteur final d'électrons ; (b) XR NADPH-dépendante en absence d'oxygène, la production de glycérol est nécessaire pour l'équilibre redox mais entraîne un bilan énergétique négatif, ce qui rend ce scénario impossible ; (c) XR NADPH et NADH dépendante (50/50) en absence d'oxygène, l'excès de NADH est compensé par une production de xylitol ; (d) XR NADH dépendante (équivalent à la XI) sans oxygène. Source : Kuyper et al., (2004).**

La surproduction de NADH peut également être compensée par excrétion de xylitol si le métabolisme est réductif (Figure 2.c). Le rendement en éthanol est alors de  $0.230 \text{ g.g}^{-1}$ . Le bilan énergétique n'est plus que de  $0.75 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ .

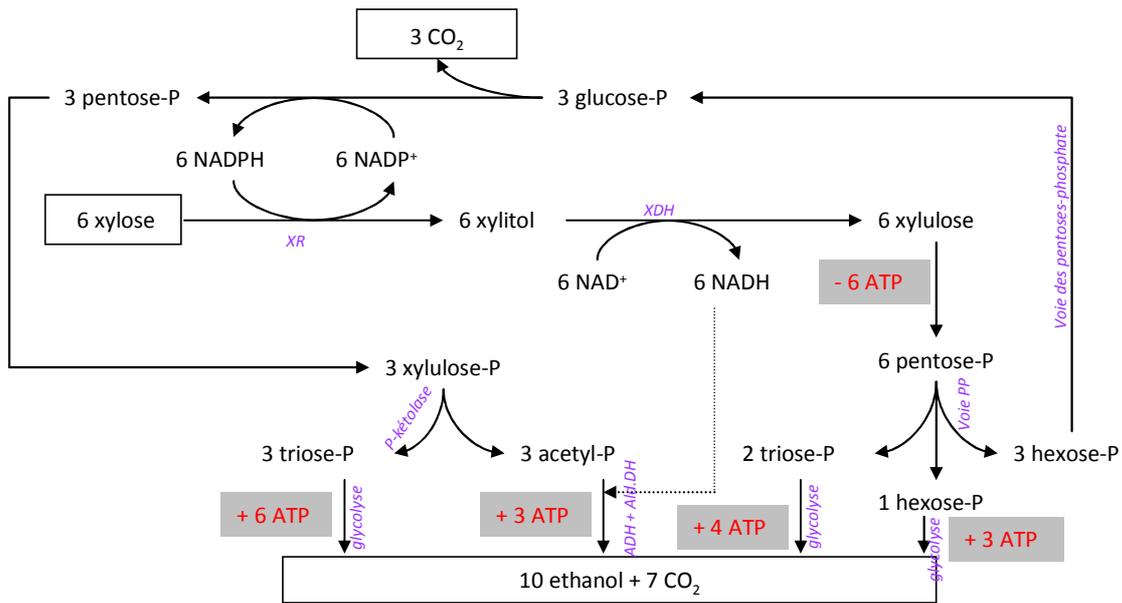
Certains auteurs formulent l'hypothèse de l'existence d'une xylulose-5-phosphate phosphokétolase dans les cultures de levures sur xylose (Evans & Ratledge, 1984; Ligthelm *et al.*, 1988b; Slininger *et al.*, 1985) selon la réaction suivante :



La XR est considérée comme strictement NADPH dépendante et la voie des PP prend en charge le recyclage du NADPH. Van Dijken & Scheffers, (1986) réalisent un bilan succinct des réactions métaboliques impliquées lorsque cette enzyme est présente (Figure 3). Une partie du carbone emprunte la glycolyse et une autre la phosphokétolase.

Dans ces conditions, le rendement en éthanol peut atteindre  $0.511 \text{ g.g}^{-1}$  et nous calculons un bilan énergétique de  $1.67 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ . Par ailleurs, l'activité de cette enzyme (xylulose-5-phosphate phosphokétolase) a été détectée chez plusieurs espèces du genre *Candida* lors de culture sur xylose (40 et 10  $\text{nmol.mg protéine}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  chez *C.utilis* CBS 321 et *C.utilis* NCYC 359 respectivement) (Evans & Ratledge, 1984) mais son importance dans l'orientation des flux métaboliques n'a pas été quantifiée.

Le bilan énergétique et la distribution du carbone lors du métabolisme réductif du xylose sont donc variables en fonction des hypothèses formulées par les auteurs sur le réseau métabolique. Les cofacteurs mis en jeu lors de la réduction du xylose par la XR ont un impact sur le bilan énergétique et les rendements. L'ensemble des données sont synthétisées dans le Tableau 2.

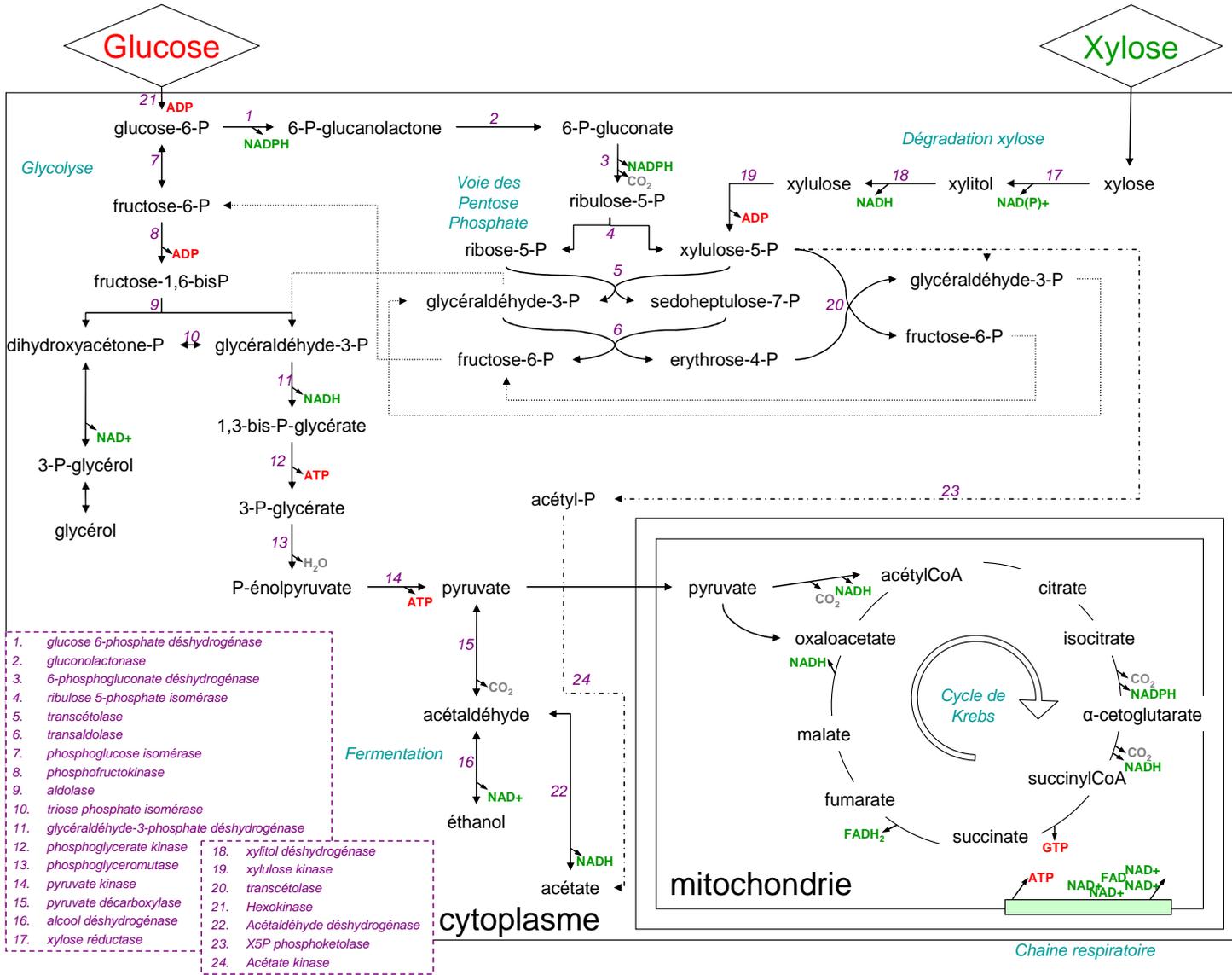


**Figure 3. Représentation schématique du métabolisme du xylose indiquant les conséquences d'une XR strictement NADPH dépendante et de la présence d'une phosphokétolase. La formation d'éthanol en condition anaérobie est possible uniquement dans le cas où l'acétyl-phosphate est converti en éthanol via des enzymes NADH/NAD<sup>+</sup> dépendantes. Source : Van Dijken & Scheffers, (1986). Le décompte de l'ATP est réalisé dans le cadre de l'analyse bibliographique, en accord avec la figure 4.**

**Tableau 2. Synthèse des différentes conditions de calculs, rendements et bilans énergétiques proposés dans la littérature pour le métabolisme oxydatif et réductif du xylose.**

Respiration	cofacteur XR	NADH	NADPH			
	autre hypothèse	P/O = 1.35	P/O = 1.35			
	bilan énergétique	15.8	16.7			
	$mol_{ATP}/mol_{xylose}$					
	$Y_{biomasse/xylose} g \cdot g^{-1}$	0.51	0.51			
Fermentation	cofacteur XR	NADH	NADPH	NADPH	NADPH	
	autre hypothèse	anaérobie	aérobie	anaérobie + glycérol	anaérobie + xylitol	anaérobie + phosphoketolase
	$Y_{éthanol/xylose} g \cdot g^{-1}$	0.51	0.46	0.15	0.23	0.51
	bilan énergétique	1.67	2.85	négatif	0.75	1.67
	$mol_{ATP}/mol_{xylose}$					

Figure 4. Schéma général des voies métaboliques principales. Les cofacteurs et molécules énergétiques indiquées sont celles produites au cours de la réaction lorsque celle-ci a lieu dans le sens indiqué par la flèche.



## **1.2. Physiologie et métabolisme de *Candida shehatae* sur xylose**

Les conditions optimales de culture de *C.shehatae* sont identifiées dans un premier temps et les performances de la souche en ce qui concerne la croissance et la production d'éthanol sont ensuite synthétisées. Le métabolisme fermentaire entraîne la synthèse de coproduits, cette production est détaillée par la suite. Enfin, les phénomènes limitant la production d'éthanol tels que la tolérance spécifique de la souche à l'éthanol et la viabilité sont décrits. L'analyse bibliographique est réalisée sur *C.shehatae* dès que les données sont disponibles, mais peuvent parfois être extrapolées d'autres levure xylose+ par manque d'informations propres à la souche étudiée.

### **1.2.1. Conditions environnementales de culture**

La levure *C.shehatae* requiert de la biotine ( $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), de la thiamine ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et de la pyridoxine pour une fermentation optimale du xylose ainsi que des sels ( $\text{K}^+$ ) et oligo-éléments (Mg, Zn) pour la croissance (DuPreez *et al.*, 1985; Xia *et al.*, 1995). Sur la base des travaux d'Egli & Fiechter (1981), Fromanger *et al.*, (2010) intègrent l'ensemble de ces nutriments dans un milieu minéral défini et optimisé permettant d'éviter les carences nutritionnelles jusqu'à  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse.

L'utilisation d'une source d'azote exogène est nécessaire à la croissance et à la production d'éthanol lors de la culture de *P.stipitis* (Slininger *et al.*, 2006). Bien que certains auteurs aient montré une augmentation du titre en éthanol lors d'ajout d'urée et d'acides aminés au cours de culture de *P.stipitis* en milieu complexe non limitant (Freese *et al.*, 2011), les sources d'azote classiquement utilisées sont les nitrates et l'ammonium. La réduction des nitrates en ammonium via la nitrite réductase est NADPH dépendante et la demande en cofacteurs nécessite alors une augmentation du flux de carbone dans la voie des PP (Bruinenberg *et al.*, 1983c; Palnitkar & Lachke, 1992).

Le pH optimal de croissance de *C.shehatae* est compris entre 4 et 5,5 avec une valeur optimale pour la fermentation à 4,5 (Du Preez, 1994; DuPreez *et al.*, 1986a; Sánchez *et al.*, 1997).

Concernant la température, de nombreux travaux mettent en évidence le lien entre la température et la tolérance à l'éthanol de la souche. La température optimale de croissance est de 30°C (Du Preez, 1994). Pour la production d'éthanol, une diminution de la température permet d'augmenter la tolérance de la souche à l'éthanol exogène (Du Preez *et al.*, 1987).

Il a été montré chez *Pachysolen tannophilus* que l'excès de substrat était inhibiteur de la croissance et de la fermentation (Slininger *et al.*, 1987). Pour cette souche, la vitesse spécifique de production d'éthanol est optimale quand la concentration en xylose se situe entre 28 et 35 g.L<sup>-1</sup>. Par ailleurs, lors de cultures continues, les auteurs montrent que le rendement en éthanol maximal diminue quand la concentration en xylose augmente et que le rendement maximal (0.35 g.g<sup>-1</sup>) est obtenu pour des concentrations en xylose faibles. La perte de rendement à des concentrations en xylose élevées serait alors due à une accumulation de xylitol induites par une limitation de la voie xylitol → xylulose due à un manque de NAD<sup>+</sup>. Le même phénomène pourrait être présent chez *C.shehatae*, puisque Laplace *et al.*,(1991a) ont montré que le rendement en éthanol est maximal pour une concentration initiale en xylose inférieure à 50 g.L<sup>-1</sup> ( $Y_{\text{etOH/xylose}} = 0.40 \text{ g.g}^{-1}$ ) et que le taux de croissance est maximal à une concentration de 20 g.L<sup>-1</sup> ( $\mu_{\text{max}} = 0.17 \text{ h}^{-1}$ ).

### 1.2.2. Performances sur substrat xylose

Le Tableau 3 détaille les rendements et titres en éthanol, xylitol et biomasse ainsi que les taux de croissance les plus élevés obtenus sur substrat xylose pur avec la souche *C.shehatae* uniquement. Les conditions d'obtention varient fortement en fonction des auteurs et ne sont pas systématiquement détaillées, en particulier les conditions d'aération.

**Tableau 3. Meilleures performances recensées dans la littérature pour les taux de croissance, les rendements en éthanol et biomasse, ou les titres en éthanol.**

souche <i>C.shehatae</i>	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{\max, \text{EtOH/S}}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$Y_{\max, \text{X/S}}$ (g.g <sup>-1</sup> )	[Ethanol] <sub>max</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	[biomasse] <sub>max</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	[xylitol] <sub>max</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Conditions de fermentation	Conditions de transfert d'oxygène	références bibliographiques
CSIR Y-492	0.20	0.34	0.34	16.61	17.00	-	erlen (500mL utile) mode batch 30°C pH4.5 milieu minéral + biotine/pyridoxine/thiamine	agitation magnétique 900 rev./min	Du Preez et al., (1985)
Y-12878	-	0.26	-	40.00	-	38.50	erlen (400mL utile) mode batch 25°C pH4.5 [xylose] <sub>initial</sub> = 200g.L <sup>-1</sup>	agitation mécanique 150 rpm	Slininger et al.,(1985)
Y-12856	-	0.45	-	22.50	-	1.00	erlen (400mL utile) mode batch 25°C pH4.5 [xylose] <sub>initial</sub> = 50g.L <sup>-1</sup>	agitation mécanique 150 rpm	Slininger et al.,(1985)
CSIR Y-492	0.14	0.37	0.10	7.40	2.00	-	erlen (250mL utile) mode batch 30°C pH5 milieu semi-empirique	agitation magnétique 700 rev./min	Du Preez J. C., Bosch M. and Prior B. A. (1986)
CSIR Y-981	0.25	0.38	0.30	35.00	28.4	6.4	bioréacteur 2L mode fed-batch 30°C pH4.5	contrôle du potentiel redox à 300 mV pour obtenir $\mu_{\max}$ , [x] <sub>max</sub> et Y <sub>X/S</sub> max et 310 mV pour obtenir Y <sub>etOH</sub> max	Du Preez J. C., van Driessel B. and Prior B. A. (1988)
CSIR Y-492	0.17	0.41	0.33	16.00	13.2	7.20	30°C pH5.2 milieu empirique en vials (30mL) pour obtenir le Y <sub>etOH/S</sub> max et en erlen (100mL utile) pour obtenir Y <sub>X/S</sub> max et $\mu_{\max}$	agitations à 150 rev./min et vials sous atmosphère N <sub>2</sub> pour obtenir le Y <sub>etOH</sub> max	Ligthelm M. E., Prior B. A. and Preez J. C. (1988)
ATCC22984	-	0.43	-	37.00	-	-	bioréacteurs à deux-étages mode continu 20°C dans le 2 <sup>e</sup> étage pH 4.5, D=0.025 h <sup>-1</sup>	conditions dites limitées en oxygène. Aucune mesure	Alexander, M. A., Chapman, T. W. & Jeffries, T. W. (1988)
R	0.12	0.36	0.31	34.10	15.64	0.00	bioreacteurs (1.5L utile) mode fed-batch 30°C pH4.5 milieu minéral	PO <sub>2</sub> = 0.7% de la valeur saturante	DuPreez J. C., Driessel B. and Prior B. A. (1989)
CSIR Y-981	0.05	0.29	0.44	45.60	21.84	10.56	bioreacteurs (1.5L utile) mode fed-batch 30°C pH4.5 milieu minéral	PO <sub>2</sub> = 0.2% de la valeur saturante	DuPreez J. C., Driessel B. and Prior B. A. (1989)
CSIR Y-981	0.08	0.38	0.08	45.40	3.97	13.12	bioreacteurs (1.5L utile) mode fed-batch 30°C pH4.5 milieu minéral	PO <sub>2</sub> = 0.7% de la valeur saturante	DuPreez J. C., Driessel B. and Prior B. A. (1989)
CSIR Y-492	0.38	0.38	0.49	18.70	23.30	10.80	bioréacteur (1.5L) mode batch ou erlen (500mL) 30°C pH4.5 milieu minéral [xylose]=50g.L <sup>-1</sup>	PO <sub>2</sub> > 30% pour obtenir $\mu_{\max}$ , Y <sub>X/S</sub> max et [X] max, agitation mécanique à 900 rpm en erlen sous atmosphère N <sub>2</sub> pour obtenir les autres performances	Du Preez J. C., Driessel B. and Prior B. A. (1989)
ATCC22984	0.24	0.39	0.09	19.50	4.50	1.00	bioréacteur (1.5L utile) mode batch 30°C pH5	transfert d'oxygène à 3.9 molO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Laplace et al., (1991)
ATCC22984	0.42	-	0.45	-	[8-12]	-	bioreacteurs (3L utile) mode batch 30°C pH4.5 milieu minéral	PO <sub>2</sub> > 20% de la valeur saturante	Fromanger et al., (2010)
ATCC22984	0.02	0.27	0.03	41.4	10.7	42.3	bioreacteurs (3L utile) mode batch 30°C pH4.5 milieu minéral	qO <sub>2</sub> = 0.8 ± 0.35 mmolO <sub>2</sub> .gX <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Fromanger et al., (2010)
ATCC22984	0.05	0.33	0.06	48.8	21.7	26.7	bioreacteurs (3L utile) mode batch 30°C pH4.5 milieu minéral	qO <sub>2</sub> = 1.19 ± 0.09 mmolO <sub>2</sub> .gX <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Fromanger et al., (2010)
ATCC22984	0.06	0.25	0.08	37.7	18.3	23.3	bioreacteurs (3L utile) mode batch 30°C pH4.5 milieu minéral	qO <sub>2</sub> = 2.48 ± 0.77 mmolO <sub>2</sub> .gX <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Fromanger et al., (2010)

Un taux de croissance maximal de  $0.42 \text{ h}^{-1}$  est obtenu par Fromanger *et al.*, (2010) au cours d'une culture discontinue en bioréacteur en condition aérobie sur xylose. DuPreez *et al.*, (1989b) obtiennent un taux de croissance inférieur de 10 % (un effet souche est possible) dans des conditions non limitantes en oxygène. Les rendements en biomasse maximums obtenus dans ces deux études sont proches ( $0.45$  et  $0.49 \text{ g.g}^{-1}$ ). Une expérience réalisée en contrôlant l'agitation et l'aération par le potentiel redox (DuPreez *et al.*, 1988), a permis d'atteindre des concentrations maximales en biomasse et en éthanol de  $28.4 \text{ g.L}^{-1}$  et  $35 \text{ g.L}^{-1}$  respectivement correspondant à des rendements de  $0.30 \text{ g}_{\text{biomasse}} \cdot \text{g}_{\text{xylose}}^{-1}$  et  $0.38 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{xylose}}^{-1}$ . Le meilleur rendement en éthanol recensé dans la littérature est de  $0.45 \text{ g.g}^{-1}$ , obtenu lors de culture de *C. shehatae* en fioles d'Erlenmeyer contenant une concentration initiale de  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de xylose dans des conditions « qualifiées d'aérobie » (Slininger *et al.*, 1985). En effet, les cultures ont lieu dans des fioles de 500 mL contenant 400 mL de milieu, l'agitation est fixée à 150 rpm sans mesure ou contrôle de l'oxygène dissous. De plus, les moyens mis en œuvre au cours de ces travaux (concernant notamment le dosage du xylose) ne permettent pas d'être précis sur la concentration initiale en xylose : par conséquent il est possible que les rendements annoncés en produits puissent être approximatifs. En gérant dans le découpage spatial de la croissance et de la production d'éthanol lors de cultures continues en bioréacteurs (double étage), Alexander *et al.*, (1988b) reportent un rendement de  $0.43 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{g}_{\text{xylose}}^{-1}$ . Le second étage, où la performance est réalisée, est maintenu en limitation d'oxygène d'après les auteurs, bien qu'aucune quantification ne soit apportée. Aussi, exceptées ces deux performances, la majeure partie des travaux reportés dans le tableau indique des rendements en éthanol compris entre  $0.2$  et  $0.4 \text{ g.g}^{-1}$ ; il convient de noter que peu d'études sont réalisées dans des conditions de quantification rigoureuses notamment au niveau de la consommation réelle en oxygène, ou des volumes suffisamment importants pour négliger des phénomènes d'évaporation.

Des concentrations élevées en xylitol ont pu être relevées, jusqu'à  $42.3 \text{ g.L}^{-1}$  au cours d'une culture en bioréacteur menée en limitation d'oxygène avec une vitesse spécifique moyenne de consommation d'oxygène de  $0.8 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Fromanger *et al.*, 2010). Par ailleurs, une forte concentration initiale en xylose ( $200 \text{ g.L}^{-1}$ ) a entraîné une production de xylitol de  $38 \text{ g.L}^{-1}$  au cours des travaux de Slininger *et al.*, (1985).

On peut observer un effet souche au cours des cultures réalisées par DuPreez *et al.*, (1989c) où deux souches de *C.shehatae* (R et CSIR Y-981) sont cultivées dans les mêmes conditions en bioréacteur instrumenté et présentent des performances très différentes notamment en termes de production de biomasse (rendement, concentration et taux de croissance).

### 1.2.3. Production de métabolites autres que l'éthanol

L'éthanol est un des métabolites d'intérêt pour la valorisation des pentoses par *C.shehatae*. D'autres produits du métabolisme peuvent également être valorisés tels que les acides organiques ou les polyols. Dans le cas d'un procédé de production d'éthanol, les concentrations de ces produits doivent être réduites par la gestion du procédé.

#### 1.2.3.1. Production de xylitol et glycérol

Le xylitol est le coproduit majoritaire de la fermentation alcoolique des pentoses. Les concentrations en xylitol dépassant parfois les concentrations en éthanol, plusieurs études ont montré l'intérêt économique de cette production, le xylitol étant un produit à plus forte valeur ajoutée que l'éthanol (Nigam & Singh, 1995). L'étude de souche proche de *C.shehatae* dans des travaux où le xylitol est le produit d'intérêt permet d'analyser les résultats obtenus avec *C.shehatae* (où l'éthanol est le produit d'intérêt).

Les travaux de Silva & Afschar,(1994) sur l'optimisation de la production de xylitol chez *C.tropicalis* montre que le rendement en xylitol est augmenté lorsque le pH diminue et en fonction de la consommation d'oxygène. Ils obtiennent 80% du rendement maximal en xylitol ( $1 \text{ mol}_{\text{xylitol}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ ) en imposant une vitesse de transfert d'oxygène de 0.29 vvm en culture continue. En culture discontinue avec une concentration initiale en xylose de  $300 \text{ g.L}^{-1}$ , une concentration finale de  $220 \text{ g.L}^{-1}$  de xylitol est obtenue. Les auteurs affirment que la vitesse de consommation d'oxygène est comprise entre 0.8 et  $1 \text{ mL O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  de milieu. L'inhibition par le xylitol est très forte à partir de  $200 \text{ g.L}^{-1}$  et la productivité est fortement diminuée.

Dans le cas où le xylitol n'est pas le métabolite d'intérêt, ces travaux montrent que le rendement en xylitol décroît avec la diminution de la concentration en xylose en accord avec les travaux de Slininger *et al.*, (1985) sur *C.shehatae* Y12878. Le rendement en xylitol est

minimisé lorsque la concentration en xylose est inférieure à  $50 \text{ g.L}^{-1}$ . Ces travaux peuvent suggérer que soit (1) de très fortes concentrations en substrats induisent une répression sur les voies en aval du xylitol induisant son accumulation et/ou (2) que cette même voie catalysée par la XDH  $\text{NAD}^+$  dépendante ne peut pas fonctionner si le  $\text{NAD}^+$  n'est pas produit par ailleurs, notamment en présence d'une quantité suffisante d'oxygène pour une production suffisante de  $\text{NAD}^+$  par la chaîne respiratoire.

Le glycérol est un coproduit majeur de la fermentation du glucose par *S.cerevisiae* mais pas de la fermentation du xylose (Ahmad *et al.*, 2012). Bien que les levures (*C.tropicalis* et *C.guilliermondii*) consommant le xylose possèdent l'enzyme permettant la production de glycérol (Granström & Leisola, 2002), il semble que cette voie de réduction du NADH ne soit pas favorisée, cela peut être dû au bilan énergétique négatif de cette voie en anaérobie (cf. Figure 2.b). Des rendements en glycérol de l'ordre de  $0.01$  à  $0.04 \text{ g.g}^{-1}$  ont été obtenus sur substrat xylose ou glucose lors de cultures de *C.shehatae* (Fromanger *et al.*, 2010).

### 1.2.3.2. Production d'acides organiques

L'acide acétique peut être produit par oxydation de l'éthanol en aérobie (Lieberthal *et al.*, 1980) entraînant une surproduction de NADH et d'acétaldéhyde. L'acétaldéhyde présente une forte toxicité et est aussitôt converti en acétate par l'acétaldéhyde déshydrogénase. En fonction du pH et lié à sa constante de dissociation, l'acide acétique peut être excrété ou accumulé (Jones, 1989). En cas d'accumulation intracellulaire sous forme dissociée, l'acétate entraîne une diminution du pH intracellulaire, et un découplage entre la production d'énergie et le système de transport, dépendant du gradient de protons, est observé (Skoog *et al.*, 1992). L'acide acétique est toxique pour la levure et les cinétiques d'inhibition ont été étudiées lors de la croissance de *C.blankii* sur xylose (DuPreez *et al.*, 1991) : le taux de croissance maximal chute de 50 % entre 2 et  $4 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide acétique.

Un autre acide carboxylique est parfois synthétisé chez certaines souches de *Candida* : l'acide succinique, un intermédiaire du Cycle de Krebs. Une production d'acide succinique est mesurée chez *C.stellata* lors de la vinification (Ciani & Ferraro, 1996) et en faible proportion chez plusieurs souches de *Candida* et *Pichia* (Nakayama *et al.*, 2008). En revanche, la souche

*C. utilis* peut consommer cet acide d'après les travaux de Cássio & Leão, (1993). La production d'acide succinique en aérobie correspondrait à un flux trop important dans le Cycle de Krebs tandis qu'en anaérobie, elle serait due à une répression de la succinate déshydrogénase (SDH) et de la succinylCoA synthétase associée à l'expression de la fumarate réductase permettant la production de succinate à partir de fumarate (Camarasa *et al.*, 2003; Camarasa *et al.*, 2007).

Fromanger *et al.*, (2010) ont reporté la production de certains acides organiques (l'acide pyruvique et succinique) lors de fermentation du xylose avec *C. shehatae* et obtiennent des rendements de 0.01 à 0.03  $\text{Cmol}_{\text{acides totaux}} \cdot \text{Cmol}_{\text{substrat}}^{-1}$ .

#### 1.2.4. Viabilité de *C. shehatae*

La viabilité cellulaire est une notion qui regroupe plusieurs phénomènes. De façon non exhaustive, l'intégrité membranaire, l'activité métabolique, la capacité de multiplication ou d'élongation sont autant de notions qui peuvent être énoncées pour la quantification et la caractérisation de la viabilité.

Pour *C. shehatae*, la viabilité a notamment été étudiée en lien avec la tolérance à l'éthanol exogène (Kastner *et al.*, 1992) et également vis-à-vis de la limitation en oxygène (Kastner *et al.*, 1999). Les méthodes utilisées par les auteurs sont le dénombrement sur milieu solide pour déterminer le nombre de cellules totales et le dénombrement par comptage microscopique des suspensions cellulaires marquées par le bleu de méthylène. Cette méthode repose sur l'hypothèse que certains colorants (acridine orange, bleu de méthylène, éosine, safranine etc.) marquent les cellules mortes, les cellules vivantes « excrétant » la solution de marquage (Tolnai, 1975).

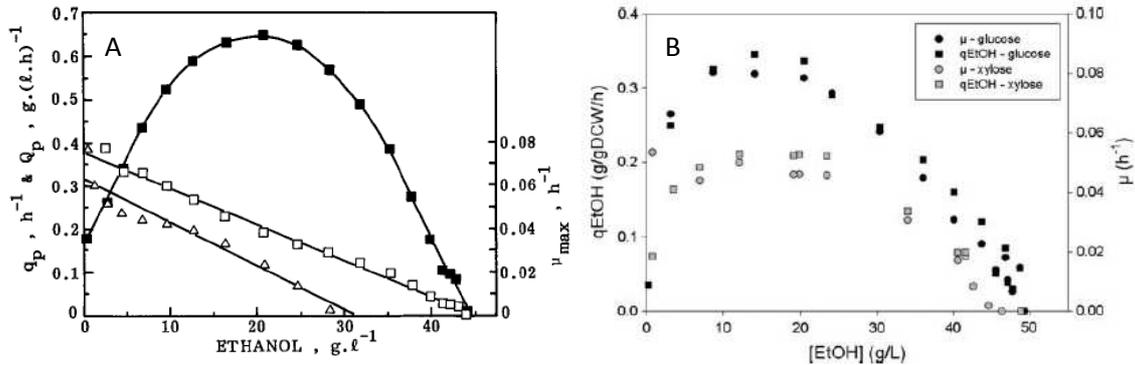
L'expérience menée par Kastner *et al.*, (1992) consiste en un ajout d'éthanol exogène (de 0 à 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) lors de cultures de *C. shehatae* en fioles d'Erlenmeyer. Les résultats mettent en évidence une chute de la viabilité en fonction de la concentration en éthanol : dans la culture témoin (sans ajout d'éthanol) une diminution de 20% de la viabilité intervient au bout de 600 heures tandis que la viabilité est nulle après 400 heures dans la culture contenant de 25  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  d'éthanol et après seulement 180 heures dans la culture contenant de 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

d'éthanol initial. L'étude met également en évidence une diminution de 50% du volume cellulaire moyen, mesuré par un compteur de particules, en présence de 50 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol exogène. La seconde étude de Kastner *et al.*, (1999) concerne des cultures de *C.shehatae* en fermenteur sur substrat xylose et glucose qui sont soumises à un changement de condition, aérobie vers anaérobie (l'air est remplacé par de l'azote). La transition dans la composition en oxygène de l'aération induit une diminution de la viabilité et du nombre de cellules totales d'un facteur 9 dans la culture sur substrat xylose mais pas dans celle sur substrat glucose. La chute de viabilité semble donc liée spécifiquement au métabolisme du xylose en culture anaérobie. Les auteurs suggèrent la production d'un constituant protecteur lors du métabolisme du glucose, absent lorsque le substrat est le xylose. Au vu de la bibliographie sur les levures xylose+ proche de *C.shehatae*, l'absence de synthèse de glycérol sur xylose pourrait expliquer ce phénomène.

#### **1.2.5. Tolérance à l'éthanol**

L'éthanol est le produit principal de la fermentation et un inhibiteur de celle-ci. L'augmentation de la concentration en éthanol est également connue pour diminuer la vitesse de croissance, faire chuter la viabilité cellulaire et altérer l'activité métabolique (Aldiguier *et al.*, 2004; Beaven *et al.*, 1982; Beney & Gervais, 2001).

Deux études ont permis de déterminer la tolérance à l'éthanol endogène en condition de croissance et de production. La Figure 5 montre les différents paramètres d'appréciation de la tolérance à l'éthanol, donnés pour deux souches de *C.shehatae* sur substrat xylose en fermentation sous deux limitations en oxygène différentes. La concentration critique en éthanol pour la croissance est définie comme la concentration en éthanol pour laquelle le taux de croissance devient nul et la concentration critique en éthanol pour la production d'éthanol correspond à la concentration en éthanol pour laquelle la vitesse de production d'éthanol est nulle.



**Figure 5. Profils des taux de croissance (A:  $\Delta$  - B:  $\bullet$ ), vitesse volumique de production d'éthanol (A:  $\blacksquare$ ) et vitesses spécifiques de production d'éthanol (A:  $\square$  et B:  $\blacksquare$ ) en fonction de la concentration en éthanol lors de production d'éthanol endogène. Les conditions de cultures sont : (A) Fermentation en mode discontinu alimenté ( $pO_2 = 0.7\%$  de pression partielle saturante) de *C.shehatae* CSIR-Y981 à 30°C – pH 4.5 sur substrat xylose - (B) Fermentation en mode discontinu alimenté en limitation d'oxygène ( $qO_2 = 1.19 \pm 0.09 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) de *C.shehatae* ATCC22984 à 30°C – pH 4.5 sur substrat xylose (symboles clairs) ou glucose (symboles noirs). Sources : (A) DuPreez *et al.*, (1989c) – (B) Fromanger *et al.*, (2010).**

La concentration critique en éthanol pour la croissance est de 31 g.L<sup>-1</sup> dans les conditions de travail de DuPreez *et al.*,(1989c) et de 45 g.L<sup>-1</sup> dans les conditions étudiées par Fromanger *et al.*,(2010) tandis que les concentrations critiques en éthanol pour la production d'éthanol sont respectivement de 45 g.L<sup>-1</sup> et 50 g.L<sup>-1</sup>. Le taux de croissance et la vitesse spécifique de production décroissent linéairement avec l'augmentation de la concentration en éthanol dans les travaux de DuPreez *et al.*,(1989c) tandis que la cinétique d'inhibition n'est linéaire qu'après 23 g.L<sup>-1</sup> d'après les travaux de Fromanger *et al.*,(2010).

D'autre part, la Figure 5.B. permet de comparer l'effet du substrat sur la tolérance à l'éthanol. La concentration critique en éthanol pour la croissance et la vitesse de production d'éthanol est de 50 g.L<sup>-1</sup> sur substrat glucose. La concentration critique en éthanol pour la croissance diminue de 11% sur substrat xylose tandis qu'il n'y a pas d'effet substrat sur la concentration critique en éthanol pour la production d'éthanol.

Un tableaux extrait des données de DuPreez *et al.*, (1989c) présente les différentes concentrations critiques en éthanol pour la croissance et la production d'éthanol pour plusieurs souches de *C.shehatae* (Figure 6). L'ensemble des cultures a été menée dans les

mêmes conditions de transfert d'oxygène avec une  $pO_2$  fixée à 0.7% de la valeur saturante. Les coefficients de variations entre les différentes concentrations critiques sur xylose sont de 5 % pour la croissance et de 12 % pour la production, l'écart peut être considéré non significatif pour la croissance et significatif pour la production d'éthanol, suggérant un effet souche dépendant. Les concentrations inhibitrices pour la croissance sont comprises entre 30 et 34  $g.L^{-1}$  et les concentrations inhibitrices pour la production varient entre 34 et 45  $g.L^{-1}$ .

**Table 1.** Fermentation parameters and inhibitory ethanol concentration for growth or ethanol production of the different yeast strains during fed-batch cultivation at a controlled DOT of 0.7% air saturation. Nomenclature:  $\mu_{max}$ , maximum specific growth rate;  $Q_p$  and  $q_p$ , maximum volumetric and specific rates of ethanol production, respectively;  $Y$ , ethanol yield coefficient

Yeast strain	Sugar	Fermentation parameter						Inhibitory ethanol concn, $g.L^{-1}$	
		$\mu_{max}$ $h^{-1}$	$Q_p$ $g \cdot (l \cdot h)^{-1}$	$q_p$ $g \cdot (g \cdot h)^{-1}$	$Y$ $g \cdot g^{-1}$	Biomass, <sup>a</sup> $g \cdot l^{-1}$	Xylitol $g \cdot l^{-1}$	Growth	Fermentation
<i>Candida shehatae</i>									
CSIR-Y492	xylose	0.14	0.99	0.34	0.34	8.94	23.70	32.3	44.0
CSIR-Y978	xylose	0.18	1.30	0.23	0.30	10.97	0	30.5	38.9
R	xylose	0.12	0.58	0.28	0.36	15.64	0	34.1	34.1
CSIR-Y981	xylose	0.08	0.65	0.35	0.38	3.97	13.12	31.2	45.4
CSIR-Y981 <sup>b</sup>	xylose	0.05	1.71	0.12	0.29	21.84	10.56	34.1	45.6
CSIR-Y981	glucose	0.14	1.10	0.38	0.39	6.01	0	34.9	44.8
<i>Pichia stipitis</i>									
CSIR-Y633 <sup>c</sup>	xylose	0.12	1.79	0.25	0.36	15.79	19.99	35.1 <sup>d</sup>	47.1
CSIR-Y633 <sup>c</sup>	glucose	0.12	1.44	0.25	0.34	17.82	0	34.9 <sup>d</sup>	43.8

<sup>a</sup> Dry cell mass, maximum value attained

<sup>b</sup> A high cell density experiment conducted at a DOT of 0.2%

<sup>c</sup> Aeration was stopped when ethanol assimilation became apparent

<sup>d</sup> Estimated by extrapolation of the specific growth rate vs ethanol concentration plot

**Figure 6.** Concentrations critiques en éthanol pour la croissance et la production d'éthanol pour différentes souches de *C.shehatae*. Source : DuPreez et al., (1989c).

L'impact de l'éthanol se situe à plusieurs niveaux : modification de la composition de la membrane plasmique, inhibition et dénaturation de plusieurs protéines et enzymes intracellulaires, perte d'eau et perturbations des mécanismes de transport parmi les effets les plus recensés (Aldiguiet et al., 2004; Beaven et al., 1982; Beney & Gervais, 2001; Gray & Sova, 1969; Hallsworth, 1998). Il n'existe à notre connaissance aucun travaux traitant de ces mécanismes chez la souche *C.shehatae*.

Concernant les effets sur la membrane plasmique, l'éthanol entraîne une augmentation de la proportion des résidus mono-insaturés des acides-gras et la diminution des résidus saturés sur les phospholipides chez *S.cerevisiae* (Beaven et al., 1982). L'augmentation de l'insaturation des

phospholipides est une réponse au stress provoqué par l'éthanol, mais ce mécanisme pourrait être un signal d'induction de la mort cellulaire (Beney & Gervais, 2001).

Au niveau des effets sur le métabolisme, de nombreuses enzymes ou protéines intracellulaires sont inhibées par l'éthanol, notamment l'alcool déshydrogénase, la pyruvate décarboxylase et l'hexokinase de la voie glycolytique (Gray & Sova, 1969). L'impact de l'éthanol sur la diminution de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) et du stress généré par cette déshydratation a été décrit par Hallsworth (1998). Les principaux résultats montrent que le stress hydrique interfère avec les liaisons hydrogènes, perturbant les structures enzymatiques et membranaires. La cellule exposée à l'éthanol répond en produisant des métabolites protecteurs tels que le glycérol et le tréhalose.

Concernant l'effet de l'éthanol sur le transport, les travaux de Kilian *et al.*, (1989) montrent que la diffusion passive des protons à travers la membrane cellulaire augmente avec la concentration en éthanol chez *Saccharomyces* et *Kluyveromyces*. Ces observations coïncident avec les travaux de Meyrial *et al.*, (1995), montrant la corrélation entre l'activité ATPase de la membrane plasmique et la concentration en éthanol chez *P.stipitis* en fonction de la source carbonée. Les auteurs annoncent une concentration critique en éthanol exogène de 30 g.L<sup>-1</sup> pour le taux de croissance sur substrat xylose. La plupart des auteurs ont réalisé des études sur la tolérance à l'éthanol par ajout exogène or Novak *et al.*, (1981) ont montré que l'éthanol endogène était plus inhibiteur que l'ajout d'éthanol exogène. Cette observation est remise en cause au cours des travaux de DuPreez *et al.*, (1989c) sur la tolérance à l'éthanol de *P.stipitis* et *C.shehatae*.

La tolérance à l'éthanol est aussi fortement liée à la température (Alexander *et al.*, 1989; DuPreez *et al.*, 1987; Jeffries & Jin, 2000). Lors de cultures en micro-tubes en présence d'éthanol exogène, la comparaison de la croissance des différentes cultures de *C.shehatae* CSIR-Y492 en fonction de l'éthanol exogène et de la température montre que la tolérance est maximale entre 13 et 17°C, permettant d'obtenir une concentration critique en éthanol pour la croissance de 58 g.L<sup>-1</sup> (DuPreez *et al.*, 1987).

Cette revue bibliographique a permis de mettre en évidence que la levure d'étude présentait des performances limitées lors de la fermentation du xylose par comparaison avec les performances de *S.cerevisiae* sur glucose. En effet avec la souche *S.cerevisiae*, des concentrations de  $147 \text{ g.L}^{-1}$  ont été atteintes grâce à un procédé à haute performance et les rendements dépassent  $0.46 \text{ g.g}^{-1}$  (Alfenore *et al.*, 2004). Plusieurs points ont été observés : une faible tolérance à l'éthanol, une production de xylitol importante en fonction des conditions opératoires et une diminution de la viabilité en lien avec le substrat, bien que la quantification de la viabilité ait été peu documentée. L'explication de ces phénomènes macroscopiques est en rapport avec les conditions environnementales d'une part, mais également avec les particularités liés au substrat xylose. L'analyse bibliographique des régulations et du métabolisme du xylose est nécessaire pour approfondir l'explication de ces phénomènes.

### 1.3. Les points clés du métabolisme de *Candida shehatae* sur xylose

Plusieurs points clés du métabolisme du xylose sont détaillés dans cette partie : tout d'abord les mécanismes généraux de régulation des sucres sont décrits puis le transport des sucres qui peut apparaître comme une étape limitante au cours de la fermentation. L'impact de la dualité des cofacteurs de la xylose réductase a été identifié lors de l'établissement des bilans matières (cf. 1.2) et les activités enzymatiques relevées dans la littérature sont reportées. Les voies productrices de cofacteurs et leur importance dans l'équilibre oxydo-réductif de la cellule sont ensuite détaillées ainsi que les voies autour du pyruvate, carrefour métabolique entre le métabolisme oxydatif et réductif. Enfin le rôle central de l'oxygène est abordé dans la dernière partie.

#### 1.3.1. Généralités sur la régulation des sucres

Le métabolisme oxydo-réductif correspond à la production d'éthanol en présence d'oxygène. Il peut correspondre à l'effet Crabtree positif chez les levures comme *S.cerevisiae* sur substrat glucose mais ce phénomène peut être le résultat d'autres mécanismes de régulation. Les différents mécanismes de régulations au niveau des substrats (carbone et oxygène) lors de la fermentation alcoolique sont succinctement décrits dans le Tableau 4.

**Tableau 4. Principaux mécanismes de régulation des substrats (carbone et oxygène) lors de la fermentation alcoolique. Source : sur la base des travaux de Weusthuis et al., (1994).**

Effet Crabtree "long-terme"	Fermentation alcoolique aérobie lorsque le taux de croissance dépasse un taux critique
Effet Crabtree "court-terme"	Fermentation alcoolique aérobie instantanée après ajout de substrat en excès lors d'une limitation du substrat
Effet Pasteur	Inhibition de la fermentation alcoolique en présence d'oxygène
Effet Kluyver	Incapacité à fermenter certains disaccharides alors que de la respiration de ce disaccharide est possible et que les enzymes permettant sa fermentation sont présentes
Effet Custer	Inhibition de la fermentation alcoolique en absence d'oxygène

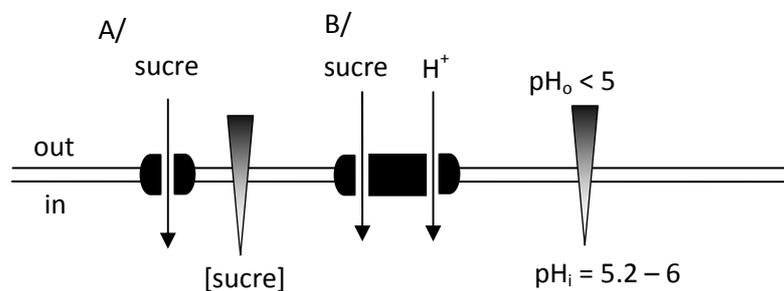
L'effet Crabtree correspond à la transition respiro-fermentaire en condition aérobie lorsque le flux de consommation en substrat dépasse un flux seuil (capacité respiratoire limite d'oxydation du substrat). Cette transition se traduit par une production d'éthanol en aérobiose et un métabolisme oxydo-réductif. Les levures pour lesquelles la transition respiro-fermentaire n'est pas observée lorsque la vitesse de consommation en substrat dépasse la vitesse seuil sont dites alors Crabtree négatives. Toutefois, la définition de l'effet Crabtree est basée sur le métabolisme du glucose et les mécanismes observés sur substrat xylose différent de ceux observés sur glucose : il a été montré que les fortes concentrations en xylose n'activent pas systématiquement la voie fermentaire (Passoth *et al.*, 1996). Au cours de cultures continues, la levure *C.shehatae* oxyde l'ensemble du xylose, quel que soit le taux de dilution, dès lors que l'oxygène est en excès (Jeffries & Alexander, 1990). Ce phénomène est lié au transport du substrat, les levures Crabtree négatives régulent l'entrée de substrat par un système de symport H<sup>+</sup> et contrôlent le flux glycolytique (Van Urk *et al.*, 1989a).

L'incapacité à fermenter le xylose en anaérobiose est associée à l'effet Kluuyver (Van Dijken & Scheffers, 1986). Ce mécanisme est défini comme l'incapacité à fermenter un disaccharide en anaérobiose alors que les voies métaboliques nécessaires sont présentes. Une culture continue de *C.utilis* sur maltose décrit les phénomènes observés. Un des mécanismes proposé pour expliquer l'effet Kluuyver se situe au niveau du transport du substrat : l'activité de transport est inhibée par l'absence d'oxygène. L'hypothèse formulée serait que la consommation du substrat pourrait être régulée en fonction de la concentration en oxygène ou au potentiel redox (Weusthuis *et al.*, 1994).

L'effet Custer est défini de deux façons : d'après Slininger *et al.*, (1987) l'effet Custer se traduit par l'amélioration de la fermentation alcoolique par l'ajout d'oxygène tandis que Scheffers (1966) le traduit par l'inhibition de la fermentation alcoolique en absence d'oxygène. Le mécanisme proposé est celui d'un déficit en NADH intracellulaire lié à un déséquilibre de la balance oxydo-réductive. Par conséquent, le métabolisme du xylose répond à la définition de l'effet Custer, démontré chez *Pachysolen tannophilus* (Slininger *et al.*, 1987).

### 1.3.2. Mécanisme de transport des sucres

Les sucres sont des molécules polaires qui ne diffusent pas librement à travers la membrane lipidique des cellules. Le mécanisme proposé par Lucas & van Uden (1986) chez *C.shehatae* se rapproche très fortement de celui de *S.cerevisiae*, et fait état de plusieurs protéines de transport. Ces mécanismes de transport varient en fonction du substrat et de sa concentration (Kilian *et al.*, 1993). Les deux types de systèmes de transports sont illustrés sur la Figure 7.



**Figure 7. Schéma des deux systèmes de transport des sucres chez *C.shehatae*. A/ Diffusion facilitée par une protéine de transport en fonction du gradient de sucre entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. B/ Ose-proton symport fonction du gradient de concentration et de la force proton motrice. Sur la base de l'ouvrage de Singh & Mishra, (1995).**

Dans des conditions de croissance aérobie où les substrats carbonés sont non limitants, le xylose, le glucose et le mannose seraient transportés par diffusion facilitée. La force motrice est le gradient de concentration en sucre, permettant la translocation du sucre d'un compartiment vers un autre. La cinétique du transport est du type Mickaëlis-Menten, et les trois sucres sont compétitifs ; les valeurs de  $K_s$  et  $V_{max}$  sont présentées dans la Figure 8. L'affinité du système de diffusion facilitée est plus forte pour le glucose, mais la vitesse de la réaction est significativement plus importante pour le xylose. En présence d'oxygène et en condition de croissance, le suivi de xylose marqué au  $^{13}C$  met en évidence que le transport est l'étape limitante du flux de carbone, lors de la fermentation par *P.stipitis* (Ligthelm *et al.*, 1988b).

Type of transport sugar	$V_{max}$ mmoles $g^{-1} h^{-1}$	$K_s$ mM	$K_i^a$ mM
<i>Facilitated diffusion system</i>			
Glucose	2—2.6	1.0—3.4	20.6
D-xylose	20—25	100—153	22.1
<i>Proton symports</i>			
Glucose	2.7—3.7	0.1—0.14	—
D-xylose	1.4	1.0	—

<sup>a</sup>  $K_i$ , constant of competitive inhibition of the transport of the other sugar

**Figure 8. Paramètres cinétiques du transport du glucose et du xylose pour *C.shehatae* IGC 3607 à pH 5 et à 25°C. Source : Lucas & van Uden (1986).**

En condition de limitation en substrat carboné, un nouveau type de transporteur est reporté chez *C.shehatae* (Lucas & van Uden, 1986). Ces transports de type symport sont couplés aux ions  $H^+$  et la force motrice est le gradient de pH entre le milieu extérieur et le cytosol. Le ratio du nombre de proton transporté par ose est 1. Après une phase de limitation en substrat, le transport ne semble plus être une phase limitante.

La condition glucose-limitant entraîne la mise en place de symports glucose-protons mais également la disparition du système de diffusion facilitée du glucose chez *C.shehatae*. Pour le xylose, la phase xylose-limitant entraîne également la mise en place de symports xylose-protons. En revanche, le mécanisme de diffusion facilitée reste en place et ces deux mécanismes de transport coexistent. La constante d'affinité (inverse de l'affinité) du symport xylose-proton est alors 100 fois plus faible que celle du système de diffusion facilitée et la vitesse initiale réduite d'un facteur 17 (Lucas & van Uden, 1986).

Les protons symports du glucose et du xylose sont distincts avec des cinétiques différentes chez *C.shehatae*, coïncidant avec l'étude de Lee *et al.*, (2002) sur *S.cerevisiae*. D'après les travaux de Gárdonyi (2003) sur *C.intermedia*, ces systèmes symports proton/xylose sont considérablement inhibés par le glucose présent même à faible concentration (entre 0.25 et 0.5 mM soit 45 à 90 mg.L<sup>-1</sup>).

### 1.3.3. Cofacteurs : les étapes clés dans l'équilibre oxydo-réductif

#### 1.3.3.1. La xylose réductase

Chez *Candida shehatae*, deux enzymes sont responsables de la réduction du xylose en xylulose : la xylose réductase et la xylitol déshydrogénase. La xylose réductase (EC 1.1.1.21) présente deux activités, l'une est NADPH dépendante et l'autre NADH dépendante : cette dualité est longuement décrite dans la littérature.

Bruinenberg *et al.* (1983a; 1984) dosent l'activité enzymatique chez *Candida utilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida tenuis*, *Candida shehatae*, *Pichia segobiensis* et *Pichia stipitis* sur xylose. Ces travaux mettent en évidence que la fermentation anaérobie du xylose n'est possible que chez les espèces présentant une activité XR uniquement NADH-dépendante. Ces résultats sont confirmés par les travaux de DuPreez *et al.* (1989) qui mesurent l'activité enzymatique de la xylose réductase de *P. stipitis*, *C. shehatae* et *C. tenuis* lors de cultures en condition d'aération différentes (aérobie, semi-aérobie et anaérobie). Les ratios d'activité NADH dépendante et NADPH dépendante sont de l'ordre de 0,52 à 0,65 en fonction des conditions et des micro-organismes.

Pour *C. shehatae*, les ratios d'activités sont présentés dans le Tableau 5. Les plus faibles sont obtenus par Alexander *et al.*, (1988a). Les activités obtenues par Yablochkova *et al.*, (2003; 2004) sont plus importantes que celles obtenues par les autres auteurs (facteur 10). Concernant l'activité NADPH dépendante de la XR, les résultats diffèrent selon les auteurs ; elle peut augmenter ou diminuer quand la quantité d'oxygène disponible diminue (Alexander *et al.*, 1988c; Du Preez *et al.*, 1989; Girio *et al.*, 1989). Pour Yablochkova *et al.*, (2004), l'activité NADPH dépendante est maximale en condition d'anoxie, et minimale en condition de micro-aérobie. La disparité des résultats suggère un biais dû à la méthode de dosage de l'activité enzymatique ou liée aux conditions de mise en œuvre par manque de contrôle et de maîtrise des différentes conditions d'aération spécifiques des cultures en fioles d'Erlenmeyer menées dans ces études. La comparaison de résultats obtenus en cultures sur xylose et glucose met en évidence une activité XR 18 fois plus faible sur glucose (Alexander *et al.*, 1988c).

**Tableau 5. Activités enzymatiques de la xylose réductase reportées dans la littérature.**

souche de <i>C.shehatae</i>	activité spécifique de la XR ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{protéine}^{-1}$ )		Condition	Référence
	NADH	NADPH		
CSIR Y 492	0.37	0.58	aérobie	DuPreez et al., 1989
	0.28	0.54	semi-aérobie	
	0.28	0.51	anoxie	
ATCC 22984	0.07	0.28	aérobie	Alexander et al., 1988
	0.08	0.31	semi-aérobie	
	0.1	0.33	anoxie	
CSIR Y 1632	4.93	3.4	semi-aérobie	Yablochkova et al., 2003
CSIR Y 1632	3.1	4.81	aérobie	Yablochkova et al., 2004
	4.93	3.4	semi-aérobie	
	2.31	5.02	anoxie	
CBS 5813	0.21	0.48	anoxie	Bruinenberg et al., 1984
ATCC 22984	0.3	0.48	aérobie	Fromanger et al., 2010
ATCC 22984	0.11	0.21	transfert d'O <sub>2</sub> décroissant	Girio et al., 1989
	0.15	0.29		
	0.13	0.26	en fioles	
	0.13	0.33		
	0.1	0.23	semi-aérobie	
	0.14	0.35	anaérobie	
	0.33	0.87	anoxie	

Les travaux de Verduyn *et al.*, (1985) sur la purification de la xylose réductase montrent que les activités NADH dépendante et NADPH dépendante sont présentes au sein d'une seule et même enzyme, contenant deux sous-unités probablement identiques. Le pH optimum de cette enzyme chez *Pichia stipitis* est de 6, et la gamme de température optimale comprise entre 20 et 38°C. Le ratio d'activité NADH dépendante/NADPH dépendante est fonction du pH. Ce ratio est stable entre 5 et 8 unités de pH, et décroît en dehors de cette zone. L'enzyme n'est pas inhibée par ses substrats (xylose, NADPH et NADH), ni par son produit, le xylitol, en revanche, elle est inhibée par le NAD<sup>+</sup> et le NADP<sup>+</sup>. L'affinité de l'enzyme est plus forte pour le NADPH.

### 1.3.3.2. Métabolisme du xylulose

Le xylulose est obtenu lors de la réduction du xylose en xylitol et la déshydrogénation du xylitol mais il peut également être assimilé directement par les levures (Maleszka & Schneider, 1982) lorsqu'il est présent dans le milieu de culture. Cet intermédiaire entre dans la voie des pentoses phosphates (également appelée voie de Warburg-Dickens-Horecker) qui produit des précurseurs de la synthèse des nucléotides, des acides aminés et oxyde des cofacteurs. Cette voie peut être divisée en deux segments dont l'un est oxydatif (Figure 9). Le segment oxydatif

fourni du NADPH, produit du CO<sub>2</sub> et les réactions sont irréversibles. Le deuxième segment est un ensemble de réactions d'interconversion entre des métabolites phosphatés produisant du ribose-5-phosphate, du glycéraldéhyde-3-phosphate et du fructose-6-phosphate. Le xylulose-5-phosphate est conduit dans le segment oxydatif en passant par la glycolyse.

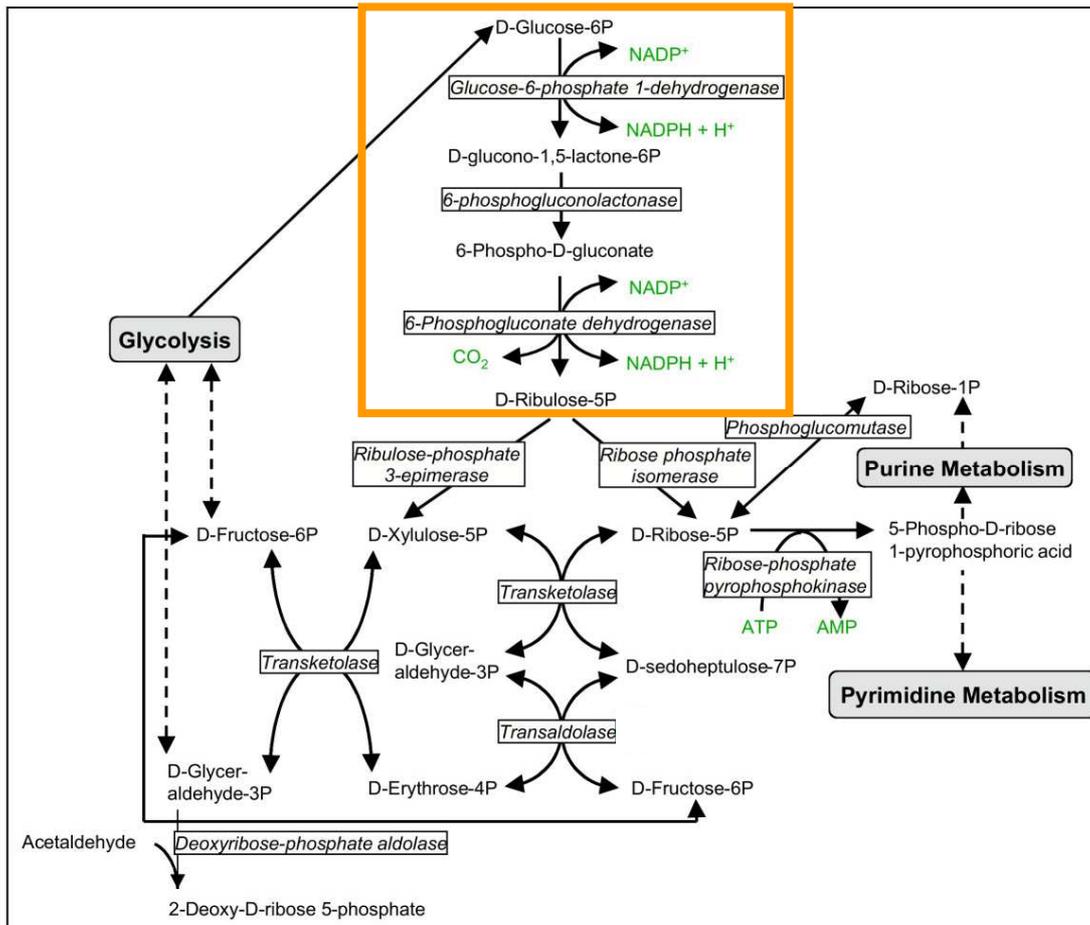


Figure 9. Voie des pentoses phosphates. Le segment oxydatif est encadré en jaune. Source : <http://flipper.diff.org/app/pathways/info/1557>

Le segment oxydatif de la voie des PP a une fonction primordiale lorsque le substrat est le xylose car il génère du NADPH. Le dosage des activités enzymatiques de la voie des PP lors de cultures continue de *C.utilis* sur xylose ou glucose permet de mettre en évidence l'effet du substrat. Les activités glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et 6-phosphogluconate déshydrogénase sont multipliées par un facteur 2 sur xylose par rapport à une culture sur glucose (Bruinenberg *et al.*, 1983b). D'autres travaux confirment cette augmentation de

l'activité G6PDH sur substrat xylose par rapport au glucose chez *C.shehatae* (Alexander *et al.*, 1988c).

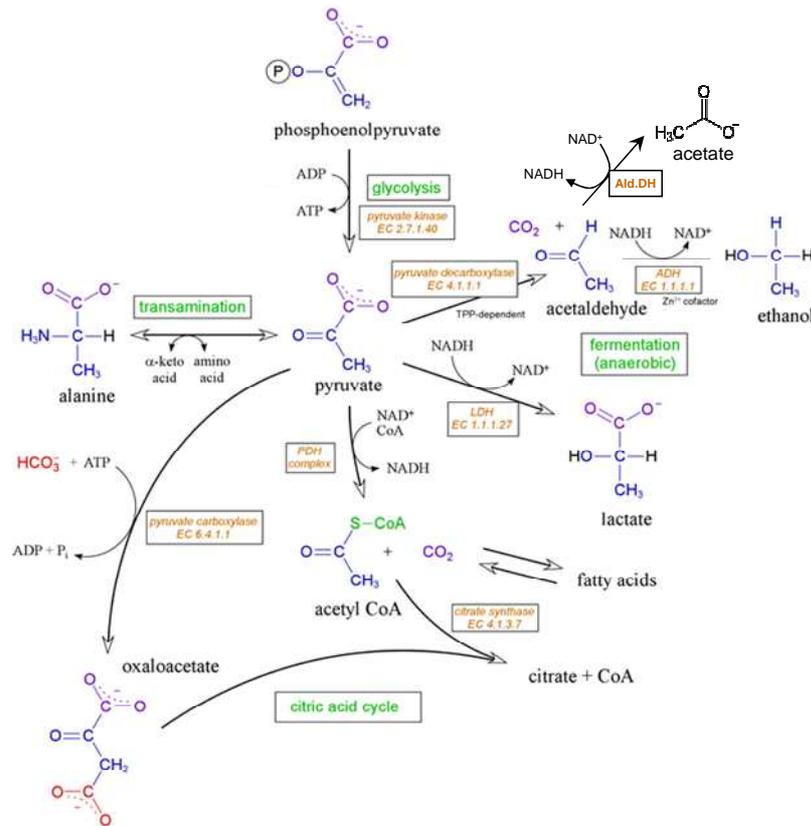
Les travaux de Passoth *et al.*, (1996) indiquent que la pression partielle en oxygène a un effet sur les concentrations intracellulaires en glucose-6-phosphate (G6P) et du fructose-6-phosphate (F6P). Les concentrations augmentent après que l'air d'alimentation du bioréacteur soit remplacé par de l'azote entraînant une diminution brutale de la quantité d'oxygène disponible (la quantification des consommations en oxygène n'est pas réalisée).

Dans le scénario proposé par Kuyper *et al.*, (2004), 75 % des hexoses phosphates produits par la voie des PP sont oxydés par la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase pour produire le NADPH nécessaire à la XR (cf. Figure 2.a, page 32). Pour *Candida utilis*, 30 à 50 % du carbone substrat (xylose) serait oxydé par cette voie (Bruinenberg *et al.*, 1983c).

Les intermédiaires issus de la voie PP (glycéraldéhyde-3-phosphate et fructose-6-phosphate) sont ensuite métabolisés par la voie de la glycolyse. La glycolyse fournit à la cellule du pyruvate, des intermédiaires réactionnels destinés à l'anabolisme et produit de l'ATP et du NADH à raison de 2 moles d'ATP et de NADH par mole de G3P converti en pyruvate (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

### **1.3.3.3. Métabolisme du pyruvate et voies fermentaires**

Les enzymes impliquées dans le métabolisme du pyruvate et les voies fermentaires ont été étudiées chez *Pichia stipitis* en lien avec les activités respiratoires et fermentaires. Le métabolisme du pyruvate et les enzymes impliquées sont détaillés sur la Figure 10.



**Figure 10. Métabolisme du pyruvate. Les enzymes sont : PDH complexe de la pyruvate déshydrogénase, LDH lactate déshydrogénase, ADH alcool déshydrogénase, Ald.DH acétaldéhyde déshydrogénase. Source : sur la base de <http://guweb2.gonzaga.edu>.**

L'activité spécifique du complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) de *P.stipitis* est de l'ordre de 0.1-0.5 U/mg<sub>protéine</sub> (Passoth *et al.*, 1996). Cette activité est indépendante du substrat (glucose, xylose, éthanol) et de l'oxygène. Ces résultats suggèrent que les gènes du complexe PDH sont constitutifs et que le pyruvate est métabolisé préférentiellement vers le Cycle de Krebs, notamment en condition aérobie.

Les voies fermentaires présentes chez *C.shehatae* sont composées de la pyruvate décarboxylase (PDC) et de l'alcool déshydrogénase (ADH). L'acétaldéhyde déshydrogénase (Ald.DH) fournit la cellule en NADH et convertit l'acétaldéhyde en acétate, qui peut être excrété, accumulé ou consommé (formation d'acétylCoA via l'acétylCoA synthétase).

Chez *S.cerevisiae*, l'induction de la PDC est principalement due à l'augmentation de la concentration en métabolites dans la partie inférieure de la glycolyse, notamment par

l'augmentation de la concentration en pyruvate. Cette augmentation de la concentration en pyruvate est visible après un pulse de glucose lors de cultures sur substrat éthanol. Chez *P.stipitis*, cette augmentation de la concentration en pyruvate après un pulse de glucose a lieu mais n'entraîne pas l'induction de la PDC et l'activité enzymatique reste stable ( $<0.05 \text{ U.mg}_{\text{protéine}}^{-1}$ ) (Passoth *et al.*, 1996). L'absence d'induction de la PDC après un pulse de substrat (glucose ou xylose) est caractéristique des levures Crabtree négatives (Van Urk *et al.*, 1989a). En revanche, l'augmentation de la concentration en pyruvate suivie de l'activation de la PDC sont observées en réponse à un changement brutal de la pression partielle en oxygène (la culture sur substrat glucose est soumise à une modification des conditions d'aération entraînant une chute de la pression partielle en oxygène dissous de 80 % à 0 % de la valeur à saturation) (Passoth *et al.*, 1996). Lorsque les mêmes conditions sont appliquées à une culture sur xylose, la concentration en pyruvate n'augmente pas après le changement de la pression partielle en oxygène dissous mais la PDC est activée (Figure 11). Les auteurs concluent donc que le signal d'induction de la PDC chez *P.stipitis* ne provient pas de la glycolyse et que le mécanisme d'induction de cette enzyme est totalement différent de celui de *S.cerevisiae*. Les auteurs montrent également que le signal d'induction de la PDC ne provient pas de l'augmentation des concentrations intracellulaires de glucose-6-phosphate ou fructose-6-phosphate dans la partie supérieure de la glycolyse.

Le mécanisme d'induction de la PDC reste donc inconnu chez les levures xylose+ telles que *Pichia* et *Candida*, mais le signal d'induction semble étroitement lié à la pression partielle en oxygène dans le milieu. Des résultats similaires ont été obtenus lors de la culture de *C.utilis* sur glucose : l'activité spécifique de la PDC est fonction du transfert d'oxygène (Weusthuis *et al.*, 1994). De plus, compte tenu des résultats de Passoth *et al.*, (1996), le signal semble être plus lié à la dynamique de diminution de la pression partielle en oxygène qu'à une certaine concentration seuil (faible) en oxygène.

Une augmentation de l'activité de l'ADH entre des conditions aérobie et anaérobie est mesurée lors de cultures sur xylose de *P.stipitis* et *C.shehatae* (Alexander *et al.*, 1988c; Passoth *et al.*, 1996). L'induction des enzymes ADH et Ald.DH pourrait être liée au même mécanisme oxygène-dépendant (Figure 11), bien que l'acétaldéhyde pourrait également jouer un rôle d'induction.

L'affinité de la PDH pour le pyruvate et son importante activité en fait la voie favorite en condition aérobie. Malgré cet avantage, la limitation en oxygène entraînerait une augmentation de la concentration en NADH intracellulaire, qui inhiberait la PDH et favoriserait la redirection du pyruvate vers la PDC et les voies fermentaires (Passoth *et al.*, 1996).

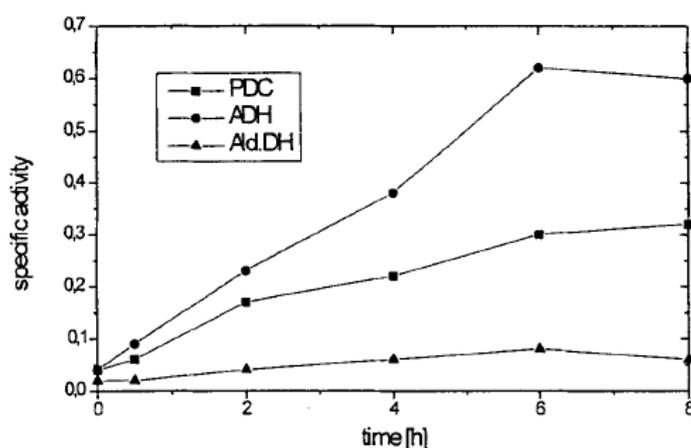


Figure 11. Activités spécifique (U/mg) des enzymes PDC, ADH et Ald.DH après une diminution de la quantité d'oxygène disponible de 80 à 0% lors d'une culture de *C.utilis* sur xylose. Source : Passoth *et al.*, (1996).

### 1.3.4. Rôles de l'oxygène

#### 1.3.4.1. Généralités

Les différents rôles de l'oxygène pour la culture des levures sur substrat xylose ont été extrêmement étudiés. L'oxygène semble avoir un rôle prépondérant vis-à-vis du métabolisme des levures consommant le xylose. Néanmoins, les résultats peuvent s'avérer parcellaires ou peu quantifiés.

L'oxygène intervient avant tout comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire. L'oxygène est indispensable à la croissance puisqu'il participe aux réactions de formation des stérols (Valachovic *et al.*, 2001) et impacte les fonctions mitochondriales (Ligthelm *et al.*, 1988a).

Ligthelm *et al.*, (1988b) montrent que l'oxygénation de la culture a un impact sur les cinétiques de transport du xylose chez *P.stipitis*. En condition aérobie, l'absence d'accumulation intracellulaire de la radioactivité, portée par du D-[1-<sup>13</sup>C] xylose, permet aux auteurs de conclure que l'étape limitante est la consommation de xylose en condition non limitante d'oxygène. En revanche, lorsque des conditions anaérobies sont imposées (cultures en tubes sous flux d'azote), l'étape limitante se situe au niveau du métabolisme puisque du xylose marqué est accumulé intracellulairement.

L'impact de l'oxygène sur les cofacteurs a été mis en évidence par la mesure in-situ de la fluorescence provoquée par le NADH et le NADPH au cours de cultures de *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* et *Candida utilis* (Lidén & Niklasson, 1992). Les cultures subissent un changement brutal de condition : aérobie vers anaérobie. La fluorescence est provoquée grâce à un marquage par une solution commerciale dont la longueur d'onde correspond à celle des cofacteurs. Une sonde est installée au sein du réacteur et mesure la réponse fluorescente induite par les changements environnementaux. Les auteurs mesurent une augmentation de la fluorescence après le changement de condition d'aération et concluent à l'augmentation de la concentration intracellulaire en NAD(P)H. Il n'existe pas d'études similaires sur *C.shehatae*.

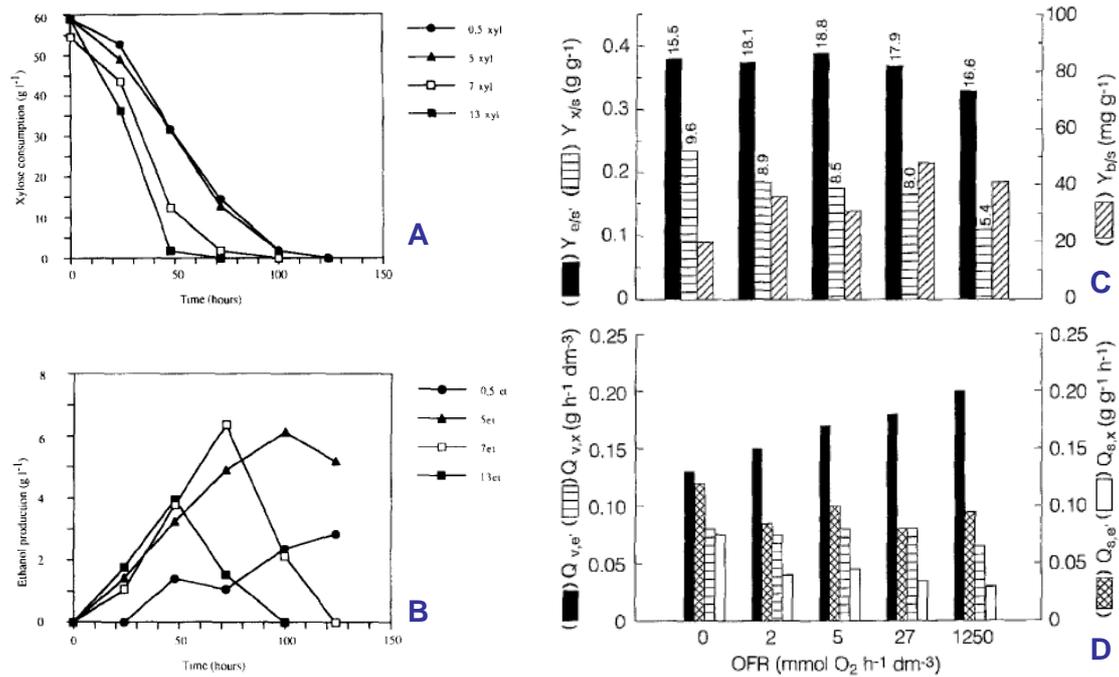
#### **1.3.4.2. Quantification de l'effet oxygène**

Depuis les premières études sur la fermentation alcoolique du xylose, il a été admis que la croissance anaérobie des levures sur substrat xylose est impossible (Jeffries, 1983), contrairement à *S.cerevisiae* sur substrat glucose, et que l'aération améliore la conversion du xylose en éthanol (cf. effet Custer,) (Gong *et al.*, 1981a; Gong *et al.*, 1981b).

Certains auteurs ont quantifié les performances de la production alcoolique en fonction de l'oxygène transféré, de la pression en oxygène dissous, du potentiel d'oxydo-réduction ou de l'oxygène consommé.

- Mesure de l'oxygène transféré

Deux études sont réalisées sur *C.tropicalis* et *C.shehatae* lors de cultures en fioles d'Erlenmeyer pour lesquelles la vitesse de transfert d'oxygène (OTR, Oxygen Transfer Rate, exprimé en  $\text{mmolO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) est estimée soit par la méthode d'oxydation du sulfite de sodium (Lohmeier-Vogel *et al.*, 1989) soit par bullage de mélange calibré d' $\text{O}_2/\text{N}_2$  (Hinfray *et al.*, 1995). Les résultats sont présentés sur la Figure 12.



**Figure 12. (A) Consommation du xylose et (B) production d'éthanol lors de fermentation discontinues de *C.tropicalis* en fonction de la vitesse de transfert d' $\text{O}_2$  (●)  $0.5\text{ mmolO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ; (▲)  $5\text{ mmolO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ; (□)  $7\text{ mmolO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ; (■)  $13\text{ mmolO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Source : Lohmeier-Vogel *et al.*, 1989. (C) Rendements en éthanol, xylitol et biomasse et (D) vitesses spécifiques ( $Q_{\text{s}}$ ) et volumiques ( $Q_{\text{v}}$ ) de production d'éthanol et xylitol en fonction de la vitesse de transfert d' $\text{O}_2$  ( $\text{mmolO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) lors de cultures de *C.shehatae* en fioles. Les valeurs sur le graphique C correspondent aux concentrations maximales observées. Source : Hinfray *et al.*, 1995.**

La concentration en xylose chute plus rapidement avec l'augmentation de l'OTR lors de cultures de *C.tropicalis* en fioles d'Erlenmeyer. La concentration en éthanol est significativement inférieure tout au long de la culture lorsque l'OTR est égal à  $0.5\text{ mmolO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  et une consommation d'éthanol est observée lorsque la culture est limitée en substrat. Ce résultat est confirmé par l'étude de la production d'éthanol chez *C.shehatae* : la vitesse volumique de production d'éthanol ( $Q_{\text{v,e}}$ ) augmente avec l'OTR (Hinfray *et al.*, 1995). En

revanche, les rendements en éthanol obtenus dans les deux études sont très différents :  $Y_{\text{etOH/S}} \text{ max} = 0.11$  et  $0.39 \text{ g.g}^{-1}$  pour *C.tropicalis* et *C.shehatae* respectivement. Pour *C.tropicalis*, le produit majoritaire est le xylitol, atteignant  $20 \text{ g.L}^{-1}$  avec un rendement  $Y_{\text{xOL/S}} \text{ max} = 0.53 \text{ g.g}^{-1}$  dans les conditions de l'étude (Lohmeier-Vogel *et al.*, 1989).

Furlan *et al.*,(1994) réalisent des fermentations en bioréacteurs de 2L où le  $K_La$  a été déterminé par méthode polarographique dans des conditions fixées d'aération et d'agitation. Les auteurs réalisent des fermentations de *C.shehatae*, *P.stipitis*, *P.tannophilus* et *C.parapsilosis* dans deux conditions d'aération (agitation = 250 rpm,  $K_La = 4.8 \text{ h}^{-1}$  (aération fixée à 0.08 vvm) et  $35.4 \text{ h}^{-1}$  (aération fixée à 0.9 vvm) respectivement considérés comme micro-aérobie et aérobie). Les auteurs montrent que la diminution du transfert favorise la production de xylitol au détriment de la biomasse, le rendement en éthanol étant peu impacté. En revanche, comme pour les études précédentes, la vitesse volumique de production d'éthanol augmente de 2.5 fois lorsque le  $K_La$  augmente d'un facteur 7 (Tableau 6). Ce phénomène va à l'encontre des résultats de Sánchez *et al.*,(1997) qui observent une diminution de la vitesse volumique de production d'éthanol lorsque l'aération augmente (ici mesurée en vvm lors de cultures de *C.shehatae* en bioréacteurs de 2L, agitation à 500 rpm).

Concernant les rendements en xylitol, les résultats ne sont pas concordants entre les différents auteurs : une augmentation du rendement est observée lors de la diminution du transfert d'oxygène (Furlan *et al.*, 1994; Laplace *et al.*, 1991b) ou l'inverse (Sánchez *et al.*, 1997). Les conditions anaérobies imposées par Laplace *et al.*,(1991b) montre une augmentation du rendement en éthanol et en biomasse et une diminution du rendement en xylitol (Tableau 6), ces résultats s'opposent à l'observation de l'absence de croissance en anaérobie (Bruinenberg *et al.*, 1983a; Jeffries & Alexander, 1990; Suihko & Dražić, 1983).

La disparité de ces résultats suggère que la mesure du transfert d'oxygène n'est pas un indicateur suffisant pour quantifier l'effet et le rôle de l'oxygène lors de la culture de *C.shehatae*. On peut en effet s'interroger sur le lien direct des données mesurées avec le transfert d'oxygène plutôt qu'avec la vitesse spécifique de consommation d'oxygène par le micro-organisme, caractéristique de son fonctionnement métabolique.

**Tableau 6. Comparaison des rendements de fermentation en fonction du  $K_La$ , de l'aération, de la pression partielle en oxygène dans le milieu pour différentes cultures de *C. shehatae* sur xylose.**  
<sup>a</sup> vitesses spécifique de production d'éthanol ( $g_{\text{éthanol}} \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$ ).

souche de <i>C. shehatae</i>	transfert d'oxygène	$Y_{\text{etOH/S}}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )	$Y_{\text{XOL/S}}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )	$Q_{\text{ve}}$ ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )	référence
NRRL-Y 17024	$K_La = 4.8 h^{-1}$	0.23	0.06	0.16	0.04	Furlan <i>et al.</i> , (1994)
NRRL-Y 17024	$K_La = 35 h^{-1}$	0.21	0.1	0.04	0.1	
ATCC 34889	aération = $0 v.v^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	0.41	-	0.078	0.72	Sánchez <i>et al.</i> , (1997)
ATCC 34889	aération = $0.075 v.v^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	0.41	-	0.094	0.64	
ATCC 34889	aération = $0.3 v.v^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ $PO_2 = 0.7\%$ de la valeur saturante	0.29	-	0.11	0.51	DuPreez <i>et al.</i> , (1989)
CSIR-Y 492	$PO_2 = 0.7\%$ de la valeur saturante	0.34	-	-	0.99	
CSIR-Y 978	$PO_2 = 0.7\%$ de la valeur saturante	0.3	-	-	1.3	
R	$PO_2 = 0.7\%$ de la valeur saturante	0.36	-	-	0.58	
CSIR-Y 981	$PO_2 = 0.2\%$ de la valeur saturante	0.38	-	-	0.65	
CSIR-Y 981	saturante	0.29	-	-	1.71	
ATCC 22984	transfert = $3.90 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0.39	0.09	0.02	$0.15^a$	Laplace, (1991)
ATCC 22984	transfert = $1.90 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0.37	0.09	0.03	$0.15^a$	
ATCC 22984	transfert = $0.25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0.34	0.06	0.16	$0.12^a$	
ATCC 22984	transfert = $0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0.36	0.08	0.02	$0.16^a$	

Plusieurs souches de *C. shehatae* ont été cultivées en bioréacteurs de 1.5 L, équipé d'une mesure en ligne de la pression partielle en oxygène dissous ( $pO_2$ ), en mode discontinu alimenté avec une régulation de l'agitation et de l'aération pour maintenir une  $pO_2$  égale à 0.7 % de la valeur saturante (DuPreez *et al.*, 1989c). Les auteurs obtiennent des vitesses volumiques de production d'éthanol supérieure à  $1 g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ , supérieures à celles obtenues par les autres auteurs (Tableau 6). En revanche, le maintien d'une faible quantité d'oxygène disponible ne permet pas d'améliorer les rendements en éthanol.

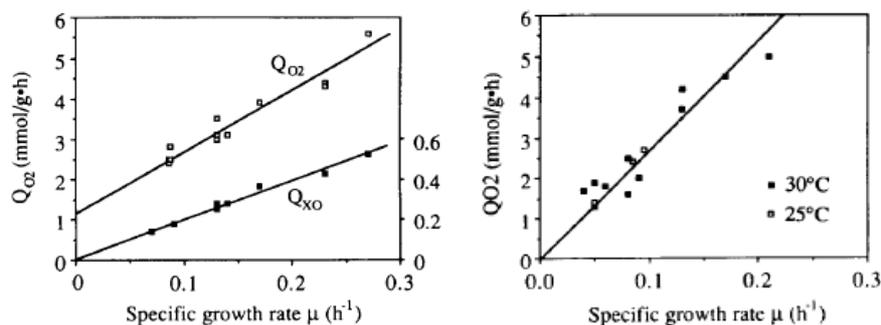
- Mesure du potentiel redox du milieu

Des cultures de *C. shehatae* ont été réalisées en mode discontinu alimenté en utilisant la mesure du potentiel d'oxydo-réduction comme indicateur de contrôle de la limitation oxygène (DuPreez *et al.*, 1988). Les résultats sont comparables à ceux obtenus par le contrôle de la  $pO_2$  (DuPreez *et al.*, 1989c): le rendement en éthanol maximal est de  $0.38 g \cdot g^{-1}$  et le titre de  $35 g \cdot L^{-1}$  en maintenant un potentiel d'oxydo-réduction de  $300 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$ . La croissance semble

fortement perturber le contrôle du potentiel d'oxydo-réduction et des écarts de l'ordre de 10 mV ont un effet considérable sur les cinétiques de fermentation. Une faible augmentation de la consigne du potentiel d'oxydo-réduction entraîne une augmentation de la vitesse d'agitation, augmentant le transfert d'oxygène et favorisant ainsi la croissance. L'augmentation du taux de croissance et de l'activité métabolique a pour conséquence la modification de la relation entre le potentiel d'oxydo-réduction et le transfert d'oxygène, sans que ce phénomène soit parfaitement compris et maîtrisé.

- Mesure de l'oxygène consommé

La mesure de l'oxygène dissous ( $pO_2$ ) dans le milieu réactionnel associée à une mesure de la composition des gaz en entrée et sortie du bioréacteur, permet de quantifier de manière plus précise la consommation d'oxygène par le micro-organisme. La vitesse spécifique de consommation d'oxygène est fonction du taux de croissance lors de cultures de *C.shehatae* en mode continu sur substrat xylose (Alexander *et al.*, 1988a) comme illustré dans la Figure 13.



**Figure 13. Vitesses spécifiques de consommation de xylose et d' $O_2$  en fonction du taux de dilution lors de cultures de *C.shehatae* en mode continu (pH 4.5) en aérobie stricte (à gauche) ou en limitation d' $O_2$  (à droite). Source : Alexander *et al.*, (1988a).**

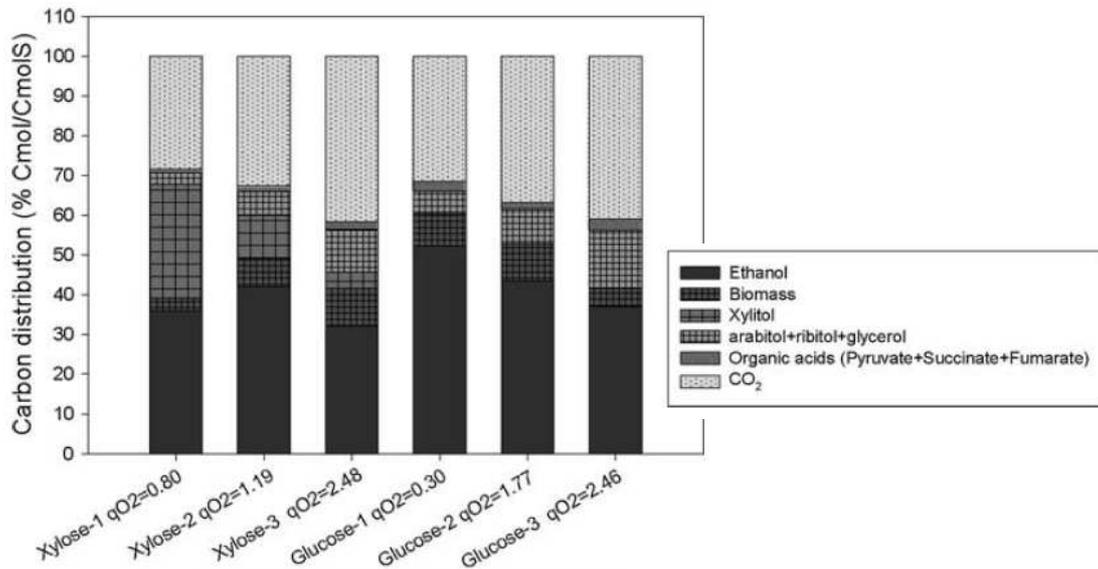


Figure 14. Distribution du carbone en  $Cmol.Cmol^{-1}$  de xylose ou glucose en cultures discontinues alimentées limitées en oxygène pour *C.shehatae* (pH 4.5, 30°C). La moyenne de la vitesse spécifique de consommation d’oxygène est exprimée en  $mmolO_2.gX^{-1}.h^{-1}$ . Source : Fromanger et al, (2010).

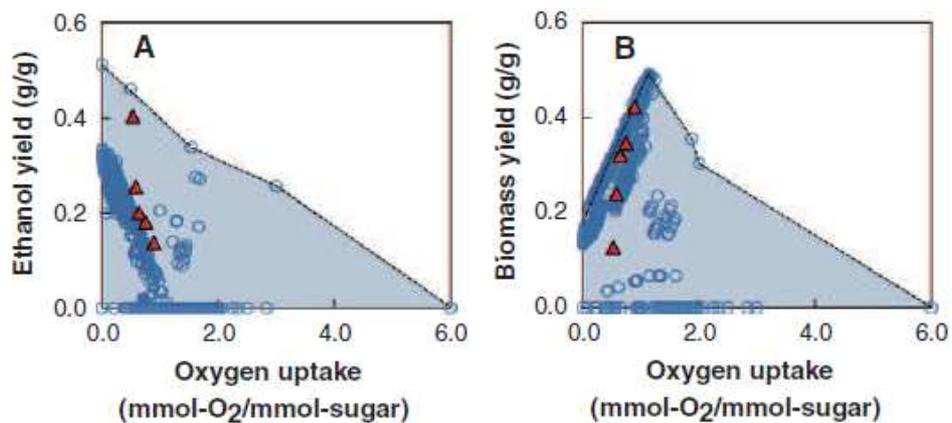


Figure 15. Rendements en éthanol (A) et biomasse (B) en fonction du rendement en  $O_2$ . Les résultats expérimentaux sont donnés en triangles pleins. Les autres symboles correspondent à des simulations sur la base des réseaux métaboliques possibles. Les résultats sont obtenus lors de cultures discontinues sur glucose et xylose (pH 6, 30°C). Source : Unrean & Nguyen, (2012).

Afin de corrélérer la vitesse spécifique de consommation d'oxygène avec la distribution du carbone (xylose ou glucose), six cultures en mode discontinu ont été réalisées. Elles commencent par une phase aérobie permettant la croissance puis sont limitées en oxygène : trois niveaux de limitations sont obtenus lors des expériences sur xylose (Fromanger *et al.*, 2010). Le résultat de cette étude est présenté sur la Figure 14.

La diminution de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène ( $qO_2$ ) entraîne une augmentation du rendement en xylitol et  $CO_2$  et une diminution du rendement en biomasse. Le rendement en éthanol est maximum pour une valeur de  $qO_2$  égal  $1.19 \pm 0.09$   $mmolO_2.gX^{-1}.h^{-1}$ .

L'étude de Unrean & Nguyen,(2012) montre également l'impact de l'oxygène consommé sur les rendements en biomasse et éthanol lors de cultures de *P.stipitis* en limitation d' $O_2$ . Sont reportés dans la Figure 15 les résultats expérimentaux et les données modélisées au cours de ces travaux. Les cultures ont été réalisées en mode discontinu sur un mélange xylose-glucose (5 et 15  $g.L^{-1}$  respectivement).

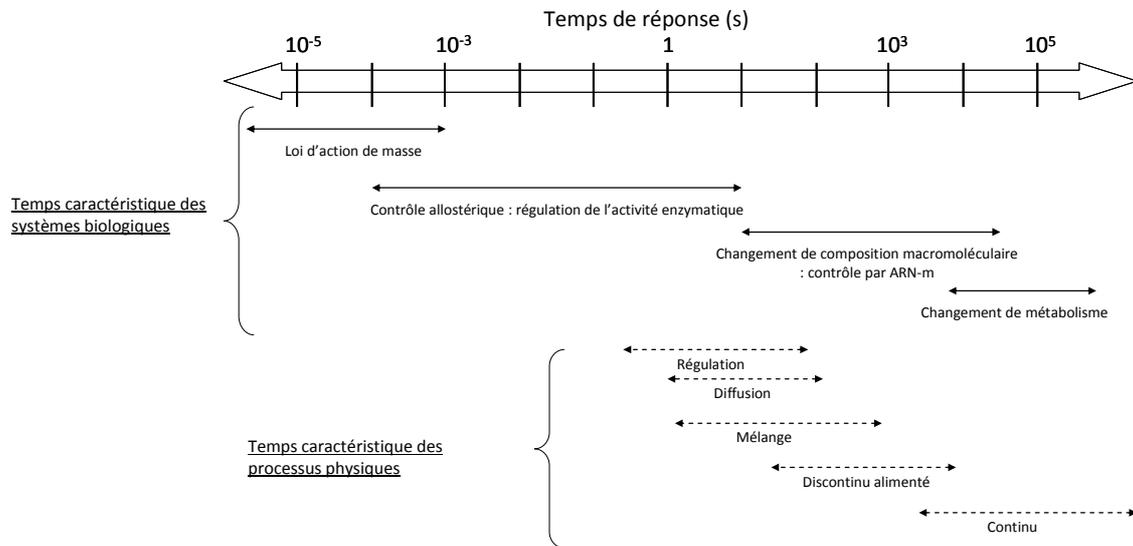
Ces résultats montrent que sur substrats mixtes, la diminution du rendement en oxygène entraîne une augmentation du rendement en éthanol et une diminution du rendement en biomasse dans une zone où le rendement en oxygène est inférieur à  $1 molO_2.mol\ substrat^{-1}$ .

## **1.4. Modélisation**

La modélisation présente de nombreux avantages en fonction du champ d'application désiré. L'optimisation d'un procédé peut se faire de façon empirique mais présente les inconvénients de nécessiter beaucoup de temps et de moyens. La description mathématique des phénomènes biologiques permet de prévoir le comportement du micro-organisme de façon plus ou moins détaillée dans un environnement et des conditions donnés. Le modèle peut également aider à la réalisation des expériences dans le but d'optimiser la productivité, une concentration ou un rendement.

La réactivité des micro-organismes est régie par quatre processus fondamentaux (Figure 16) identifiés par (Roels, 1983) :

- Loi d'action de masse : La constante de temps de ce mécanisme est faible et l'obtention de l'état d'équilibre est quasi-instantané ( $< 10^{-3}$  secondes). Cela permet de poser l'hypothèse d'un régime quasi-permanent.
- Régulation de l'activité enzymatique : les constantes de temps régissant la régulation d'activité enzymatique sont comprises entre  $10^{-4}$  et  $10^2$  secondes.
- Régulation de la concentration enzymatique : ces mécanismes sont caractérisés par des constantes de temps de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  secondes.
- Régulation impliquant une modification des fonctions métaboliques : les constantes de temps de ce processus sont très élevées ( $> 10^4$  secondes), il englobe les phénomènes d'adaptation tels que la sélection d'une sous-population au sein d'une population hétérogène.



**Figure 16. Constante de temps des phénomènes d'adaptation biologique et des processus physiques.**  
**Source : sur la base des travaux de Roels, (1983).**

Dans la littérature, la modélisation de la fermentation alcoolique des pentoses est abordée sous différents aspects : modèle d'approche qualitative raisonnée (Guerrin et al., 1994), modèles paramétriques phénoménologiques (Alexander et al., 1988b; Nakamura et al., 2001; Rizzi et al., 1989) et des modèles d'analyse de flux métaboliques (Granström et al., 2002; Granström et al., 2000; Unrean & Nguyen, 2012) .

L'approche qualitative raisonnée (Guerrin et al., 1994) est basé sur l'utilisation de connaissances empiriques et sur l'expertise technique des utilisateurs (SIMAO : System to Interpret Measurements And Observations). Il s'agit d'un des champs de l'Intelligence Artificielle dont le but est de superviser des systèmes complexes. Ce type d'approche ne nécessite pas la connaissance précise des relations existant entre les variables. Les variables déterminantes pour le procédé correspondent par exemple aux conditions initiales, aux paramètres de fermentation et aux données issues de la fermentation : elles peuvent être quantitatives ou qualitatives. L'ensemble de variables sont traduites dans un espace appelé 'quantity space' codé par 5 symboles, impliquant une interprétation intuitive des phénomènes. Il permet de prédire qualitativement l'issue de la fermentation (par exemple : croissance moyenne, fermentation au dessus de la moyenne). Ce type d'approche n'a aucun intérêt pour

la compréhension des phénomènes biologiques mais peut permettre d'orienter le choix des expériences à mener.

Les modèles cinétiques non structurés permettent une description physique du processus de fermentation. Ils ne considèrent la biomasse que par une seule grandeur, en général sa concentration, ce qui ne permet pas de décrire des activités/fonctions différentes au sein de la biomasse. Les paramètres des équations mathématiques sont identifiés à partir des expériences. Ces modèles nécessitent donc d'avoir des points expérimentaux et n'est valable que pour les conditions dans lesquels les paramètres ont été obtenus, ce qui peut les rendre difficilement extrapolables.

#### **1.4.1. Le modèle de Nakamura *et al.*, (2001)**

Ce modèle phénoménologique décrit le comportement dynamique de *Pichia stipitis* au cours de la fermentation à partir d'un mélange de glucose et de xylose (Nakamura *et al.*, 2001). Le modèle traduit la consommation séquentielle des substrats (glucose puis xylose) en écrivant les réactions liées à 2 enzymes la première étant constitutive et l'autre inductible. Ce modèle prend en compte la répression catabolique du glucose. Ce modèle, basé sur la loi de Monod, décrit dans un premier temps la croissance diauxique sur les deux substrats, en incluant un terme de synthèse de l'enzyme inductible du xylose et un terme d'inhibition par l'autre substrat (répression catabolique). La vitesse de production d'éthanol est ensuite exprimée en fonction des taux de croissance sur les deux substrats. L'inhibition par le substrat et l'éthanol est également incluse dans le modèle. Les paramètres du modèle sont identifiés à partir de données expérimentales obtenues lors de cultures discontinues avec les substrats seuls ou en mélange. Le modèle est validé au cours de cultures discontinue et continue. Les conditions d'agitation et d'aération sont ajustées de façon à maintenir la pression partielle en oxygène dissous ( $pO_2$ ) à 13 % de la valeur à saturation. Les résultats obtenus permettent de décrire de façon satisfaisante les cinétiques de production. Néanmoins, l'effet de l'oxygène n'est pas du tout abordé, la pression partielle en oxygène étant maintenue constante. Les paramètres peuvent donc ne pas être valables lorsque les conditions d'oxygénation varient. La méthode reste donc applicable à *C. shehatae* mais les limites dues à cette approche seront les mêmes.

### 1.4.2. Modèle d'Alexander *et al.*, (1988a)

Ce modèle concerne la culture aérobie de *C.shehatae* en culture continue sur substrat xylose en considérant que l'oxygène peut être un substrat limitant au même titre que le substrat carboné. La vitesse spécifique de consommation de xylose suit une loi de Monod avec  $q_{XYLOSE_{max}}$  la vitesse maximale de consommation de substrat,  $[S]$ , la concentration en xylose et  $K_s$  la constante d'affinité du micro-organisme pour le xylose.

En condition non limitante d'oxygène, le taux de croissance n'est donc limité que par la vitesse de consommation de xylose (le taux de croissance suit une loi de Monod). Lorsque le xylose est en excès par rapport à l'oxygène, la croissance est alors limitée par la vitesse spécifique de consommation d'oxygène. Celle-ci est alors calculée connaissant la vitesse spécifique de production de  $CO_2$  (hors part fermentaire) et le quotient respiratoire estimé à  $1.08 (\pm 0.17)$ . Les auteurs utilisent donc deux équations distinctes pour calculer le taux de croissance en fonction des conditions de culture, ce qui peut le rendre moins généralisable. Le modèle suppose en outre que l'éthanol est le seul métabolite produit (excepté la biomasse catalytique). La vitesse spécifique de production d'éthanol est alors égale à la différence algébrique entre la vitesse spécifique maximale de production d'éthanol (rendement théorique limite x vitesse maximale de consommation de substrat) et la vitesse spécifique de production de biomasse ( $\mu$ ). Ainsi la production d'éthanol augmente quand la croissance diminue. Ce modèle prend en compte la vitesse spécifique de consommation d'oxygène dont le rôle sur le métabolisme a été identifié comme prépondérant (cf. 1.3.4.2) mais deux équations distinctes sont alors utilisées pour calculer la vitesse spécifique de croissance. Les résultats obtenus valident le modèle cinétique proposé par les auteurs, qui concluent que ce modèle est capable de représenter le métabolisme du xylose par *C.shehatae* en condition aérobie et limitée en oxygène.

### 1.4.3. Modèle de Rizzi *et al.*, (1989)

Le modèle de Rizzi *et al.*, (1989) est un modèle paramétrique basé sur un bilan matière du xylose et une description cinétique de la fermentation. Les expérimentations sont réalisées avec *Pichia stipitis* en cultures discontinue et continue en bioréacteurs instrumentés. Le métabolisme du xylose au cours de la croissance sous limitation d'oxygène est divisé en trois parties : respiration, fermentation et assimilation. La distribution du carbone vers chaque partie

est déterminée par la disponibilité en oxygène et par le rendement énergétique propre à chaque voie.

L'influence du transfert d'oxygène sur les cinétiques de fermentation du xylose est considéré via un modèle mathématique comprenant quatre paramètres : le rendement en biomasse par rapport à l'oxygène ( $Y_{X/O_2}$ ), le coefficient de maintenance ( $m_{ATP}$ ), le ratio  $P/O$  et le rendement maximal en ATP ( $Y_{ATP}^{max}$ ). Les auteurs concluent que la vitesse spécifique de consommation d'oxygène est la variable influençant le plus les rendements et les vitesses de production. La production d'éthanol a lieu en anaérobie ou en condition limitante d'oxygène à condition que la concentration en oxygène dissous soit inférieure à  $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$  soit une valeur de pression partielle en oxygène que l'on peut estimer à 0.013% de la valeur à saturation. Grâce à la modélisation des cinétiques, la conduite a pu être optimisée et permis d'obtenir une vitesse spécifique de production d'éthanol de  $0.12 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  et un rendement en éthanol de  $0.39 \text{ g.g}^{-1}$  lors d'une culture discontinue en limitation d'oxygène à une vitesse de transfert d'oxygène de  $3.75 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (en supposant que la quantité d'oxygène dissous est négligeable, cette valeur conduirait par calcul à des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène comprises entre  $1.9$  et  $0.4 \text{ mmol.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

Les trois modèles cinétiques précédents présentent l'avantage d'être simples et faciles à mettre en œuvre et donnent des résultats corrects si les conditions de mise en œuvre concourent à une production de biomasse et d'éthanol. Ils restent néanmoins limités à l'obtention des variables macroscopiques, ne sont pas extrapolables ou généralisables en dehors des conditions dans lesquelles les paramètres ont été déterminés et ne permettent pas de comprendre les mécanismes intracellulaires responsables des phénomènes observés lors des transitions métaboliques. D'autres approches basées sur la modélisation stœchiométrique du métabolisme semblent donc plus adaptées pour comprendre le rôle des substrats et leur distribution dans le réseau métabolique. De la connaissance de la structure du métabolisme cellulaire peut découler l'estimation de la distribution des flux dans des conditions données (metabolic flux analysis), la prédiction de ces flux à partir d'hypothèses d'optimisation de fonctionnement cellulaire (flux balance analysis) et l'analyse structurelle des caractéristiques systémiques cellulaires (network-based pathway analysis).

#### 1.4.4. L'Analyse de Flux Métabolique

Les flux déterminent de manière fondamentale l'orientation du métabolisme de la cellule et par voie de conséquence les métabolites qui sont produits, ce qui peut modifier dynamiquement ses fonctionnements physiologiques et métaboliques. La valeur du flux est donc un des paramètres critiques d'une voie métabolique traduisant le degré d'engagement de ces différentes voies dans les fonctions cellulaires globales (Stephanopoulos *et al.*, 1998). La quantification précise des flux métaboliques peut être un objectif déterminant pour l'étude de la physiologie cellulaire et du génie microbiologique, en particulier pour orienter la production de métabolites d'intérêt. Une méthode pour la quantification des flux métaboliques est la méthode dite d'analyse de flux métaboliques (MFA) dont l'intérêt croissant montre les potentialités qu'elle offre. Les flux intracellulaires sont calculés en utilisant un modèle stœchiométrique décrivant les réactions biologiques intracellulaires d'intérêt. Bien sûr, les modèles pourront être plus ou moins complexes et donc plus ou moins descriptifs des mécanismes que l'expert aura mis dans leur construction et basés sur les connaissances qui y seront traduites mathématiquement (nombre de réactions considérées, nombre de métabolites excrétés, choix des cofacteurs...).

L'analyse des flux métaboliques et plus largement celle des réseaux métaboliques peut :

- Permettre la prédiction quantitative de la production de métabolites d'intérêt (biomasse catalytique ou autres).
- Être une aide à l'ingénierie métabolique pour la construction de souches spécifiquement améliorées.
- Calculer les rendements théoriques limites et obtenir des points de références pour l'optimisation d'un procédé.
- Calculer des distributions des flux de carbone et quantifier la contribution de chaque voie métabolique.
- Identifier des voies alternatives et évaluer la flexibilité métabolique en fonction de conditions prédéterminées.

Le premier principe de fonctionnement des modèles métaboliques est la loi de la conservation de la matière et la loi d'action de masse (Edwards & Palsson, 1998). Les modèles de flux

métaboliques reposent sur l'hypothèse que les changements métaboliques intracellulaires sont plus rapides que la vitesse de croissance et que celle des changements d'environnement du micro-organisme (Varma & Palsson, 1994a; Varma & Palsson, 1994b). Plusieurs flux extracellulaires sont mesurés et utilisés comme données d'entrée pour les calculs, classiquement les vitesses de consommation de substrats et d'excrétion de métabolites. Les résultats des calculs se présentent sous la forme de carte des flux intracellulaires indiquant les vitesses intracellulaires pour chacune des réactions biochimiques prises en compte dans le modèle

La construction des modèles est spécifique à chaque micro-organisme, et considère plus ou moins de réactions et de métabolites d'intérêt en fonction de la complexité voulue pour décrire et comprendre les phénomènes envisagés. La construction du modèle métabolique est dépendante des connaissances disponibles dans la littérature et/ou par l'expert pour le micro-organisme considéré. Des informations ou connaissances peuvent également être introduites en supposant des analogies avec des micro-organismes proches. Aujourd'hui, des bases de données permettent d'accéder facilement aux connaissances métaboliques (voies, composés, enzymes, gènes) qui sont alors répertoriées par micro-organisme d'intérêt constituant une source d'informations grandissante sur l'organisation, la structuration voire même les régulations des réseaux métaboliques.

#### **1.4.4.1. Application de MFA à l'étude de la fermentation du xylose**

Il existe peu d'études traitant de l'analyse des flux métaboliques lors de la fermentation alcoolique du xylose. Les travaux décrits concernent des micro-organismes métaboliquement proches de la souche d'intérêt dans des conditions de croissance ou de production d'éthanol : Granström *et al.* (2000) proposent un modèle stœchiométrique pour étudier la croissance de *C.millieri* sur substrat glucose et xylose, ce modèle est ensuite modifié pour décrire le métabolisme de *C.tropicalis* en culture continue limitée en oxygène (Granström *et al.*, 2002). Unrean & Nguyen (2012) réalisent un modèle de *P.stipitis* pour mettre en évidence l'effet de l'oxygène sur la production d'éthanol. Les informations relatives à la construction de ces trois de modèles sont détaillées dans le Tableau 7.

**Tableau 7. Comparaison de trois modèles MFA pour le métabolisme du xylose**

Auteurs	Granström <i>et al.</i> , (2000)	Granström <i>et al.</i> , (2002)	Unrean & Nguyen (2012)
Micro-organisme d'étude	<i>Candida milleri</i>	<i>Candida tropicalis</i> et <i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia stipitis</i>
Substrat	glucose + xylose	glucose + xylose + formate	glucose + xylose
Nombre d'équation et de métabolites (n x m)	80 x 99	87 x 101	67 x 72
degré de liberté	7	8	11
Nombre de vitesses extracellulaires mesurées	9	9	?
Cofacteur de la XR	NADPH	coefficient variable	NADPH
Compartimentation	oui	oui	oui
Construction de la biomasse	La biosynthèse est réalisée à partir de la polymérisation des protéines, des acides ribonucléiques, de deux acides gras : l'oléate et le palmitoléate, ainsi que d'un polysaccharide	La biosynthèse est réalisée à partir de la polymérisation des protéines, des acides ribonucléiques, de deux acides gras : l'oléate et le palmitoléate, ainsi que d'un polysaccharide	La biosynthèse est réalisée à partir de 9 précurseurs (glucose-6-phosphate, ribose-5-phosphate, érythrose-4-phosphate, pyruvate, acetyl-CoA, phosphoenolpyruvate, $\alpha$ -cétoglutarate et oxaloacétate) et de l'ensemble des cofacteurs, $\text{NH}_3$ et ATP
Spécificité des cofacteurs	Ald.DH $\text{NADP}^+$ et $\text{NAD}^+$ dépendante, IDH et malate déshydrogénase uniquement $\text{NAD}^+$ dépendantes	Ald.DH $\text{NADP}^+$ et $\text{NAD}^+$ dépendante, IDH et malate déshydrogénase uniquement $\text{NAD}^+$ dépendantes	IDH cytosolique $\text{NADP}^+$ dépendante et IDH mitochondriale $\text{NAD}^+$ dépendante, Ald.DH cytosolique $\text{NADP}^+$ dépendante et Ald.DH mitochondriale $\text{NAD}^+$ dépendante
ratio P/O	$\text{NADH} : 1.16 / \text{FADH}_2 : 0.1$	$\text{NADH} : 1 / \text{FADH}_2 : 0.1$	$\text{NADH} : 1.8 / \text{FADH}_2 : 1.8$

Le modèle construit par Granström *et al.* (2000), adapté aux substrats glucose et xylose, possède une XR NADPH-dépendante sur la base du dosage de l'activité enzymatique chez *C.millieri*. Ce modèle prend en compte la consommation du glucose et du xylose, la respiration, la croissance, la production de métabolites et la dissipation énergétique. Les vitesses mesurées sont les vitesses de consommation de glucose, xylose, oxygène et de production de glycérol, xylitol, acide acétique, éthanol,  $\text{CO}_2$  et biomasse.

Par ailleurs, des contraintes sont imposées pour la résolution, à savoir le sens thermodynamique des réactions liées à l'Ald.DH et l'acétylCoA synthétase ainsi que la vitesse

de consommation de substrat. Le modèle est alors validé par comparaison des vitesses spécifiques calculées et mesurées.

Ce modèle est modifié puis utilisé à nouveau pour analyser les flux de *C.tropicalis* et *C.guilliermondii* en culture continue en limitation d'oxygène, pour l'étude du métabolisme en présence d'acide formique (Granström *et al.*, 2002). Le modèle intègre en plus la vitesse spécifique de consommation de formate.

Unrean & Nguyen,(2012) réalisent une analyse des modes élémentaires (EMA) à partir d'un modèle adapté à *P.stipitis*. La XR est considérée strictement NADPH dépendante. Onze métabolites extracellulaires sont considérés : xylose, glucose, acétate, succinate, glycérol, éthanol, NH<sub>3</sub>, biomasse, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, et ATP. Les besoins énergétiques liés à la maintenance sont pris en compte via la production d'ATP extracellulaire. Ce modèle est constitué de la glycolyse, de la voie des PP, du Cycle de Krebs, du Cycle du glyoxylate, de la synthèse des métabolites suivants : éthanol, acétate, xylitol, succinate, glycérol et biomasse.

Les simulations sont réalisées en co-substrats (glucose + xylose) pour trouver les conditions d'oxygénation optimisant la productivité et le rendement en éthanol. L'approche est ensuite couplée à une analyse des modes élémentaires pour révéler les mécanismes de régulation enzymatique en fonction de la disponibilité en oxygène et suggérer des modifications génétiques pour augmenter les capacités de production de la souche d'intérêt. Le modèle proposé par Unrean & Nguyen,(2012) est validé par comparaison entre l'espace des solutions possibles identifiées par le modèle et les données expérimentales issues de 5 cultures discontinues (15 g.L<sup>-1</sup> glucose et 5 g.L<sup>-1</sup> xylose ; 5 débits d'aération sont testés en 0.1 et 1 vvm). Les simulations sont réalisées en co-substrats (glucose + xylose), les réseaux métaboliques identifiés par l'analyse des modes élémentaires sont sélectionnés pour leur capacité de production d'éthanol et les enzymes cibles pour l'amélioration de la souche sont déterminées.

#### **1.4.4.2. Points forts et points faibles de chaque modèle**

Les modèles de Granström *et al.*, (2002; 2000), permettent de mieux comprendre les flux métaboliques lors de la croissance de souches proches de *C.shehatae* sans mettre en évidence le lien avec l'effet oxygène. Les auteurs utilisent dans leur second modèle un coefficient

variable pour exprimer la dualité des cofacteurs sur la XR. Ils adaptent la valeur du coefficient en fonction de l'activité NADPH et NADH dépendantes de la XR de *C.tropicalis*. D'autres coefficients sont insérés dans ce modèle et ajustés pour les activités des enzymes considérées également NADH et NADPH dépendantes.

Concernant la production d'éthanol par *P.stipitis*, Unrean & Nguyen,(2012) mettent en évidence 6 modes élémentaires correspondant à une production d'éthanol associée ou non à la croissance. Ces travaux sont les premiers à mettre en évidence une réelle quantification de la demande en oxygène pour la conversion aérobie du xylose en éthanol par *P.stipitis*. Dans l'hypothèse de conversion pure (sans croissance associée), ils montrent que 0.5 mole d'O<sub>2</sub> sont nécessaires à la conversion de 1 mole de xylose pour produire 1.5 moles d'éthanol soit un rendement théorique limite en éthanol de 0.46 g.g<sup>-1</sup>. Lorsque la conversion du xylose en éthanol est associée à la croissance, 1.6 moles d'O<sub>2</sub> sont nécessaires et le rendement en éthanol n'est que de 0.27 g.g<sup>-1</sup> pour un rendement en biomasse de 0.066 g<sub>biomasse</sub>.g<sub>xylose</sub><sup>-1</sup> (10 mg/1 mmole xylose). Ce modèle est limité par l'hypothèse d'une XR strictement NADPH-dépendante, qui joue un rôle prépondérant dans la distribution des flux. De plus, l'étude se positionne dans le cas des substrats mixtes sans prendre en compte la possible répression catabolique du glucose sur les enzymes du métabolisme du xylose. Les modèles présentés sont réalisés sur des souches métaboliquement proches de *C.shehatae* pour des applications plus ou moins différentes, il reste néanmoins des limites aux travaux cités, notamment pour la compréhension du rôle de l'oxygène et l'optimisation de la fermentation alcoolique du xylose.

### **1.5. Analyse critique de la bibliographie**

La souche *Candida shehatae* possède la capacité de croître sur xylose sur milieu défini. Les nutriments nécessaires à la croissance et à la production d'éthanol sont identifiés et les conditions environnementales (pH, température) optimales ont été décrites dans la littérature. La régulation de la température peut permettre d'améliorer la tolérance à l'éthanol ou favoriser la croissance.

Les performances de production d'éthanol (titre, rendements, productivités) sont en deçà de celles obtenues par *Saccharomyces cerevisiae* sur glucose. Les rendements en éthanol sur xylose notamment ne dépassent pas  $0.45 \text{ g.g}^{-1}$  et les conditions d'obtentions reportées dans la littérature sont difficiles à reproduire. Les titres en éthanol obtenus avec *C.shehatae* sont rarement supérieurs à  $45 \text{ g.L}^{-1}$  tandis que la levure *S.cerevisiae* atteint des titres de  $147 \text{ g.L}^{-1}$  (Alfenore *et al.*, 2002). Néanmoins, l'analyse de la bibliographie montre qu'il existe une marge d'amélioration des performances.

Le bilan énergétique et la distribution du carbone lors du métabolisme réductif du xylose sont variables en fonction du réseau métabolique et notamment des cofacteurs mis en jeu lors de la réduction du xylose par la XR possiblement NADPH dépendante ou NADH et NADPH dépendantes en fonction des auteurs. Aussi, en fonction du ou des cofacteur(s) supposé(s), la distribution des flux de carbone dans la cellule peut varier induisant des orientations métaboliques différentes pour rétablir la balance oxydo-réductive, et induisant des productions de métabolites différentes. L'oxygène, en tant qu'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire, joue donc un rôle majeur dans l'équilibre oxydo-réductif notamment vis-à-vis du NADH et constitue un élément clé de la régulation de la fermentation alcoolique et de la distribution du carbone.

Plusieurs études décrivent plus ou moins quantitativement les effets de l'oxygène sur la production de xylitol et d'éthanol, la croissance voire même la régulation enzymatique des voies fermentaires. De nombreuses études ont donc porté sur la quantification de l'oxygène et la recherche d'un optimum pour la production d'éthanol. Plusieurs stratégies ont été

adoptées, en faisant varier les conditions d'agitation, d'aération, de transfert, en imposant une régulation de la pression partielle en oxygène dissous, du potentiel d'oxydo-réduction.

L'ensemble de ces études n'a pas permis d'obtenir un consensus sur le rôle de l'oxygène dans l'orientation du métabolisme. Au-delà de l'oxygène, se pose plus largement la question des équilibres d'oxydo-réduction entre le cytosol et la mitochondrie ainsi que les mécanismes qui orientent le métabolisme de *Candida shehatae* entre modes oxydatif et fermentaire. L'analyse de l'état de l'art a permis de montrer que les modèles basés sur l'analyse de flux métabolique (MFA) pouvaient permettre d'approcher ces questionnements.

Par ailleurs, il existe peu d'études de ce type dans la littérature et celles qui sont disponibles ont été réalisées sur des microorganismes métaboliquement proches de *C. shehatae* mais aucun à notre connaissance pour le micro-organisme choisi dans cette étude.

Ces travaux se proposent donc de répondre aux questionnements suivants :

- quelle est la répartition des flux de carbone intracellulaires en fonction de la vitesse de consommation d'oxygène ?
- est-il possible d'orienter préférentiellement le carbone vers un métabolite d'intérêt par la conduite du réacteur ?

Afin d'y répondre, la démarche suivie est basée sur une approche couplée d'expérimentation et de modélisation (par MFA). Un modèle métabolique a été spécifiquement construit pour *Candida shehatae* sur la base des connaissances scientifiques de la littérature pour des microorganismes proches (levures C5 +) mais également sur le savoir-faire développé au cours de travaux antérieurs dans l'équipe d'accueil sur *Saccharomyces cerevisiae*. Ce modèle devra notamment permettre de déterminer les rendements théoriques limites accessibles pour la production d'éthanol ou de biomasse. La modélisation permettra également de déduire les conditions d'expérimentations adaptées à l'étude des verrous biologiques considérés. Des expérimentations dédiées seront réalisées dans des conditions quantifiées notamment vis-à-vis de la consommation spécifique en oxygène. L'analyse des données expérimentales des cinétiques de culture reposera sur une quantification des principales variables de la réaction (biomasse, substrats, éthanol et co-métabolites majeurs) et leur validation par des bilans élémentaires et par réconciliation des données. Les données expérimentales obtenues sous

différentes contraintes d'environnement oxygène serviront à l'établissement des cartes de flux intracellulaires ; ces cartes seront indispensables pour comprendre les mécanismes d'orientation métabolique chez *Candida shehatae* et définir les conditions optimales de production d'éthanol ciblé comme métabolite d'intérêt.

---

CHAPITRE 2 :

MATÉRIELS ET MÉTHODES

EXPÉRIMENTALES

---



## Chapitre 2. Matériels et Méthodes Expérimentales

---

### 2.1. Souches et milieux de fermentation

Au cours des travaux, la souche utilisée est une levure *Candida shehatae* ATCC 22984 (American Type Culture Collection). La souche est conservée en cryotube à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans un milieu riche YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) contenant 43% de glycérol. Lors de l'utilisation de cette souche, elle est décongelée à température ambiante et étalée sur gélose PCA (Plate Count Agar). La culture se développe durant 48h à  $30^{\circ}\text{C}$  et peut éventuellement être conservée sur boîte de pétri à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son utilisation.

Les milieux utilisés sont : le milieu riche YPD et le milieu de fermentation dit milieu minéral. L'utilisation d'un milieu minéral permet de s'affranchir de la variabilité dans la composition de l'extrait de levure, et de maîtriser l'apport en nutriments (carbone, sels, oligo-éléments et vitamines) dans le milieu.

Le milieu YPD est composé de  $10\text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure,  $10\text{ g.L}^{-1}$  de peptone,  $20\text{ g.L}^{-1}$  de glucose et  $9\text{ g.L}^{-1}$  de NaCl.

Le milieu minéral est calculé pour une production de  $20\text{ g.L}^{-1}$  de biomasse sans limitation sur la base des travaux d'Egli & Fiechter (1981). La composition est calculée pour répondre aux besoins nutritionnels de *C. shehatae* sur le plan des vitamines, sels, et oligo-éléments (Du Preez *et al.*, 1985; Du Preez *et al.*, 1986; Slininger *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 1995).

Le milieu est constitué des 4 solutions décrites dans le Tableau 8.

**Tableau 8. Solutions composants le milieu de culture de *C.shehatae*.**

N° de solution	Composé	[Concentration] en g.L <sup>-1</sup>	facteur de dilution de la solution mère
1. Sels	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	-
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	-
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	3	-
	Glutamate de sodium	1	-
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5	-
2. Oligo-éléments	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.04	1000
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.0038	1000
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0005	10000
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.0009	10000
	NaMoSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.00006	10000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.023	1000
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.023	1000
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.003	1000
3. Vitamines	Acide pantothénique	0.005	400
	Thiamine	0.005	400
	Acide nicotinique	0.005	400
	Pyridoxine	0.005	400
	Mésoinositol	0.125	400
	Acide p-aminobenzoïque	0.001	400
	Biotine	0.000012	5000
4. substrat	D-Xylose	20	-

Les solutions 1 et 4 sont stérilisées à l'autoclave (121°C, 20 minutes). Chaque oligo-élément est préparé séparément sous forme concentrée et les solutions sont autoclavées (121°C ; 20 minutes) à l'exception de la solution de fer. Le pH de solution de fer est ajusté à 1 par ajout d'HCl à 37%, la solution est ensuite filtrée sur Minisart 0,2µm (SARTORIUS®). Les solutions d'oligo-éléments sont conservées 6 mois à l'abri de la lumière. La solution de biotine est préparée séparément. Les autres vitamines sont préparées dans la même solution en les ajoutant une à une, en ajustant le pH à 6,5 entre chaque ajout. Les solutions de vitamines sont ensuite filtrées sur Minisart 0,2µm et conservées 2 mois à 4°C et à l'abri de la lumière.

Le milieu est reconstitué extemporanément au moment de la préparation des milieux de culture en ajoutant chaque solution et le pH est ajusté à 4.5 par ajout d'acide

orthophosphorique. Les vitamines nécessaires à la croissance du micro-organisme sont ajoutées de façon séquentielle à chaque doublement de la population sur la base des travaux d'Alfenore *et al.*,(2002) permettant une amélioration des performances de fermentation. Les oligo-éléments sont ajoutés sous forme de solutions concentrées lorsque la biomasse dépasse  $20 \text{ g.L}^{-1}$ .

## **2.2. Propagation**

La première étape de propagation consiste à inoculer 5 mL de milieu YPD en tubes de 50 mL à partir des colonies isolées sur gélose PCA. Les tubes Falcon® sont incubés 24h à 30°C à 100 rpm. La seconde étape est réalisée en milieu minéral contenant  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de xylose. Les cultures en tubes sont transférées dans une fiole Erlenmeyer à baffles de 500 mL contenant 50 mL de ce milieu. Cette seconde préculture est incubée 12h à 30°C à 100 rpm. Une troisième étape, identique à la seconde, est réalisée en transférant les 50 mL de la préculture précédente dans une fiole d'Erlenmeyer à baffles de 5L contenant 500 mL de milieu minéral, qui est incubé à nouveau 12h dans les conditions précédentes, avant que le volume final nécessaire ne soit transféré stérilement dans le bioréacteur.

### **2.3. Mise en œuvre de *Candida shehatae* en bioréacteur**

L'ensemble des expériences ont été conduites sur milieu minéral, avec le xylose comme source de carbone, dans des bioréacteurs instrumentés. Les cultures sont menées en mode continu et mode discontinu alimenté.

#### **2.3.1. Culture continue**

Le fonctionnement d'un système de culture continu est caractérisé par une alimentation continue en milieu neuf simultanément avec un soutirage continu du milieu réactionnel. Par ailleurs, les débits d'alimentation et de soutirage étant égaux, ce système fonctionne à volume constant dans le fermenteur. Ce mode de culture permet d'atteindre et de maintenir un état d'équilibre biologique constant dans le temps. La condition d'équilibre est que le taux de dilution est égal à la vitesse de croissance microbienne, celle-ci étant inférieure à la vitesse de croissance maximale ( $\mu_{max}$ ).

Dans cette expérience, nous avons réalisé une culture en mode continu dans un fermenteur (B. Braun Biotech Sartorius®) de 1 L utile et 2 L totaux. Le logiciel MFCS/win2.0 pilote le réacteur qui est équipé pour la mesure de la pression partielle en oxygène (sonde InPro® 6800 Mettler Toledo), la mesure du pH (sonde Mettler Toledo 405) et la mesure de la température. Les gaz d'entrée et de sortie du condenseur sont analysés (cf. 2.4.6 Méthode d'analyse des gaz).

Le bioréacteur estensemencé par 100 mL de préculture préparée comme décrit ci-dessus. La température est régulée à 30°C et le pH à 4.5 par ajout d'une solution d'ammoniaque à 14% v/v, l'agitation est fixée à 400 rpm et l'aération est ajustée en fonction du transfert d'oxygène souhaité ou nécessaire. La concentration initiale en xylose est de 10 g.L<sup>-1</sup> calculée pour obtenir environ 4 g.L<sup>-1</sup> de biomasse et une concentration résiduelle en xylose nulle dans l'intervalle de temps souhaité.

Dans un premier temps, la culture est initiée en mode discontinu pendant 18h pour une croissance en condition aérobie. L'agitation et de l'aération sont régulées pour maintenir la

$PO_2$  supérieure à 30% de la valeur saturante. La concentration en biomasse atteint  $5 \text{ g.L}^{-1}$  lorsque les commandes d'alimentation et de soutirage sont démarrées.

L'alimentation en milieu stérile est assurée par une pompe péristaltique reliant le réacteur à un bidon sur peson. Le bioréacteur est également sur peson permettant la régulation du débit de soutirage de façon à maintenir un poids constant. Le bidon d'alimentation est continuellement agité et contient le milieu minéral, vitamines et oligo-éléments compris, et  $33.2 \text{ g.L}^{-1}$  de xylose.

Trois régimes sont appliqués durant l'expérience, chacun caractérisé par un régime permanent. Les débits d'alimentation imposés sont  $0.642 \text{ mL.min}^{-1}$  pour les deux premiers régimes et  $1.288 \text{ mL.min}^{-1}$  pour le dernier régime. L'ensemble de l'expérience est réalisée à différents niveaux de limitation en  $O_2$  dissous qui sont détaillés dans le chapitre Résultats.

### **2.3.2. Culture discontinue alimentée**

La culture discontinue alimentée ou « Fed batch » est caractérisée par une alimentation en milieu ou en substrats sans soutirage du milieu réactionnel. Ce système est donc caractérisé par une variation du volume fonction du débit d'alimentation entraînant une dilution des composés du milieu.

Les réacteurs (B. Braun Biotech Sartorius®) sont des cuves de 5 L contenant initialement 3 L de milieu pilotés par le logiciel MFCS/win2.0. Ils sont équipés de mesures en ligne du pH, de la température, de la pression partielle en oxygène et de l'analyse des gaz.

La concentration en xylose initialement présente dans le fermenteur est de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . Lorsque que la concentration en xylose résiduel est proche de  $0 \text{ g.L}^{-1}$ , une solution concentrée de xylose de l'ordre de 600 g/L, peut être apportée de deux façons : par pulses (une quantité de sucre est apportée quasi-instantanément) ou en continu (la solution est transférée dans le fermenteur selon un débit imposé). Lorsque le volume de milieu dépasse 4.5 L, le milieu réactionnel est soutiré stérilement et le volume soutiré est mesuré.

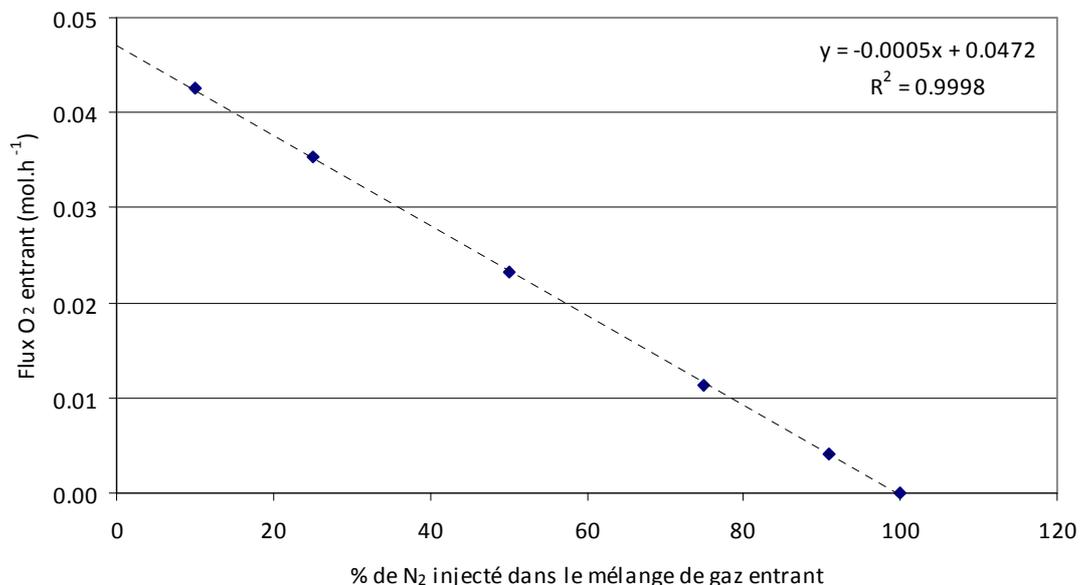
Les cultures discontinues alimentées sont réalisées en deux phases : une première phase aérobie est imposée permettant d'obtenir une biomasse d'environ de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  ; les conditions

de la seconde phase varient en fonction des expérimentations détaillées dans le chapitre Résultats.

### 2.3.3. Apport d'oxygène

L'oxygène est apporté par barbotage d'air dans le milieu de culture via un sparger. Le débit d'entrée est géré et mesuré par un débitmètre massique. La composition de l'air d'entrée et de sortie est analysée par spectrométrie de masse et la mesure de l'oxygène dissous est réalisée par une sonde ampérométrique (cf. 2.4.6 pour la partie analytique et 2.5.2 pour la partie calcul). Dans l'expérience en mode continu, l'air entrant a été appauvri en  $O_2$  en réalisant un mélange Air+Azote suivant la corrélation de la Figure 17.

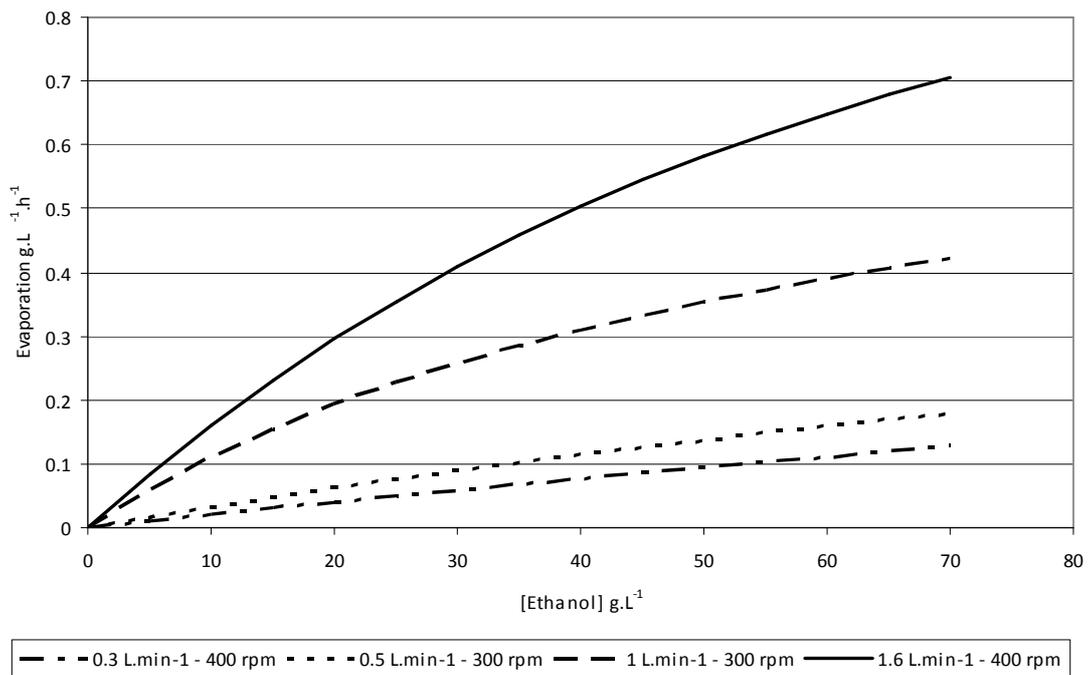
Cet étalonnage a été réalisé en maquette froide. Le flux d' $O_2$  entrant a été calculé à partir du bilan matière de l' $O_2$ , des mesures de  $pO_2$  et de pourcentage d' $O_2$  dans les gaz de sortie pour différents pourcentages de  $N_2$  dans les gaz entrant. La pression partielle d'oxygène dissous ( $pO_2$ ) est mesurée par la sonde en pourcentage par rapport à la saturation (100% - air).



**Figure 17. Relation entre le flux d'oxygène entrant et le pourcentage d'azote dans le mélange de gaz entrant.**

### 2.3.4. Évaluation de l'évaporation

Au cours des fermentations alcooliques, une quantité importante d'éthanol peut s'évaporer, en fonction de l'efficacité du condenseur. Afin de quantifier la perte d'éthanol et de prendre en compte cette production dans les bilans et les cinétiques, des expériences d'évaporation en milieu abiotique sont réalisées. Le réacteur utilisé lors des expériences contient le milieu salin et  $70 \text{ g.L}^{-1}$  d'éthanol et plusieurs couples aération/agitation sont imposés. La cinétique de diminution de la concentration en éthanol dans le milieu est mesurée. Le condenseur installé sur le réacteur est refroidi par un flux d'eau froide à une température d'environ  $15^\circ\text{C}$ . Les cinétiques d'évaporation sont décrites dans la Figure 18. Les vitesses de production d'éthanol sont corrigées en ajoutant la fraction d'éthanol évaporée.



**Figure 18.** Evolution de la vitesse d'évaporation de l'éthanol en fonction de la concentration en éthanol et du couple aération/agitation dans un réacteur 5L dans les conditions décrites ci-dessus.

## **2.4. Méthodes analytiques**

### **2.4.1. Prélèvement des échantillons de culture**

Les prélèvements d'échantillon des culture sont effectués en soutirant un volume connu du milieu de culture avec une seringue. Une partie de l'échantillon sert à la mesure de la biomasse, l'autre partie sert au dosage des composés du milieu et à la mesure de viabilité. Les échantillons sont centrifugés 3 minutes à 12 000 g pour séparer les cellules du milieu de culture. Le surnageant est ensuite filtré (0,45 µm) et éventuellement dilué pour être dosé tandis que le culot est re-suspendu dans un tampon pour la mesure de viabilité.

### **2.4.2. Mesure de la biomasse**

La concentration en biomasse est mesurée par trois méthodes différentes : par mesure turbidimétrique (Densité Optique), par mesure gravimétrique et par comptage en cytométrie en flux.

La concentration en biomasse est mesurée par spectrophotométrie (Hach Lange® DR 3900) à 620 nm dans une cuve de 2 mm de trajet optique, la suspension peut être préalablement diluée avec de l'eau distillée pour que la densité optique soit comprise entre 0,200 et 0,800 unité d'absorbance (zone de linéarité du spectrophotomètre).

La matière sèche est obtenue après filtration d'un volume connu de suspension cellulaire sur Sartolon 0,45 µm (SARTORIUS®). La membrane filtrante a été préalablement séchée et pesée. La suspension filtrée à l'aide d'une pompe à vide est rincée à l'eau distillée et séchée 48 h à 60°C dans une étuve sous vide (200 mm d'Hg). La différence de masse avant et après filtration permet de déterminer la masse sèche cellulaire en g.L<sup>-1</sup>.

Le cytomètre en flux permet d'obtenir la concentration cellulaire (événements/mL) par comptage direct des éléments en suspension dans le flux liquide.

La composition élémentaire de la biomasse est déterminée par le Service Central d'Analyse du CNRS (Solaize) par analyse des compositions en carbone, hydrogène, oxygène et azote et des

condres à partir de 10 échantillons lyophilisés provenant de cultures aérobies en tubes sur milieu riche. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le tableau ci-dessous. La masse molaire calculée est de  $26.7 \text{ g.Cmol}^{-1}$ .

**Tableau 9 Composition élémentaire de la biomasse**

	%	$\text{g.g}^{-1}\text{C}$
C	$41.6 \pm 0.3$	1
H	$6.4 \pm 0.1$	$1.86 \pm 0.03$
O	$33 \pm 1$	$0.60 \pm 0.02$
N	$9.0 \pm 0.1$	$0.184 \pm 0.003$
P	2.1	0.019
S	0.17	0.0015

### 2.4.3. Dosages des sucres et produits de fermentation

Les composés sont dosés en chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur une colonne  $\text{H}^+$  dans les conditions décrites dans le Tableau 10.

Les métabolites recherchés sont : le xylose, le xylitol, l'éthanol, le glycérol, l'acide acétique, l'acide succinique et l'acide pyruvique. Ces composés ont fait l'objet d'un étalonnage préalable réalisé à partir de solutions standards contenant les différents composés dans des gammes de concentrations déterminées. Le surnageant des échantillons, éventuellement dilué, est contenu dans des vials scellés par un septum.

**Tableau 10. Condition opératoires d'analyse par HPLC**

Température du four	50 °C
Eluant	$\text{H}_2\text{SO}_4$ à $5.10^{-3}$ M
Débit de la phase mobile	0,5 mL/minute
Durée d'analyse	30 minutes
Régime	isocratique
Volume d'échantillon injecté	20 $\mu\text{L}$

L'appareil utilisé est un chromatographe (Waters<sup>®</sup>, Alliance 2690) équipé d'un réfractomètre (Shodex<sup>®</sup>, RI 101) et d'un détecteur Ultra-violet (Waters<sup>®</sup>). La colonne est une résine  $\text{H}^+$

Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm). L'acquisition et le traitement des données s'effectuent via le logiciel Millennium®.

Lors de cette méthode, certains composés sont co-élus (Tableau 11). L'utilisation des deux détecteurs et d'une gamme d'étalonnage spécifique permet d'obtenir l'aire de chaque composé malgré la co-élution.

**Tableau 11. Temps de rétention et détection des métabolites dosés par HPLC**

Composé	Temps de rétention	Détection	Co-élution
Glucose	11.44	Détecteur RI	
Acide pyruvique	11.69	Détecteur UV	Xylose
Xylose	12.22	Détecteur RI	Acide pyruvique
Xylitol	14.21	Détecteur RI	Acide succinique
Acide succinique	14.37	Détecteur UV	Xylitol
Glycérol	16.68	Détecteur RI	
Acide acétique	18.38	Détecteur UV	
Ethanol	26.23	Détecteur RI	

Les composés concernés par la co-élution sont donc le xylose et le xylitol co-élus avec l'acide pyruvique et l'acide succinique respectivement. Le xylose et le xylitol ne sont pas détectés en UV, en revanche les acides sont détectés par réfractométrie. Par conséquent, l'aire détectée en RI ( $A_{RI}$ ) est la somme des aires de réponse du xylose et de l'acide pyruvique, mais l'aire détectée en UV correspond uniquement à la réponse de l'acide pyruvique. La gamme des solutions étalons contient : 4 standards contenant des concentrations connues de glucose, xylose, éthanol, glycérol, xylitol et des trois acides et 3 standards contenant l'acide pyruvique et l'acide succinique uniquement. Grâce aux droites d'étalonnage ( $C = k \cdot A$ ), les constantes de réponses ( $k$ ) de chaque composé sont connues et les concentrations de métabolites co-élus peuvent être calculées par la méthode suivante :

$$A_{RI} = A_{RI}^{xylose} + A_{RI}^{pyruvate}$$

$$A_{UV} = A_{UV}^{pyruvate}$$

$$C^{pyruvate} = k_{UV}^{pyruvate} \cdot A_{UV}^{pyruvate} = k_{RI}^{pyruvate} \cdot A_{RI}^{pyruvate}$$

$$C^{xylose} = k_{RI}^{xylose} \cdot A_{RI}^{xylose}$$

$$\text{Donc, } C^{\text{xylose}} = k_{RI}^{\text{xylose}} \cdot \left( A_{RI} - \frac{C^{\text{pyruvate}}}{k_{RI}^{\text{pyruvate}}} \right)$$

Le raisonnement est identique pour la co-élution du xylitol et de l'acide succinique. La gamme de standards est évaluée très régulièrement pour s'assurer de la justesse des mesures.

#### 2.4.4. Dosage du xylose extracellulaire

En cours de fermentation, un dosage rapide du xylose résiduel est nécessaire. La mesure du xylose par HPLC est longue et, par conséquent, inappropriée pour le calcul rapide des quantités de xylose à apporter. La concentration en xylose est donc mesurée par un analyseur automatique YSI 2700 SELECT (YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS®), il s'agit d'une électrode de platine sur laquelle est fixée une membrane à enzymes immobilisées. La réaction enzymatique est la suivante :

XYLOSE + O<sub>2</sub> = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + COPRODUIT via une pyranose oxydase

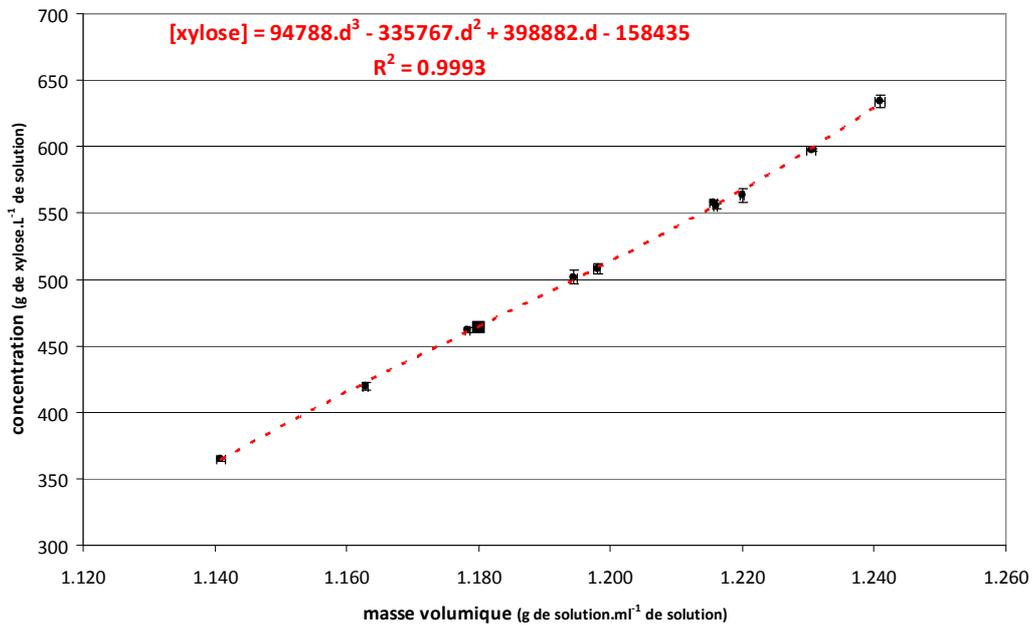
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = O<sub>2</sub> + 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup> sur l'électrode de platine

Le flux d'électrons est alors proportionnel à la concentration en xylose et transformé en signal.

La précision du résultat est de l'ordre de ± 10 %.

#### 2.4.5. Dosage des solutions de xylose

Durant les cultures en mode discontinu alimenté, le xylose est apporté par ajout de solutions concentrées (cf. page 85). Pour déterminer la concentration de ces solutions, une relation entre la masse volumique et la concentration est utilisée. La masse volumique est mesurée soit par pesée d'un volume connu de solution, soit par un densimètre (DE40 density Meters, Mettler Toledo). La corrélation est présentée en Figure 19. La limite de solubilité du xylose est d'environ 700 g.L<sup>-1</sup> dans l'eau à environ 90°C et de 100 g.L<sup>-1</sup> à température ambiante. Les solutions préparées pour les expériences étaient à une concentration comprise entre 500 et 600 g.L<sup>-1</sup>.



**Figure 19.** Corrélation concentration = f(densité) obtenue expérimentalement pour le xylose

#### 2.4.6. Mesure des gaz

Deux méthodes ont été utilisées pour l'analyse des gaz : spectrométrie de masse ou mesure acoustique.

Le spectromètre de masse (Proline Dycor, AMETEK PROCES INSTRUMENT®) mesure les rapports masse sur charge (m/z) de molécules ionisées et de leurs produits de fragmentations. Un étalonnage permet de relier l'aire des pics obtenus à la concentration de cette molécule dans le gaz.

La mesure acoustique est réalisée par un analyseur acoustique (INNOVA® 1313) qui permet de mesurer simultanément l'O<sub>2</sub> par analyse paramagnétique et le CO<sub>2</sub> par spectroscopie infrarouge. L'étalonnage est réalisé à partir d'un mélange de gaz standardisé (5% CO<sub>2</sub> – 10% O<sub>2</sub> – QSP N<sub>2</sub>).

La composition des gaz de fermentation est ainsi déterminée en temps réel. La vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> et la vitesse de production de CO<sub>2</sub> sont calculées par bilan matière à partir de la différence entre la composition gazeuse en entrée et en sortie du fermenteur, en prenant

en compte les variations du volume du liquide (mode discontinu alimenté), le débit d'entrée d'air, la température et la pression.

#### **2.4.7. Mesure de l'activité métabolique et de la perméabilité cellulaire**

La mesure de l'activité métabolique et de la perméabilité membranaire des cellules au cours de la fermentation est réalisée par cytométrie en flux. La méthode mise au point au cours de ces travaux de thèse permet d'obtenir les concentrations de cellules actives et perméables lors des expériences. Cette méthode est rédigée sous forme de publication parue dans *Journal of Microbiological Methods* (Monthéard *et al.*, 2012).

Cette méthode repose sur l'utilisation de deux marqueurs fluorescents : l'iodure de propidium (IP) et le carboxyfluorescéine diacétate acétométhylester (cFDA, AM).

L'IP pénètre exclusivement dans les cellules dont la membrane est endommagée (Deere, 1998) et poreuse, se fixe sur les bases azotées et émet à un maximum de 635 nm, il est considéré comme marqueur des cellules stressées et mortes. Le cFDA franchit la membrane cellulaire d'autant plus facilement qu'il est lié à un groupement acétométhylester. Il est ensuite pris en charge par les estérases non spécifiques de la cellule, il est alors chargé et émet une fluorescence à 510 nm dans le vert (Hernlem, 2010 ; Molecular Probes). Cette fluorescence est dégressive car les estérases expulsent le cFDA hors de la cellule progressivement (Bouix, 2001). Le cFDA marque donc les cellules métaboliquement actives.

Dans un premier temps, l'utilisation des marqueurs fluorescents est validée sur la souche *C. shehatae*, puis dans un second temps des concentrations différentes en fluorochromes et différents temps d'incubation sont testés afin de déterminer les conditions optimales de marquage. La troisième partie consiste à évaluer la fiabilité de la méthode, en étudiant les interférences physiologiques entre les marqueurs fluorescents et les cellules puis en validant la répétabilité et la pertinence des résultats obtenus.

Le protocole définitif retenu est le suivant :

- Lavage du culot cellulaire à deux reprises dans du tampon McIlvaine (100 mM d'acide citrique et 200 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 4)

- Ajout de  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  de solution de cFDA (solution commerciale à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de cFDA dans du DMSO dilué au 1/3 dans du Pluronic®) et  $8 \text{ mg.L}^{-1}$  d'IP (solution commerciale à  $1 \text{ g.L}^{-1}$ )
- Incubation 10 min à  $40^\circ\text{C}$  et analyse immédiate de l'échantillon.



## Assessment of *Candida shehatae* viability by flow cytometry and fluorescent probes

Julie Monthéard\*, Sandy Garcier, Eric Lombard, Xavier Cameleyre, Stéphane Guillouet, Carole Molina-Jouve, Sandrine Alfenore

Université de Toulouse; INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France  
INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France  
CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 April 2012

Received in revised form 2 July 2012

Accepted 2 July 2012

Available online 14 July 2012

#### Keywords:

Activity

*Candida shehatae*

Flow cytometry

Fluorescence

### ABSTRACT

Quantification of different physiological states of *Candida shehatae* cells was performed by flow cytometry associated with two fluorescent probes. Propidium iodide and carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester fluorescent dyes were chosen based on data from the literature. A staining procedure, developed from the previous works was applied to the yeast. Then, the protocol was improved to fit with fermentation constraints such as no physiological interference between the staining procedure and the cells, shortest preparation time and small amounts of dyes. From this optimisation, propidium iodide was included in the sample at 8 mg/L whereas carboxyfluorescein was first diluted in Pluronic® agent and used at 3 mg/L, samples were incubated for 10 min at 40 °C. Repeatability and accuracy were evaluated to validate this flow cytometry procedure for viability determination.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Candida shehatae* is an interesting yeast for microbial ethanol production due to its natural capacity to consume xylose, a pentose sugar available in large quantities from lignocellulosic materials (Toivola et al., 1984). The maximum yield of ethanol production on xylose was 0.45 g·g<sup>-1</sup> (Slininger et al., 1985) whereas maximum ethanol titre reached was 48 g/L (Fromanger et al., 2010) which is much lower than that observed with *Saccharomyces cerevisiae* (140 g/L). The physiological behaviour of yeast towards high ethanol concentrations needs further investigation to identify the biological bottlenecks of ethanol production (Kastner et al., 1999). The decrease of cell viability has been well quantified during intensive ethanol production by *S. cerevisiae* (Alfenore et al., 2002; Sanchez-Gonzalez et al., 2009) and connected to loss of membrane integrity and troubles in metabolic activities (Villarino et al., 2000). Cell viability, defined as the ability of the cell to grow in optimal conditions (Postgate et al., 1961), can be evaluated by various methods such as the plate count technique which is long and tedious, microscopic counting using vital dyes and more recently, flow cytometry, with appropriate fluorescent stains. Flow cytometry has various advantages that make it a useful technique to quantify cell viability in various fields (Veal et al., 2000; Bouix and Leveau, 2001; Malacrinò et al., 2001; Van Zandycke et al., 2003; Hernlem and Hua, 2010). Many dyes exist to assess cell viability by various means, like oxonol, rhodamine, or propidium iodide. Some have been tested in *Candida* strains, like

propidium iodide which was tested in several *Candida* species including *C. parapsilosis*, *C. albicans* and *C. tropicalis* (Ramani et al., 1997) to evaluate the impact of antifungal drugs. FUN-1®, a fluorophore patented by Molecular Probes (Eugene, OR), was also used to quantify the antifungal sensitivity of several clinical *Candida* strains (Parisi-Duchêne et al., 2006). DiBAC4(3) was used on *Candida albicans* to understand the mechanism of action of an antifungal agent (Vale-Silva et al., 2006). Propidium iodide was easy to use and highly discriminative, labelling cells with a porous membrane (Deere et al., 1998). It was used on *S. cerevisiae* yeast in multi-fluorochrome tests to evaluate yeast viability (Deere et al., 1998). To label the metabolic activity of the yeasts we looked for another dye. We chose carboxyfluorescein diacetate (cFDA) which was tested by several authors (Bouchez et al., 2004; Papadimitriou et al., 2006) in the strain *Streptococcus macedonicus* under stress conditions. It interacted with intracellular non-specific esterases (Breeuwer et al., 1994) which indicate metabolic activity.

Previous works dealing with *Candida* species were mainly carried out in medical fields. Few studies have focused on the cultivation of the specific strain *C. shehatae* for ethanol production from xylose. As its major interest for lignocellulosic biofuel production has been recently mentioned (Gnansounou, 2010), the aim here was to quantify the different physiological states of a cell population, in terms of metabolic activity and membrane integrity, during ethanol fermentation of pentose to measure the yeast capacity of ethanol production. In this work, two probes already tested on other microorganisms were used with *C. shehatae* to discriminate sub-populations. The couple propidium iodide and cFDA was chosen for their ability to label membrane integrity and intracellular activity respectively as already done in mouse cells (Jones and Senft, 1985). This double labelling allowed us to classify the

\* Corresponding author at: Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.

E-mail address: [julie.montheard@insa-toulouse.fr](mailto:julie.montheard@insa-toulouse.fr) (J. Monthéard).

global population of *C. shehatae* into three sub-classes i.e. active cells (CFDA positive PI negative), damaged cells (both CFDA and PI positive) and dead cells (CFDA negative and PI positive).

The present work reports the development of the staining protocols optimising dye quantity and analysis time to obtain accurate and reproducible results. The preliminary step consisted of validating the staining by direct observation with epifluorescence microscopy, to verify that *C. shehatae* gives a fluorescence response for the different physiological states (active, damaged and dead) with the two selected markers. Then, the whole protocol was optimised.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strain and culture

*C. shehatae* strain ATCC 22984, a xylose fermenting yeast, was maintained on Plate Count Agar (PCA) (AES Chemunex), and its long-term storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  used Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium with 45% glycerol. Mineral medium for growth was supplemented with vitamins and oligo-elements as described by (Fromanger et al., 2010). Pre-culture grown on YPD (without glycerol) for 24 h at  $30^{\circ}\text{C}$ , stirred at 100 rpm was transferred to a flask containing mineral medium complemented with 20 g/L xylose. Flask cultures were grown for 24 h at  $30^{\circ}\text{C}$  under shaking at 100 rpm.

### 2.2. Heat treatment

Fresh cultures were harvested and warmed to  $70^{\circ}\text{C}$  for 10 min to kill cells. To assess treatment efficiency, 0.1 mL was plated on PCA and incubated for 48 h at  $30^{\circ}\text{C}$ . No Colony Forming Units were counted. Treated cells were used as “dead reference” and fresh cells were used as “live reference”.

### 2.3. Fluorescent stains

Commercial solutions of 5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester (cFDA) 10 g/L in dimethyl sulfoxide (DMSO), and propidium iodide (PI) 1 g/L in water were supplied by Molecular Probes, Oregon. They were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $4^{\circ}\text{C}$  respectively.

### 2.4. Initial staining procedure

Previous works guided firstly the preparation of the cFDA working solution. Some authors used acetone as diluent (Jones and Senft, 1985; Bouix and Leveau, 2001) and others used DMSO (Hernlem and Hua, 2010). Working solutions of cFDA were thus diluted in acetone and DMSO (30:70 (v/v) ratio) reaching 0.25 g/L cFDA. The other stain, PI was used directly from commercial solution to sample, (Hohenblum et al., 2003). Initial dye concentrations in the sample were 1 mg/L for PI and 2.5 mg/L for cFDA.

The cell suspension was washed twice in Mc Ilvaine buffer pH 4 (100 mM citric acid and 200 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Bouix and Leveau, 2001). Then the suspension was diluted in buffer to reach around  $10^6$  cells/mL. Stains and diluted cell suspensions were incubated for 15 min at  $40^{\circ}\text{C}$  and analysed immediately (Breeuwer et al., 1994).

### 2.5. Epifluorescence microscopy

Microscopic observations ensured that staining was efficient. Observations were made using an Olympus BH2-RFCA microscope equipped with two different sets of filters for green and red fluorescence (excitation 490 nm/emission 500 and excitation 545 nm/emission 590). Cells suspensions were stained with PI at 5 mg/L and cFDA at 5 mg/L diluted in an acetone:DMSO mix (30:70 v/v), and observed immediately.

### 2.6. Flow cytometry

Flow cytometry experiments were carried out using a Beckman Coulter Cell Lab Quanta™ SC MPL cytometer, equipped with a 488 nm laser, at 22 mW. Two sets of filters were used to quantify the two emitted fluorescence signals, a 525/20 nm BP filter for “green” fluorescence in channel FL1 and a 670/20 nm BP filter for “red” fluorescence in channel FL3. Hydraulic flow was set at 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  and the run volume was 150  $\mu\text{L}$ . Data of 50 000 events were collected and analysed by the CellLab Quanta Analysis Module. Flow speed and trigger threshold were assigned and the PM tubes were optimized with reference cells.

## 3. Results

The ability of both dyes to label *C. shehatae* cells was evaluated by microscopic observation. Experiments were carried out with the protocol described above (Section 2.4) to quantify the activity and physiological state of the *C. shehatae* growing on pentose substrate. Physiological observations led us to modify initial staining protocol. Finally, the accuracy and repeatability of the staining procedures were explored.

### 3.1. Validation of each marker by microscopic observations

Two references (dead cells and fresh cells) were stained and observed (see Fig. 1).

Comparing microscopic observation under episcopic illumination and white light indicated that the great majority of cells were stained by the dyes. It revealed that active *C. shehatae* possessed enzymes to express carboxyfluorescein fluorescence, and that signal was no longer measured in the absence of metabolic activity. PI can pass through the cell membrane when the cells were damaged by heat treatment. Three cell sub-populations were detected: dead cells giving a positive signal for PI and negative one for cFDA, active cells giving a cFDA positive signal alone and “stressed cells” defined as cells that exhibit

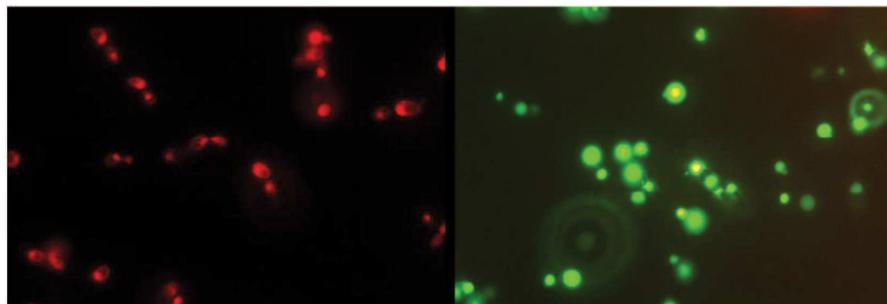


Fig. 1. Heat-treated dead cells (left) and active fresh cells (right) stained using the procedure described in Section 2.5. (Observation by fluorescent microscopy.)

positive signals for both PI and cFDA; those active cells have damaged membranes due to environmental stresses (Beney and Gervais, 2001).

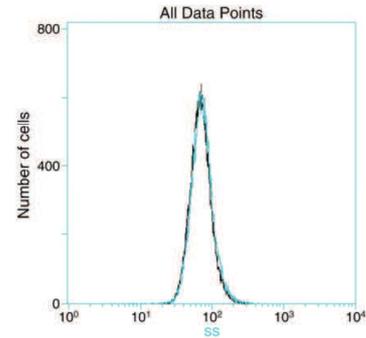
### 3.2. Evaluation of probable physiological interference

The first step was to extract cell signals from the cytometer background noise. Two signals are commonly used: side scatter (SS) and electronic volume (EV). SS is the amount of laser light scattered at about a 90° to the axis of the laser beam; this signal is proportional to the granularity of the cell that scattered the laser light. The EV is the signal produced as a particle passes through the flow cell resulting in an increased impedance to the current flow that is proportional to the volume of the particle. Due to the relatively small diameter of the yeast (roughly 3 µm), the EV is not sufficiently accurate to be used here: the discriminative parameter chosen was side scatter, which identified the cells clearly.

In order to use the double labelling method presented here to characterize the physiological state of *C. shehatae* under various culture conditions such as oxygen or substrate limitation, or with ethanol effect, no interference between the real physiological state of the cells and the staining method should occur. Other conditions for the method to be used were the minimisation of the duration of both sample preparation and incubation, and optimisation of the quantity of fluorochrome.

The impact of dye solutions on different physiological cell states was studied (Fig. 2). We focussed on SS (side scatter) values, which indicate the intracellular granularity of the cell population. SS was found to be linked to intracellular modifications caused by the staining treatment. Focusing on these SS values, the impact of the staining procedure was evaluated on cell suspensions at different ages. SS distributions of two samples were plotted (Fig. 2): one sample was stained (blue) and the other was not (black). As the culture aged from 8 h to 24 h, damage of the cell structure due to the staining treatment was observed with a decrease in the SS values. The maximum decrease in SS values was for the oldest culture (24 h) showed denaturing to be greatest. This effect was certainly due to toxic compounds such as acetone and DMSO in the staining solution which could modify the intracellular content of the cells.

Denaturation phenomena due to the dye solvent was not mentioned in previous works using acetone; this suggested that either it was not considered as an interference in their measurements or it was specific to the strain studied in the present work; nevertheless it may obviously be avoided. Thus, acetone in cFDA solutions was no longer used and the DMSO quantity reduced, according to the Molecular Probes recommendation, by using a dispersing agent called Pluronic® F-127. It acted like a cell loader for esters, such as cFDA acetoxyethyl ester, with non-toxic properties. Consequently, stock solutions of cFDA (10 g/L in DMSO) were diluted in Pluronic® agent till 3 g/L cFDA, and the final sample



**Fig. 3.** Number of cells versus SS value for a 24 h culture stained (blue) and unstained (black) with an improved protocol using Pluronic® cell loader. No physiological interference was detected. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

concentration reached 3 mg/L cFDA. The concentration of PI remained constant at 10 mg/L. DMSO was used to dissolve cFDA and was still present but in minimal amounts, less than 0.1% in the final sample. The comparison of experimental results with acetone and DMSO or Pluronic® and reduced amounts of DMSO is reported in Fig. 3.

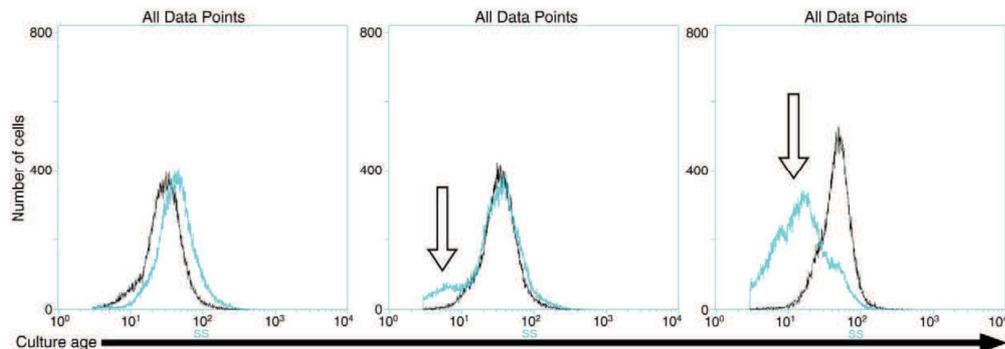
Fig. 3 shows a 24 h culture, the purple line representing an unstained sample and the blue line representing the same culture stained. Using Pluronic® and less DMSO maintained the cell structure and the two SS profiles were similar.

This improvement was confirmed by electronic volume (EV) profiles, which were independent of fluorescence, when the 24 h culture EV signal was compared according to the first protocol and the improved one (Fig. 4).

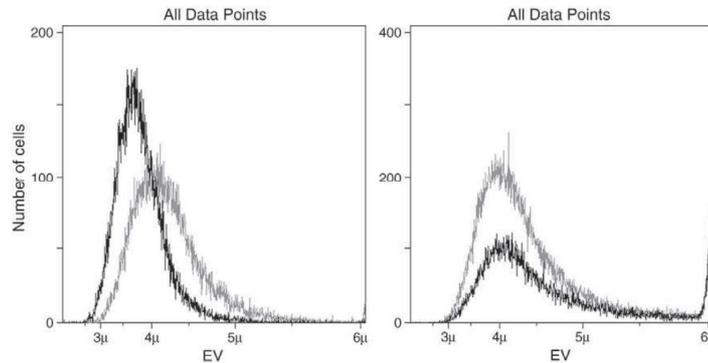
Concerning the modification of intracellular content, the use of acetone and DMSO in relatively large amounts led to a decrease of the cell population showing a stress effect. The use of Pluronic® agent protected the cells with no interference from morphological changes. Cytotoxicity decreased and staining procedure no longer damaged the cell structure.

### 3.3. Sample preparation optimisation

Based on the new staining procedure using Pluronic® as cFDA cell loader, the optimisation of the analysis protocol was based on the minimisation of sample preparation duration and stain quantity to optimise fluorescence intensity. For cFDA solutions, DMSO concentration in the sample had to be lower than 0.1% (v/v), so the cFDA



**Fig. 2.** Number of cells versus side scattering values. Comparison between stained (blue) and unstained (black) cells. The side scattering (SS) values of stained sample evolves as a function culture age (younger culture at left to older at right) whereas the SS values of unstained sample remain stable. The staining procedure had an impact on the physiological state. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



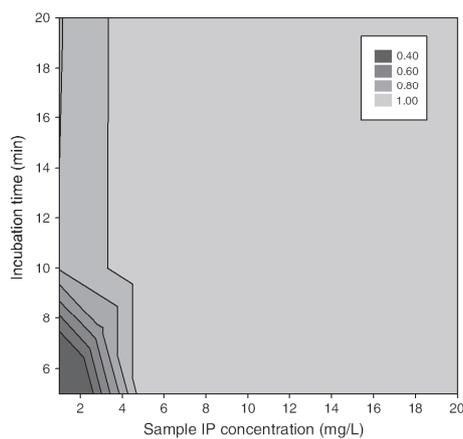
**Fig. 4.** Comparison between stained (black) and unstained (grey) cells electronic volume (EV) using the initial staining procedure with acetone and dimethyl sulfoxide (DMSO) (left) and the modified one using Pluronic® (right). The initial staining leads to a decrease in EV values of stained sample whereas the improved staining remains EV values constant.

concentration was maintained at 3 mg/L in the sample. Experiments focused on the influence of the dye concentration and the incubation duration on fluorescence responses as described in Table 1.

cFDA was tested on fresh culture used as live-cell reference whereas PI was used with heat-treated cells. With the cytometer, the number of cells expressing red or green fluorescence and the number of non-fluorescent cells were determined. When all the dead cells expressed red fluorescence or all the living cells expressed green fluorescence, the response was 1 and the couple incubation time-dye concentration was optimal. When some cells were not stained, appearing as non-fluorescent cells, the response decreased.

**Table 1**  
Experimental strategy for bath incubation time and concentration optimization.

Incubation duration at 40 °C	5 min	10 min	20 min
cFDA concentration (mg/L) on live cell suspension	3	3	3
PI concentration (mg/L) on dead cell suspension	1	1	1
	5	5	5
	10	10	10
	20	20	20



**Fig. 5.** PI concentration versus incubation duration. The response (grey scale) indicated the proportion of fluorescent events. The maximal fluorescence response was 1 (all cells labelled) for  $[PI]_{\text{sample}} > 6 \text{ mg/L}$ .

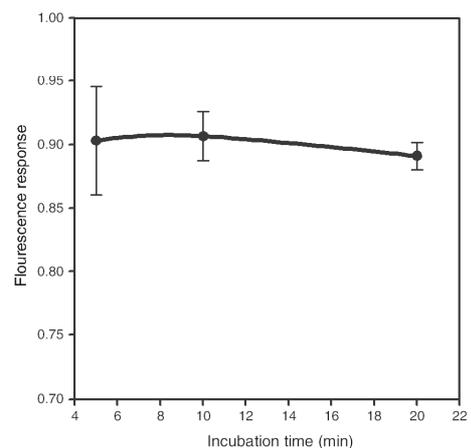
Concerning PI concentrations and the duration of incubation, Fig. 5 shows that all the dead cells were quantified when the PI concentration in the sample was higher than 5 mg/L whatever the duration of incubation. For lower PI concentrations, the higher the duration of incubation, the higher the labelling level without reaching 100% of the reference dead population.

For the concentration of cFDA used, the labelling level never reached 100% as shown in Fig. 6. It was chosen not to increase the cFDA concentration because this would increase the DMSO concentration and therefore cell damage. Consequently, the labelling level was  $92 \pm 2\%$  for active cells incubated for 10 min; unstained cells were subsequently not considered.

As a conclusion, the protocol used a final sample concentration of 8 mg/L PI, to remain well above the minimum concentration required, a concentration of 3 mg/L cFDA and an incubation duration reduced from 15 to 10 min at 40 °C.

3.4. Protocol validation

The repeatability of the protocol was assessed on an unknown sample: nine experiments were carried out, using the same cell suspension and the same dye solutions, by the same operator. Cytometer results are reported in Table 2.



**Fig. 6.** Fluorescence response versus incubation time for cFDA at 3 mg/L. Each duration point was repeated three times, standard deviation is indicated as error bars.

**Table 2**

Repeatability of the cytometer. The number of cells in each population is reported in the first three columns, then the total number of fluorescent cells is calculated and the results are expressed as a percentage. About 25000 events were counted for this evaluation.

Experiment n°	N° cell. cFDA+	N° cell. PI+	N° cell. PI+/cFDA+	N° cell. Non fluo	Total labelled cell.	% cell. cFDA+	% cell. PI+	% cell. PI+/cFDA+	Total
1	8754	12638	2689	636	24081	0.364	0.525	0.112	1.000
2	8566	12660	2793	730	24019	0.357	0.527	0.116	1.000
3	8824	12218	2196	1631	23238	0.380	0.526	0.095	1.000
4	9329	12685	2277	736	24291	0.384	0.522	0.094	1.000
5	9172	12676	2427	753	24275	0.378	0.522	0.100	1.000
6	8964	12485	2664	738	24113	0.372	0.518	0.110	1.000
7	9215	12652	2477	599	24344	0.379	0.520	0.102	1.000
8	8858	12724	2539	834	24121	0.367	0.528	0.105	1.000
9	8586	12731	2597	945	23914	0.359	0.532	0.109	1.000
Average	8919	12608	2518	845	24044	37.1%	52.4%	10.5%	100.0%
Standard deviation	273	163	195	312	332	1.0%	0.4%	0.8%	0.0%
Minimum	8566	12218	2196	599	23238	35.7%	51.8%	9.4%	100.0%
Maximum	9329	12731	2793	1631	24344	38.4%	53.2%	11.6%	100.0%
Delta	763	513	597	1032	1106	2.7%	1.5%	2.3%	0.0%
$m \pm$						0.8%	0.3%	0.6%	0.0%

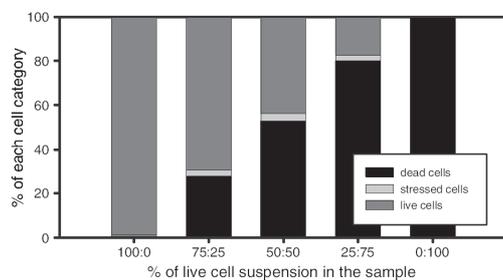
For any single sample, the maximum standard deviation of a given population was about 1%, revealing the good repeatability of the method. To save time and owing to the excellent repeatability, only one measurement could be performed during a bioreactor fermentation.

The accuracy of this novel staining technique was quantified using standard samples prepared by mixing known amounts of reference dead and active cells. The ratio varied between 0% and 100% v/v of active cell suspension and the corresponding 100% to 0% v/v dead cell suspension. The result for each sample was based on the number of cells counted in each of the three population areas and the total labelled cell number was calculated; then the percentage of dead, membrane damaged or active cells was calculated and is plotted in Fig. 7.

Only a few percent of double labelled cells were observed (less than 3%). For all the standards used, an accurate linear correlation can be obtained between the real sample content and results whether for active cells ( $R^2=0.993$ ) or for dead cells ( $R^2=0.997$ ), demonstrating the accuracy of the protocol.

#### 4. Discussion and conclusion

Flow cytometry allows accurate and reliable measurements of the physiological states of cells in many microbiology applications as described earlier (Davey and Kell, 1996; Deere et al., 1998; Veal et al., 2000). As it was proved that using two dyes improved confidence in results analysis (Hernlem and Hua, 2010), propidium iodide (PI) and carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester (cFDA) were used together to assess the physiological state of *S. macedonicus* (Papadimitriou et al., 2006) and mice cells (Jones and Senft, 1985). Then, based on these previous works, a new method was developed



**Fig. 7.** Population content of a known sample: (■) live cells, (■) dead cells, (■) stressed cells. The measured proportion of each population is a linear correlation with the known sample content.

here to quantify the viability of the yeast *C. shehatae* by double labelling with PI and cFDA. This paper focuses on the optimisation of the staining procedure to avoid any physiological interference and to reduce both the time of labelling and the dye concentrations. One original result was that Pluronic® was used successfully for the first time in reducing the toxicity of the dye solutions. Using Pluronic® avoids the degradation of the cell structures, leading to improved accuracy of the staining procedure which will be available for use in further studies on the effect of environmental stress on *Candida* yeasts. Both the repeatability and the accuracy of the method were quantified: a standard deviation lower than 1% ensured good repeatability and the accuracy of measurements was demonstrated when standard samples of known amounts of both dead and active cells were measured. (Attfield et al., 2000; Boyd et al., 2003; Doherty et al., 2010). To our knowledge, no similar work has been reported in the literature until now and this method is the first to quantify the cell viability in *C. shehatae*. Due to its accuracy and repeatability, further studies dealing with the impact of stresses such as ethanol on the physiological state of *C. shehatae* strains can now be carried out to improve processes of xylose fermentation.

#### Acknowledgments

This work was carried out as part of the FUTUROL PROJECT and the authors want to thank OSEO Innovation and INRA for financial supports and Dr P. Winterton for help in preparing the English manuscript.

#### References

- Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E., Uribelarrea, J.L., Goma, G., Benbadis, L., 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 67.
- Attfield, P.V., Kletsas, S., Veal, D.A., van Rooijen, R., Bell, P.J.L., 2000. Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermentation activity of dried yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 89, 207–214.
- Bene, L., Gervais, P., 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 34–42.
- Bouchez, J.C., Cornu, M., Danzart, M., Leveau, J.Y., Duchiron, F., Bouix, M., 2004. Physiological significance of the cytometric distribution of fluorescent yeasts after viability staining. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 520–530.
- Bouix, M., Leveau, J.Y., 2001. Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *J. Inst. Brew.* 107, 217–225.
- Boyd, A.R., Gunasekera, T.S., Attfield, P.V., Simic, K., Vincent, S.F., Veal, D.A., 2003. A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Res.* 3, 11–15.
- Breeuwer, P., Droccourt, J.L., Rombouts, F.M., Abee, T., 1994. Energy-dependent, carrier-mediated extrusion of carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1467–1472.
- Davey, H.M., Kell, D.B., 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* 60, 641–696.

- Deere, D., Shen, J., Vesey, G., Bell, P., Bissinger, P., Veal, D., 1998. Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. *Yeast* 14, 147–160.
- Doherty, S.B., Wang, L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Brodkorb, A., 2010. Use of viability staining in combination with flow cytometry for rapid viability assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG in complex protein matrices. *J. Microbiol. Methods* 82, 301–310.
- Fromanger, R., Guillouet, S.E., Uribelarrea, J.L., Molina-Jouve, C., Cameleyre, X., 2010. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 437–445.
- Gnansounou, E., 2010. Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: current situation and perspectives. *Bioresour. Technol.* 101, 4842–4850.
- Hernlem, B., Hua, S.-S., 2010. Dual fluorochrome flow cytometric assessment of yeast viability. *Curr. Microbiol.* 61, 57–63.
- Hohenblum, H., Borth, N., Mattanovich, D., 2003. Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. *J. Biotechnol.* 102, 281–290.
- Jones, K.H., Senft, J.A., 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 77–79.
- Kastner, J.R., Jones, W.J., Roberts, R.S., 1999. Oxygen starvation induces cell death in *Candida shehatae* fermentations of D-xylose, but not D-glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 780–785.
- Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S., Dellaglio, F., 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 45, 127–134.
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D., Tsakalidou, E., 2006. Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 197–205.
- Parisi-Duchêne, E., Reibel, C., Grawey, I., Heller, R., Mazurier, I., de Briel, D.A., Moskovtchenko, P., 2006. Rapid antifungal susceptibility testing of fluconazole and amphotericin B by flow cytometry using FUN-1®: a preliminary study. *J. Med. Mycol.* 16, 126–133.
- Postgate, J.R., Crumpton, J.E., Hunter, J.R., 1961. The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *J. Gen. Microbiol.* 24, 15–24.
- Ramani, R., Ramani, A., Wong, S.J., 1997. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2320–2324.
- Sanchez-Gonzalez, Y., Cameleyre, X., Molina-Jouve, C., Goma, G., Alfenore, S., 2009. Dynamic microbial response under ethanol stress to monitor *Saccharomyces cerevisiae* activity in different initial physiological states. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32, 459–467.
- Slininger, P.J., Bothast, R.J., Okos, M.R., Ladisch, M.R., 1985. Comparative evaluation of ethanol production by xylose fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnol. Lett.* 7, 431–436.
- Toivola, A., Yarrow, D., Van Den Bosch, E., Van Dijken, J.P., Scheffers, W.A., 1984. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1221–1223.
- Vale-Silva, L.A., Buchta, V., Vokurková, D., Pour, M., 2006. Investigation of the mechanism of action of 3-(4-bromophenyl)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-one against *Candida albicans* by flow cytometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 2492–2495.
- Van Zandycke, S.M., Simal, O., Gualdoni, S., Smart, K.A., 2003. Determination of yeast viability using fluorophores. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61, 15–22.
- Veal, D.A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., Attfield, P.V., 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Methods* 243, 191–210.
- Villarino, A., Bouvet, O.M.M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., Grimont, P.A.D., 2000. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Res. Microbiol.* 151, 755–768.

## 2.5. Traitement des données

Le traitement des données est basé sur les bilans matière à l'échelle du réacteur : accumulation = entrée - sortie + vitesse de production – vitesse de consommation. Les bilans carbone et redox sont calculés et doivent être recouverts. Afin de recouvrir les bilans carbone et d'oxydoréduction, un logiciel de réconciliation est utilisé.

### 2.5.1. Calcul des vitesses des métabolites en solution

La vitesse d'accumulation est égale à :  $\frac{d(CV)}{dt} = Q_E \cdot C_E - Q_S \cdot C + rC \cdot V$

Avec :

- $rC$  : vitesse nette de production/consommation de C (g de C.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Lorsque le composé est produit, la vitesse est positive, et lorsque qu'il est consommé, elle est négative.
- $Q_E$  : débit d'entrée (L.h<sup>-1</sup>).
- $Q_S$  : débit de sortie (L.h<sup>-1</sup>).
- $V$  : volume de milieu réactionnel (L).
- $C_E$  : concentration du composé dans le milieu d'alimentation (g.L<sup>-1</sup>).
- $C$  : concentration du composé dans le milieu réactionnel (g.L<sup>-1</sup>).

Pour obtenir la vitesse nette de consommation ou de production d'un métabolite C, les relations suivantes sont utilisées :

$$C \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dC}{dt} = Q_E \cdot C_E - Q_S \cdot C + rC \cdot V$$

$$\frac{C}{V} \cdot \frac{dV}{dt} + \frac{dC}{dt} = \frac{Q_E}{V} \cdot C_E - \frac{Q_S}{V} \cdot C + rC$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{Q_E}{V} \cdot C_E - \frac{Q_S}{V} \cdot C + rC - \frac{C}{V} \cdot \frac{dV}{dt}$$

En mode discontinu alimenté, des variations de concentrations liées aux variations de volume au cours du temps nécessite de raisonner sur les masses des variables d'états du système réactionnel.

La vitesse de consommation ou production d'un métabolite C est alors :

$$rC = \frac{1}{V}(Q_S.C - Q_E.C_E + \frac{d(V.C)}{dt})$$

$$rC = \frac{Q}{V}(C - C_E) + \frac{1}{V} \cdot \frac{d(V.C)}{dt}$$

En mode continu le volume de milieu est constant ( $Q_E = Q_S$ ) et il est possible de raisonner sur les concentrations des variables d'états du système réactionnel. Le milieu d'alimentation ne contient pas les produits d'intérêt ( $P_E = 0$ ) mais contient les substrats ( $S_E > 0$ ).

Le bilan matière pour les produits :  $rP = \frac{dP}{dt} + D.P$

Le bilan matière pour les substrats :  $rS = \frac{dS}{dt} + D(S - S_E)$

Avec  $D$  : taux de dilution ( $h^{-1}$ ),  $D = \frac{Q}{V}$ ,  $rS < 0$  (g de substrat. $L^{-1}.h^{-1}$ ) et  $rP > 0$  (g de produit. $L^{-1}.h^{-1}$ )

Lorsque le régime permanent est atteint, le terme d'accumulation  $\left(\frac{dC}{dt}\right)$  devient négligeable et les bilans sont simplifiés :  $rC = D(C - C_E)$ .

Les vitesses spécifiques sont calculées à partir des vitesses nettes :  $qC = \frac{rC}{X}$

- $qC$  : vitesse spécifique de production/consommation du composé (gC.g de biomasse $^{-1}.h^{-1}$  ou molC.g de biomasse $^{-1}.h^{-1}$ )
- $X$  : masse de biomasse à l'instant  $t$  (g)

### 2.5.2. Calcul des vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> et de production de CO<sub>2</sub>

Lorsque le milieu de culture est aéré, le bilan matière suivant peut être établi :

Gaz consommé/produit = Entrée – Sortie + Accumulation

Pour un composé C gazeux :

$$rC = \frac{Q_E \cdot \%C_E - Q_S \cdot \%C_S}{V_m} + \frac{d(V_{\text{gaz}} \cdot \%C_S)}{dt} + \frac{d(V_{\text{liquide}} \cdot [C_{\text{dissous}}])}{dt}$$

Avec :

- $rC$  : vitesse nette de production/consommation de C (mol de C.h<sup>-1</sup>). Lorsque le composé est produit, la vitesse est positive, et lorsque qu'il est consommé, elle est négative.
- $Q_E$  : débit de gaz entrant (L.h<sup>-1</sup>) mesuré par le débitmètre en entrée du réacteur.
- $Q_S$  : débit de gaz sortant (L.h<sup>-1</sup>) calculé par rapport à l'azote, selon l'hypothèse que l'azote n'est ni consommé, ni produit au cours de la réaction biologique et peu soluble dans la phase liquide :

$$Q_S = \frac{Q_E \cdot \%N_{2,E} - \frac{d(V_{\text{gaz}} \cdot \%N_{2,S})}{dt}}{\%N_{2,S}}$$

- $\%C_E$  et  $\%C_S$  : pourcentage volumique de C mesuré dans la phase gazeuse en entrée (E) ou sortie (S) de réacteur.
- $V_{\text{gaz}}$  : volume du ciel gazeux dans le réacteur (L).
- $V_m$  : volume molaire à la température de travail (L.mol<sup>-1</sup>).
- $[C_{\text{dissous}}]$  : concentration en C dans la phase liquide (mol.L<sup>-1</sup>).

### 2.5.3. Rendements globaux et instantanés

Les rendements instantanés correspondent à un rendement à un temps donné tandis que les rendements globaux correspondent à un rendement moyen sur une durée déterminée. Le

rendement par rapport au substrat s'exprime comme :  $Y_{C/S} = \frac{rC}{rS}$ . Les rendements peuvent

être exprimés en g de produit.g<sup>-1</sup> de substrat ou en Cmol de produit. Cmol<sup>-1</sup> de substrat. Dans

ce dernier cas, la somme des rendements est égale à 1 et chaque rendement représente la part d'un produit dans la distribution carbonée du substrat.

#### 2.5.4. Lissage

Les résultats expérimentaux sont traités à l'aide d'un logiciel (LIREC) développé par l'équipe FAME qui permet d'obtenir les vitesses nettes lissées et réconciliées. A partir des données discrètes en fonction du temps, le logiciel LIREC interpole des données continues en faisant passer une succession de polynômes par un certain nombre de points expérimentaux. Les paramètres tels que le degré des polynômes (3 ou 4) ou le nombre de points expérimentaux de la fenêtre glissante sont réglables. Les variables sont traitées indépendamment les unes des autres. Cette étape de lissage permet d'obtenir un ensemble de polynômes décrivant les évolutions réelles des masses des différents métabolites au cours du temps et de déterminer les vitesses de réactions (dérivée des polynômes en fonction du temps).

#### 2.5.5. Bilans carbonés et élémentaires

Grâce à la formule élémentaire de chaque composé (Tableau 12), il est possible de calculer son degré de réduction et de calculer la masse molaire d'une Cmole (masse molaire du composé ramené à une mole de carbone). Le degré de réduction élémentaire généralisé est posé de la façon suivante :

$\gamma_N$	$\gamma_O$	$\gamma_H$	$\gamma_C$
-3	-2	1	4

$\gamma_{NH_3} = 0$	$3 \times \gamma_H + \gamma_N = 0$
$\gamma_{H_2O} = 0$	$2 \times \gamma_H + \gamma_O = 0$
$\gamma_{CO_2} = 0$	$2 \times \gamma_O + \gamma_C = 0$

**Tableau 12** Formules brutes, formules élémentaires, masses molaires et degrés de réduction des composés intervenants dans les calculs de bilan.

Métabolites	Formule brute	Formule élémentaire				Masse Cmolaire (g.Cmol <sup>-1</sup> )	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	degré de réduction
		C	H	O	N			
Acétate	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1	2	1	0	30	60	4
Biomasse	CH <sub>1.9</sub> O <sub>0.6</sub> N <sub>0.2</sub>	1	1.86	0.6	0.18	26.68	-	4.11
CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	1	0	2	0	44	44	0
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	1	3	0.5	0	23	46	6
Glycérol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	1	2.67	1	0	30.67	92.1	4.67
O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	0	0	2	0		32	-4
Pyruvate	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1	1.33	1	0	29.3	88	3.33
Succinate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	1	1.5	1	0	29.5	118.1	3.5
Xylitol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	1	2.6	1	0	30.4	152.1	4.66
Xylose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1	2	1	0	30	150.1	4

Les bilans reposent sur la loi de conservation de la matière, appliquée à chaque élément ou degré de réduction.

$$\text{Bilan carbone : } \sum_{i=1}^n r_i = \sum_{j=1}^m r_j$$

$$\text{Bilan d'oxydo-réduction : } \sum_{i=1}^n \gamma_i r_i = \sum_{j=1}^m \gamma_j r_j$$

Avec  $r_i$  et  $r_j$  : vitesses en valeur absolues de consommation de substrat et de production de produit respectivement. Les bilans carbone et d'oxydo-réduction sont vérifiés pour chaque expérimentation et le recouvrement est détaillé dans la partie Résultats.

### 2.5.6. Réconciliation des données

Les vitesses obtenues via le lissage sont analysées par une méthode de réconciliation basée sur le recouvrement des bilans carbone et d'oxydo-réduction. Il est aussi possible de recalculer une vitesse à partir des vitesses des autres composés. Les formules élémentaires (Tableau 12) des métabolites permettent de calculer les bilans sur les éléments pris en compte (CHON). Pour chaque point expérimental, la meilleure estimation des vitesses réactionnelles est calculée sur la base de la vérification des bilans élémentaires. Cette estimation est obtenue par la minimisation de l'erreur sur l'ensemble des mesures. Les vitesses réactionnelles sont recalculées et les bilans carbone et d'oxydo-réduction sont recouverts à 100% point par point. Les masses consommées et produites sont recalculées par intégration des vitesses.

---

# CHAPITRE 3 :

# MODÉLISATION DU RÉSEAU MÉTABOLIQUE

---

## Chapitre 3. Modélisation du réseau métabolique

---

Comme l'état de l'art a permis de le dégager, l'oxygène affecte fortement le métabolisme de *C. shehatae* dont ses capacités à produire de l'éthanol par conversion du xylose (DuPreez & van der Walt, 1983; Fromanger *et al.*, 2010; Furlan *et al.*, 1994; Ligthelm *et al.*, 1988a; Sánchez *et al.*, 1997). La quantification des besoins en oxygène et le mécanisme de régulation de la transition respiro-fermentaire nécessitent des investigations complémentaires. L'oxygène exerce un rôle déterminant dans l'équilibre oxydo réductif de par son rôle d'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire, participant ainsi au recyclage du pouvoir réducteur. La demande en pouvoir réducteur est liée aux chemins métaboliques impliqués dans les phases de croissance et de production d'éthanol (Bruinenberg *et al.*, 1983a). L'approche développée dans ce chapitre est une approche de modélisation métabolique des réactions biochimiques intracellulaires de *C. shehatae* contribuant aux productions de métabolites extracellulaires d'intérêt (biomasse, éthanol, autres co-métabolites). Le modèle vise à décrire les voies métaboliques de consommation de substrat, de synthèse de la biomasse, de consommation/production d'énergie et de production de métabolites. La résolution du modèle doit permettre de cartographier en fonction des conditions opératoires la répartition du carbone en intégrant des considérations sur l'équilibre oxydo-réductif et énergétique.

Ce modèle, basé sur les travaux de Bideaux (2000; 2006; 2008) doit également permettre d'améliorer la compréhension du rôle des substrats xylose et oxygène sur le métabolisme de la levure *C. shehatae* à partir du calcul de la distribution du flux de carbone.

Dans un premier temps, l'ensemble des étapes de construction de deux modèles métaboliques est détaillé. Ces modèles sont ensuite validés par comparaison des données (*i.e.* vitesses) calculées avec les données expérimentales. Les résultats obtenus ne permettant pas de discriminer un modèle par rapport à l'autre, seul un des deux modèles (modèle dit éthanol) est utilisé pour le calcul des rendements théoriques limites de croissance et production de la souche sur xylose et pour la déduction des conditions expérimentales optimisant le rendement de conversion du xylose en éthanol en culture continue.

La seconde partie de ce chapitre présentent des résultats obtenus par simulation à partir des deux modèles et une discussion sur les phénomènes d'oxydo-réduction en lien avec la dualité des cofacteurs de la xylose réductase (NADH et NADPH dépendante).

### 3.1. Rappel du principe des modèles MFA

Les modèles de type Analyse de flux métabolique (MFA) sont basés uniquement sur la stœchiométrie des réactions biochimiques et sur les lois de conservation de la matière et d'action de masse en considérant la cellule en état quasi-stationnaire (Llaneras & Pici, 2008). Ils permettent de décrire la distribution des flux de carbone à l'intérieur de la cellule et l'influence de chaque voie métabolique sur cette distribution, d'identifier les points clés dans le réseau métabolique, de calculer les rendements maximaux théoriques, réaliser des bilans d'oxydo-réduction etc.

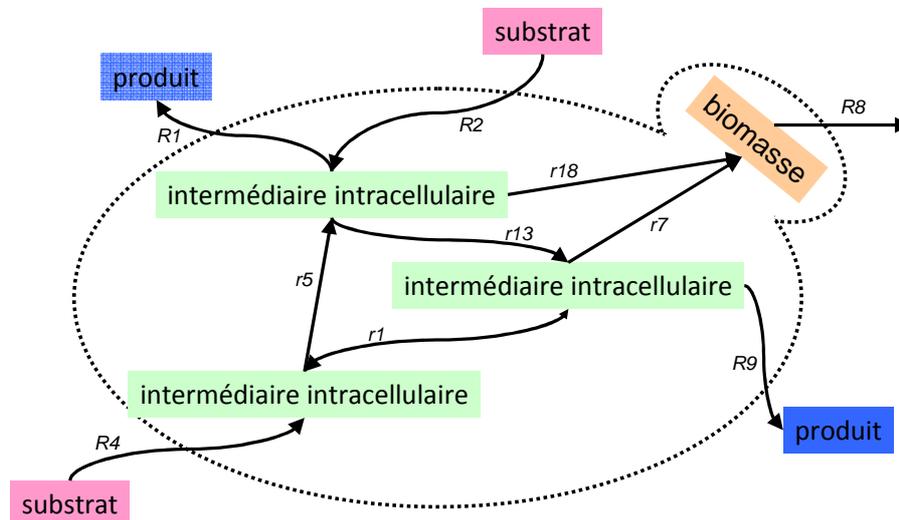
La construction des modèles est structurée selon cinq phases (Vanrolleghem & Heijnen, 1998):

- recueil de connaissances a priori sur le réseau métabolique et la construction d'un ou plusieurs modèles candidats. Les hypothèses de travail à ce niveau correspondent au choix des voies métaboliques qui seront insérées dans le modèle, choix des cofacteurs pour les enzymes, nécessité de compartimenter la cellule pour décrire sa complexité ou la localisation de certaines fonctionnalités.
- vérification du modèle a priori : observabilité et degré de liberté des modèles.
- estimation des paramètres inconnus du modèle par ajustement avec des données expérimentales.
- vérification du modèle identifié d'un point de vue biologique et thermodynamique.
- validation du modèle sur de nouvelles données expérimentales.

Quatre types d'espèces chimiques sont intégrées au modèle comme schématisé sur la Figure 20 :

- Les substrats, espèces présentes dans le milieu extracellulaire et qui sont consommées par le micro-organisme (source de carbone, d'azote, d'oxygène)
- Les produits, espèces excrétées dans le milieu extracellulaire issues du métabolisme (CO<sub>2</sub>, acides organiques, polyols...)
- La biomasse, qui résulte de l'anabolisme. La composition de la biomasse en macromolécules (lipides, protéines, carbohydrates...) peut être considérée variable en fonction de l'état physiologique.

- Les métabolites strictement intracellulaires (cytoplasmiques et/ou mitochondriaux) qui ne sont pas échangés avec le milieu de culture.



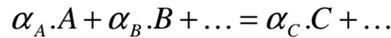
**Figure 20. Réseaux métaboliques et types de métabolites du système.**

La description complète d'un réseau métabolique nécessite de prendre en compte de très nombreuses réactions, des simplifications sont faites pour ne conserver que les principaux intermédiaires réactionnels situés à des « carrefours métaboliques » ou nœuds supposés majeurs dans le métabolisme. Des réactions linéaires consécutives sont alors regroupées en réaction unique et les réactions supposées avoir peu d'influence sur le système sont supprimées.

Ces modèles, basés sur la loi de conservation de la matière et sur l'hypothèse d'un état quasi-stationnaire à l'intérieur de la cellule, prennent également en compte l'équilibre du pouvoir d'oxydo-réduction et l'énergétique intracellulaire en intégrant dans les équations les cofacteurs enzymatiques  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ,  $\text{FAD}^+/\text{FADH}_2$  et les molécules énergétiques que sont l'ADP et l'ATP.

### 3.2. Formulation et écriture mathématique

Les réactions biochimiques sont écrites sous forme d'équation stœchiométrique de la forme :



Chaque métabolite est composé des 6 éléments suivants : carbone, oxygène, hydrogène, azote, phosphore et soufre (CHONPS). La formule du composé A peut être écrite sous la forme



La vitesse ( $r_i$ ) est positive lorsque la réaction  $i$  a lieu dans le sens d'écriture et négative dans le sens inverse. Les lettres symbolisent les métabolites et les coefficients stœchiométriques sont notés  $\alpha_{A_i}$ .

Pour exemple, la vitesse de consommation d'un métabolite A dans la réaction  $i$  peut s'écrire :



Ainsi, le réseau métabolique sera décrit par  $n$  réactions stœchiométriques mettant en jeu  $m$  métabolites dont  $k$  sont échangés avec l'extérieur.

La matrice stœchiométrique (S) représentant le système réactionnel comprend  $n$  colonnes et  $m$  lignes et contient les coefficients stœchiométriques des équations biochimiques :

$$\begin{bmatrix} \alpha_{1,1} & \dots & \alpha_{1,n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \alpha_{m,1} & \dots & \alpha_{m,n} \end{bmatrix}$$

Le bilan matière pour les différentes espèces chimiques est considéré et prend en compte l'ensemble des réactions productrices et consommatrices de l'espèce. De manière purement symbolique, la membrane cellulaire définit la limite du système pour l'écriture de ces bilans.

Certains métabolites sont échangés avec l'extérieur du système ( $k$  métabolites) via  $p$  réactions de transport. La matrice de transport (T) de taille  $p \times k$  associée à ces réactions s'écrit :

$$\begin{bmatrix} \alpha_{1,1} & \dots & \alpha_{1,p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \alpha_{k,1} & \dots & \alpha_{k,p} \end{bmatrix}$$

Le bilan matière à l'échelle du système « cellule » s'écrit donc :

accumulation = consommation + production + transport.

$$\frac{d[a]}{dt} = S.r + T.t$$

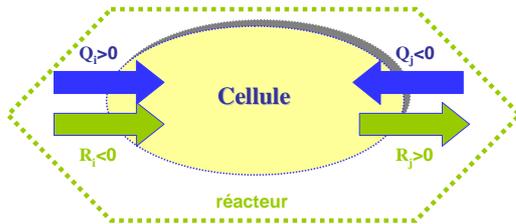
Avec :

- [a] : vecteur des concentrations des métabolites à l'intérieur de la cellule
- S : matrice stœchiométrique
- r : vecteur de n réactions biochimiques
- T : matrice de transport (entrées et sorties)
- t : vecteur de k réactions d'échanges

On peut également écrire cette équation sous la forme  $\frac{d[a]}{dt} = S.r + Q$  avec Q le vecteur des vitesses nettes des métabolites échangés avec l'extérieur du système (*i.e.* le flux d'échange).

Les constantes de temps qui régissent les réactions métaboliques (loi d'action de masse) sont très inférieures à celles caractérisant la dynamique du procédé (Roels, 1983) : les dynamiques intracellulaires sont beaucoup plus rapides que les dynamiques extracellulaires. Il est donc possible de formuler l'hypothèse que la cellule est à l'état quasi-stationnaire et qu'il n'y pas d'accumulation intracellulaire de métabolites, c'est-à-dire  $\frac{d[a]}{dt} = 0$  donc  $S.r + Q = 0$ .

Par convention, tout ce qui entre dans un système est positif et ce qui sort du système est négatif (cf. Figure 21), donc Q est positif pour les substrats qui vont être consommés (vitesse nette de réaction <0) et négatif pour les produits excrétés dans le milieu de culture (vitesse nette de réaction >0). On peut alors écrire  $Q = -R$  et donc  $S.r = R$ , avec R le vecteur des vitesses nettes de réaction lorsque le système considéré est le bioréacteur.



**Figure 21. Conventions de notations et frontière des systèmes considérés. Source : Conférence de C.Bideaux, (2012) École thématique « Ingénierie des biosystèmes : de la cellule au procédé » Avril 2012, Saint Nazaire.**

Pour résoudre le système linéaire (Figure 22), la matrice S est augmentée de la matrice identité (I(k)) et de la matrice nulle (n-k x k) et le vecteur r avec le vecteur des vitesses connues R. Le système linéaire obtenu est sous déterminé car il existe plus d'inconnues (n vitesses intracellulaires + k vitesses nettes réactionnelles) que d'équations (n).

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|c|}
 \hline
 \mathbf{S} & \begin{array}{c} -\mathbf{I} \\ \mathbf{0} \end{array} \\
 \hline
 \end{array} & \begin{array}{c} \mathbf{r} \\ \mathbf{R}_1 \end{array} = \begin{array}{c} \mathbf{0} \end{array} \\
 \mathbf{A} & \mathbf{b}
 \end{array}$$

**Figure 22. Représentation symbolique des matrices de travail. Source : Conférence de C.Bideaux, (2012) École thématique « Ingénierie des biosystèmes : de la cellule au procédé » Avril 2012, Saint Nazaire.**

Le vecteur  $\mathbf{b}$  appartient au noyau de la nouvelle matrice constituée notée  $\mathbf{A}$ . Si  $\mathbf{y}$  est une base du noyau  $\mathbf{A}$ ,  $\mathbf{b}$  peut s'écrire comme une unique combinaison linéaire des vecteurs de  $\mathbf{y}$  :

$$\mathbf{b} = \ker(\mathbf{A}) \cdot \mathbf{C} \text{ et } \mathbf{b} = \mathbf{y} \cdot \mathbf{C}$$

où  $\mathbf{C}$  est le vecteur-colonne des coordonnées de  $\mathbf{b}$  dans  $\mathbf{y}$ .

Le degré d'indétermination du système correspond à la dimension de  $\ker(\mathbf{A})$ . Le vecteur  $\mathbf{b}$  peut être divisé entre les flux mesurés (indice  $m$ ) et les flux calculés (indice  $c$ ) :

$$A.b = 0$$

$$\begin{bmatrix} A_m & A_c \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_m \\ b_c \end{bmatrix} = 0$$

- $A_m b_m + A_c b_c = 0$   
 $A_c^T A_c b_c = -A_c^T A_m b_m$   
 $b_c = -(A_c^T A_c)^{-1} A_c^T A_m b_m$
- $\text{ddl} = \dim(\text{Ker}(A))$
- Le système est sous-déterminé si  $\dim(b_m) < \text{degré de liberté}$  et toujours inobservable : un système sous-déterminé possède une infinité de solution et peut être résolu sous contrainte, avec une fonction à optimiser
- Le système est déterminé si  $\dim(b_m) = \text{degré de liberté}$  et observable si  $\det(A_c) \neq 0$  : un système déterminé et observable permet une résolution directe du système matriciel.
- Le système est surdéterminé si  $\dim(b_m) > \text{degré de liberté}$  et observable si  $\det(A_c^T A_c) \neq 0$  : un système surdéterminé et observable permet de recalculer la meilleure estimée de certaines vitesses et d'envisager une réconciliation des données.

Si le système est déterminé ou surdéterminé et inobservable alors il peut être résolu sous contraintes.

Dans le cas recherché d'un système déterminé et observable, le nombre de vitesses intra/extracellulaires à mesurer est fixé par le degré de liberté du système. Ces vitesses doivent être non redondantes, c'est-à-dire que les vitesses forment une famille libre, dont le nombre est égal au degré de liberté. Le choix des données se portera dans nos travaux sur des vitesses nettes extracellulaires car ces vitesses sont les plus faciles à quantifier.

Le code de calcul utilisé pour mettre en œuvre cette méthode de résolution présente l'avantage d'utiliser le calcul symbolique. Ainsi certaines grandeurs du système : les coefficients stœchiométriques des réactions de synthèse de la biomasse, les vitesses intra/extracellulaires inconnues et les vitesses intra/extracellulaires fixées sont considérés comme des variables symboliques donc l'unique solution du système apparaît également sous cette forme. Par la suite, il est possible d'attribuer des valeurs numériques à ces variables de manière à calculer une expression numérique pour la distribution de flux.

### 3.3. Construction et validation du réseau métabolique

Sur la base de modèles métaboliques issus de travaux antérieurs (Bideaux, 2000; Colombié, 2005; Pagliardini, 2010; Pagliardini *et al.*, 2013) disponibles au sein de l'Equipe de recherche, le modèle est implémenté pour décrire le réseau métabolique spécifique de *C.shehatae*. Le modèle initial est celui développé par Pagliardini (2010; 2013) pour la levure *S.cerevisiae* sur glucose. Il s'agit d'un modèle compartimenté. Le réseau métabolique comprend le métabolisme central (glycolyse, voie des pentoses phosphates, Cycle de Krebs et chaîne respiratoire), les réactions de synthèse des monomères constitutifs de la biomasse (acides aminés, acides gras, acides nucléiques...) et les réactions de polymérisation de ces monomères nécessaires à la synthèse des macromolécules du type protéines, lipides, polysaccharides etc., ainsi que les réactions de transports extra et intra cellulaires.

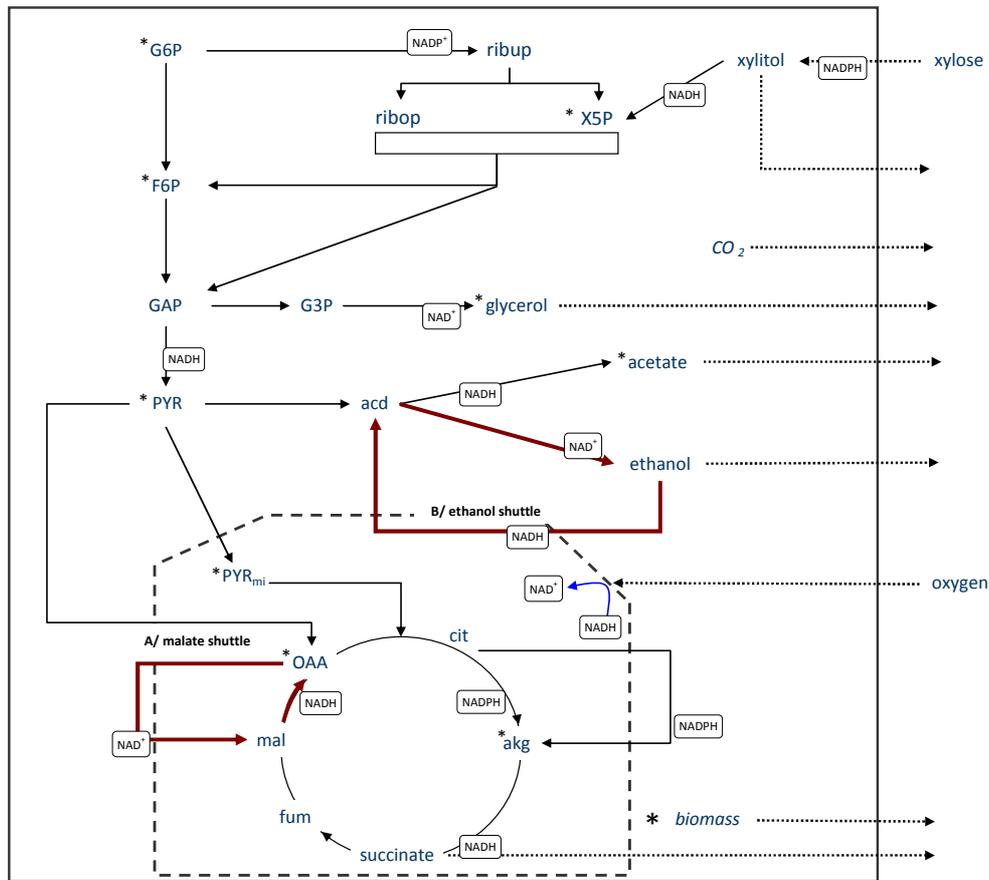
Les modifications spécifiques à *C.shehatae* apportées à ce modèle concernent :

- la voie d'entrée du xylose dans le métabolisme central,
- les réactions anaboliques
- les réactions de transport liés à la compartimentation.

Ce travail a été réalisé sur la base de (1) la littérature disponible pour des microorganismes proches de *Candida shehatae* et (2) d'expérimentations dédiées. La construction des modèles ainsi que leur validation sont rédigées sous forme de publication soumise dans le journal **Bioresource Technology**.

Un coefficient symbolique est intégré sur la voie de réduction du xylose pour traduire la dualité des cofacteurs de la XR comme proposé par Granström *et al.*, (2002).

Les hypothèses de construction permettent d'obtenir deux modèles qui diffèrent par le système de transport du pouvoir réducteur entre le cytosol et la mitochondrie. Le mécanisme des navettes insérées dans chaque modèle est détaillé dans la Figure 23. Les réactions du modèle métabolique associées à chaque enzyme impliquée dans le système de navette sont spécifiées dans la légende.



**Figure 23. Mécanisme de transport du NADH entre le cytosol et la mitochondrie par les deux navettes insérées dans les modèles métaboliques : A, navette malate-aspartate ENZYMES : aspartate aminotransférase (r23 et r96); malate déshydrogénase cytosolique (r79); malate déshydrogénase mitochondriale (r95). B, navette éthanol-acétaldéhyde. Enzymes : alcool déshydrogénases (r10 et r79).**

Concernant les réactions conduisant à la synthèse de biomasse, les intermédiaires réactionnels ainsi que les réactions de biosynthèse prises en compte sont présentés sur la Figure 24. La structure macromoléculaire de la biomasse correspond à la somme pondérée des macromolécules que sont les protéines, les lipides, les polysaccharides, l'ARN, l'ADN et l'eau. Ces macromolécules sont synthétisées à partir de précurseurs et intermédiaires réactionnels issus des voies centrales détaillées en annexe 2. Les coefficients stœchiométriques intervenant dans ces réactions sont des paramètres symboliques dont les valeurs sont issues de la littérature exceptées pour les coefficients des macromolécules. Ces derniers ont été ajustés

par calcul de la meilleure estimée de façon à correspondre à la composition élémentaire  $CH_xO_yN_z$  mesurée expérimentalement.

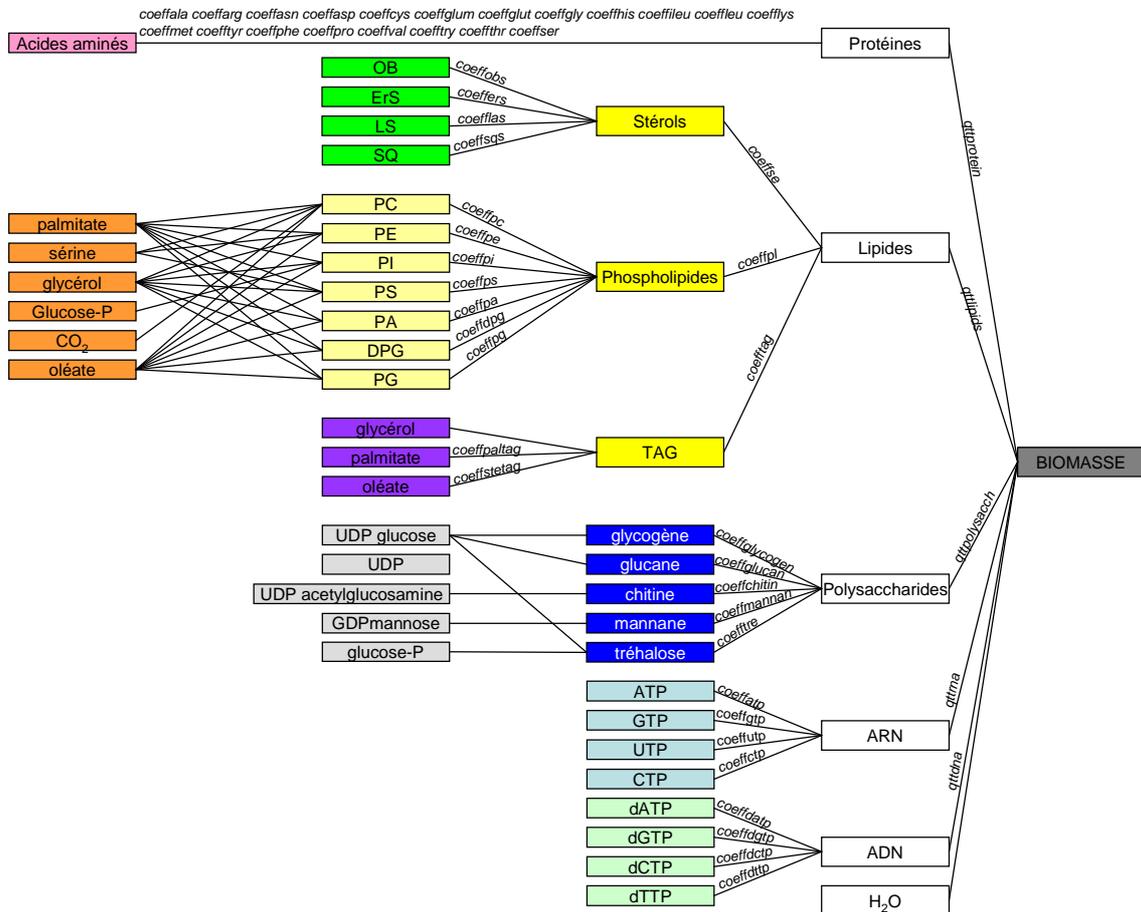


Figure 24. Formation de la biomasse à partir des précurseurs anaboliques.

La validation est effectuée par comparaison des vitesses nettes de  $CO_2$  et de biomasse calculées avec celles obtenues lors d'une culture de *C.shehatae* en mode discontinu alimenté. Cette étape montre que la différence observée sur la vitesse de production de la biomasse est de 5.1 % et de 1.0 % sur la vitesse de production de  $CO_2$ . Les résultats obtenus sont identiques quel que soit le modèle développé (intégration d'une navette éthanol – acétaldéhyde ou malate – aspartate) et n'ont donc pas permis de privilégier un mécanisme de régénération du pouvoir oxydo-réductif. Aussi, un seul modèle est considéré pour l'obtention des rendements théoriques limite dont celui de production d'éthanol (cf. 3.4.2). Par ailleurs, des conditions d'apport en substrats optimisées pour la conversion du xylose en éthanol sont théoriquement déterminées.

**Revised manuscript**

Click here to view linked References

1 Title:  
 2  
 3 Metabolic model of *Candida shehatae* growing on xylose: How MFA can help to  
 4  
 5 optimize xylose conversion into ethanol  
 6  
 7  
 8 Authors:  
 9  
 10 Julie MONTHEARD<sup>1,2,3</sup>, Xavier CAMELEYRE<sup>1,2,3</sup>, Stéphane E. GUILLOUET<sup>1,2,3</sup>,  
 11  
 12 Carole MOLINA-JOUVE<sup>1,2,3</sup>, Carine BIDEAUX<sup>1,2,3,†,\*</sup>, Sandrine ALFENORE<sup>1,2,3,†</sup>  
 13  
 14  
 15 Authors' affiliation:  
 16  
 17 1- Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077  
 18  
 19 Toulouse, France  
 20  
 21  
 22 2- INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400  
 23  
 24 Toulouse, France  
 25  
 26  
 27 3- CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France  
 28  
 29  
 30 † Supervised the work equally  
 31  
 32  
 33 \* Corresponding author: [carine.bideaux@insa-toulouse.fr](mailto:carine.bideaux@insa-toulouse.fr) (+33 (0)5 61 55 94 44)  
 34  
 35 Abstract:  
 36  
 37 A Metabolic Flux Analysis (MFA) model was developed to calculate intracellular flux  
 38  
 39 for *Candida shehatae* culture. The metabolic model, constructed with xylose as carbon  
 40  
 41 substrate, was adapted to the strain. A first experiment showed the accuracy of the  
 42  
 43 model by comparing calculated and experimental data. The metabolic model was  
 44  
 45 utilized to determine the theoretical yield taking into account redox balance and to  
 46  
 47 optimize ethanol production. The maximal theoretical yield was calculated at 0.62  
 48  
 49  $\text{Cmol}_{\text{ethanol}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  for an oxygen requirement of 0.33  $\text{mol}_{\text{oxygen}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  linked to  
 50  
 51 the cofactors of xylose reductase. As experimentation in chemostat culture allows fine  
 52  
 53 tuning of xylose and oxygen uptake, this culture mode was performed in order to  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65

1 optimize ethanol production. The results consisted of three steady states where the  
2  
3 carbon was directed linearly from biomass and CO<sub>2</sub> to ethanol. One of the steady states  
4  
5 corresponded to an oxygen supply of 0.47 mol<sub>oxygen</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup> yielding 0.51  
6  
7  
8 Cmol<sub>ethanol</sub>.Cmol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>.  
9

10  
11  
12  
13 Keywords: *Candida shehatae* metabolism · oxygen · Metabolic Flux Analysis · ethanol  
14  
15 production  
16

## 17 18 19 20 21 **1. INTRODUCTION**

22  
23 Due to the importance of biobased alternatives for fuel substitution, ethanol from  
24  
25 lignocellulosic biomass has been intensely studied over the last years. While the  
26  
27 conversion of C6 sugars like glucose has been broadly mastered, C5 conversion in  
28  
29 particular of xylose is still a scientific and technical challenge. The C5 fraction in  
30  
31 lignocellulosic materials can represent a significant proportion in the range 10% - 40%  
32  
33 (w/w) (Singh and Mishra, 1995). In order to maximize sugar conversion into ethanol,  
34  
35 two strategies exist: one based on engineering genetically modified strains (mainly in  
36  
37 *Saccharomyces cerevisiae*) to convert both C6 and C5 sugars and the other based on the  
38  
39 use of naturally C5 fermenting yeasts like those of the *Pichia* or *Candida* genera.  
40  
41  
42 *Candida shehatae* yeast has been described as a potential converter of xylose into  
43  
44 ethanol (Toivola *et al.*, 1984). Studies have shown that oxygen strongly impacts the  
45  
46 capacities of the strain to produce ethanol but its role is not entirely understood (Du  
47  
48 Preez and van der Walt, 1983; Sánchez *et al.*, 1997). The oxygen supply affects xylose  
49  
50 metabolism: DuPreez *et al.* (1989) performed cultures with several aeration levels  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 without any control of oxygen dissolution, and showed that the xylitol yield increased  
2  
3 as an inverse function of the aeration. No ethanol was produced in fully aerobic culture.  
4  
5 These authors obtained a maximal ethanol titer of 18.7 g.L<sup>-1</sup> and an ethanol yield of  
6  
7 0.38 g.g<sup>-1</sup> xylose with *C.shehatae*. More recently, Fromanger *et al.*,(2010), quantified  
8  
9 the oxygen limitation level by measuring the specific oxygen uptake rate in bioreactor  
10  
11 culture of *C.shehatae* on mineral medium with xylose as substrate. They reached an  
12  
13 ethanol yield of 0.33 g.g<sup>-1</sup> with 1.19 mmolO<sub>2</sub>.g DCW<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> and a maximal ethanol titer  
14  
15 of 49 g.L<sup>-1</sup> representing 43% of carbon consumed. The maximal yield of 0.45 g  
16  
17 ethanol.g<sup>-1</sup> xylose was obtained by Slininger *et al.*, (1985) in flask cultures without any  
18  
19 control of oxygen supply defined as aerobic: batch cultures in flasks were closed with  
20  
21 perforated caps and incubated on a rotary shaker. The oxygen uptake seemed to be  
22  
23 determinant but optimization studies failed in the quantification of oxygen requirement  
24  
25 and its role remains unclear. As oxygen is involved in the redox balance (Bruinenberg et  
26  
27 al., 1983) the biological demand for co-factors of both growth and ethanol production  
28  
29 was stringently dependent on metabolic pathways.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 These constraints on carbon, redox potential, cofactor equilibrium and energy can be  
41  
42 described and evaluated through metabolic models. Metabolic Flux Analysis (MFA) is  
43  
44 generally used to estimate intracellular flux distribution based on a complete description  
45  
46 of the metabolic pathways relative to substrate consumption, biomass synthesis, energy  
47  
48 consumption and production and metabolite production (Llaneras and Pici, 2008). MFA  
49  
50 was based on the assumption of pseudosteady state in the intracellular concentration and  
51  
52 optimality principles and can estimate the metabolic flux distribution without  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 intracellular concentration measurements by fitting with measured extracellular rates  
2  
3 such as biomass and metabolite production and substrate consumption.  
4  
5  
6  
7

8 This paper proposes a new approach to understand both the role of oxygen and the  
9  
10 carbon flux distribution of *C.shehatae* metabolism through MFA in order to define the  
11  
12 maximal theoretical capacities of the selected yeast towards ethanol production and to  
13  
14 optimize xylose conversion for bioethanol production.  
15  
16  
17  
18

## 19 **2. MATERIALS AND METHODS**

### 20 **2.1. Strain and pre-culture conditions**

21  
22  
23 *Candida shehatae* strain ATCC 22984 (American Type Culture Collection), a xylose  
24  
25 fermenting yeast, was maintained on Plate Count Agar (PCA) (AES Chemunex), and its  
26  
27 long-term storage at -80°C used Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) medium ( with  
28  
29 45% (v/v) glycerol). Pre-cultures grown first on YPD (without glycerol) for 24h at  
30  
31 30°C, stirred at 100 rpm were transferred into flasks containing a complete mineral  
32  
33 medium complemented with 20 g.L<sup>-1</sup> xylose. Flask cultures were grown for 24h at 30°C  
34  
35 under shaking at 100 rpm before inoculation in the bioreactor.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

### 43 **2.2. Medium**

44  
45 A mineral medium was defined in order to avoid nutritional limitations up to a biomass  
46  
47 concentration of 20 g.L<sup>-1</sup> and adapted to *Candida* strains. The pH of the medium was  
48  
49 adjusted to 4.5 and the composition was described by Fromanger *et al.*,(2010). To  
50  
51 increase ethanol tolerance, a vitamin feeding strategy was used as described by Alfenore  
52  
53 *et al.*,(2002) for *Saccharomyces* strains. Chemicals (xylose, salts, oligo-elements and  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 commercial ammonia solution) were provided from Prolabo, and vitamins from Sigma.  
2  
3 All chemicals were of the highest analytical grade available.  
4  
5

### 6 **2.3. Cultures in instrumented bioreactors**

7  
8  
9  
10 Two experiments were carried out in two different culture modes: the data from the first  
11  
12 were dedicated to metabolic model validation and from the second were utilized to  
13  
14 compare with theoretical predicted results.  
15  
16

17  
18  
19 The first experiment was performed in fed batch mode in a 5-Liter instrumented  
20  
21 bioreactor (B Braun International Biotech, Sartorius group), with an initial working  
22  
23 volume of 3 Liters. The temperature was set at 30°C and the pH at 4.5 by addition of  
24  
25 ammonia solution (14% v/v). The dissolved oxygen partial pressure ( $pO_2$ ) was  
26  
27 measured by an oxygen probe (InPro® 6800 Mettler Toledo). Aeration and stirring rates  
28  
29 were managed in order to run two different culture conditions: the first intended for  
30  
31 growth with full oxygen supply ( $pO_2$  up to 40% saturation value under working  
32  
33 condition (30°C, atmospheric pressure)) and the second under oxygen limitation ( $pO_2 =$   
34  
35 0% saturation) to favor ethanol production. Inlet and outlet gas compositions were  
36  
37 monitored by mass spectrometry as described in 2.4. The carbon substrate was supplied  
38  
39 continuously by adding sterile concentrated solution (634 g.L<sup>-1</sup> of xylose).  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 Chemostat culture was carried out in a 2-Liter instrumented bioreactor (B Braun  
50  
51 International Biotech, Sartorius group) using 1 Liter of working volume. Temperature  
52  
53 and pH regulation and measurement of dissolved oxygen partial pressure were as  
54  
55 described above for the fed-batch experiment. The feeding was performed by  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 continuously adding fresh mineral medium containing 33 g.L<sup>-1</sup> xylose. Three steady  
2  
3 state conditions were carried out corresponding to different oxygen and xylose supplies  
4  
5 and dilution rates. Details are described in the Results and Discussion section.  
6  
7

#### 8 9 **2.4. Analytical methods and gas analysis**

10  
11 Biomass concentration was measured both by optical density and gravimetric methods.  
12  
13 Optical density (OD) was measured at 620 nm in a spectrophotometer (Hach Lange DR  
14  
15 3900) in a glass cuvette (2 mm optical length) and correlated against cell dry weight  
16  
17 measurements. Cell dry weight (CDW) was measured by filtration of a known volume  
18  
19 through 0.45 µm-pore size polyamide membranes (Sartorius) dried at 60 °C to a  
20  
21 constant weight under a partial vacuum (200 mm Hg) for 48 hours. Biomass elementary  
22  
23 formula (CH<sub>x</sub>O<sub>y</sub>N<sub>z</sub>) was determined at Central Analysis Service (CNRS, Solaize) on 10  
24  
25 independent experimental samples.  
26  
27  
28  
29  
30

31  
32 Major fermentation products (ethanol, glycerol, xylitol, acetic acid, pyruvic acid,  
33  
34 succinic acid and xylose) were quantified by HPLC (Alliance 2690, Waters) in culture  
35  
36 supernatant using an Aminex HPX 87 H column, running in isocratic mode with a flow  
37  
38 rate of 0.5 mL.min<sup>-1</sup> of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5mM) eluent, operating at 50°C. The system was  
39  
40 equipped with refractive index detector (RI 101 – SHODEX) and UV detector (Waters  
41  
42 996).  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

50  
51 Inlet and outlet gas compositions were measured by a mass spectrometer (Proline  
52  
53 Dycor, Ametek Process Instruments) calibrated using a standard gas composition (20%  
54  
55 CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, 1% Ar, 1000ppm ethanol, qsp N<sub>2</sub>). The volumetric O<sub>2</sub> consumption rate  
56  
57  
58  
59

1 and the CO<sub>2</sub> production rate were calculated from the differences between the inlet and  
2  
3 outlet gas compositions, taking into account the evolution of the liquid volume in the  
4  
5 reactor, the accumulation of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in liquid and gas phases, the inlet airflow rate  
6  
7 (regulated by a mass flow meter), the temperature and the pressure.  
8  
9

## 10 11 **2.5. Data analysis and calculation**

12  
13 For each culture sample, masses produced or consumed were calculated taking into  
14  
15 account the volume variation in the bioreactor. The carbon and the redox balances were  
16  
17 calculated on raw data and closed at more than 90%. Production and consumption rates  
18  
19 were calculated using a home-made program based on polynomial regression coupled  
20  
21 with an optimization procedure. This procedure dealt with the minimization of a  
22  
23 quadratic criterion between the experimental and the calculated data. Moreover, the  
24  
25 calculated rates were reconciled in order to recover all the elemental balances.  
26  
27

28  
29 Homemade software was used for metabolic flux analysis which resolved the linear  
30  
31 equation system of metabolic fluxes with Matlab® as previously described by Bideaux  
32  
33 *et al.*,(2006; 2008).  
34  
35  
36  
37  
38  
39

## 40 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### 41 **3.1. Construction of the *C.shehatae* metabolic network**

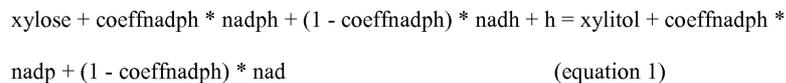
42  
43 The metabolic network of *C.shehatae* was constructed with a single carbon substrate  
44  
45 (xylose) and was based on information available for *Candida utilis* strain on the  
46  
47 database KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>). The model consisted of the  
48  
49 first step of xylose degradation, the pentose phosphate pathway, glycolysis, synthesis of  
50  
51 major metabolites like ethanol, acetic acid and glycerol, and the tricarboxylic acid cycle.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

The respiratory chain, the cofactor balance and maintenance were also included as were all the anabolic reactions (synthesis of proteins, lipids, polysaccharides and nucleic acids linked to biomass composition and production).

### 3.1.1. First step of xylose degradation

As described by Bruinenberg et al. (1984), the first step of xylose degradation is performed by the enzyme xylose reductase (XR) which can be both NADH-dependent and NADPH-dependent. Depending on the cofactor considered for XR in the model, the redox balances in the cell were completely modified inducing different calculated intracellular fluxes to equilibrate the metabolism. To take into account both the co-enzymes of XR in the metabolic model, an algebraic coefficient called *coeffnadph* was introduced into the xylose degradation reaction (see eq. 1). This coefficient was defined

$$\text{as } \text{coeffnadph} = \frac{XR_{NADPH}}{XR_{NADPH} + XR_{NADH}}.$$



From measured values of NADH and NADPH-dependent XR activities (table 1), the *coeffnadph* coefficient was within the range [0.41 - 0.80] depending on the culture conditions. In aerobic conditions, the mean value of the *coeffnadph* was calculated at  $0.67 \pm 0.05$ , in micro-aerobic conditions  $0.6 \pm 0.1$  and in anoxia  $0.72 \pm 0.05$ . Based on our model, sensitivity analysis was carried out to evaluate the impact of the variation of this parameter on the results of the calculation of flux distribution (data not shown). The highest impacts were obtained on the fluxes involving: phosphoglucose isomerase (noted r3), the oxidative part of the pentose phosphate pathway (PPP) (noted r15), ribulose-5-phosphate isomerase (noted r16), the transport of some compounds across

1 the mitochondrial membrane in association with cytosolic isocitrate dehydrogenase  
2  
3 (r78; r73; r77), the TCA cycle (r91→r95), and the reduction of FADH<sub>2</sub> in the  
4  
5 respiratory chain (r98). The value of this coefficient (*coeffnadph*) could have a strong  
6  
7 effect on the calculated intracellular fluxes. So, based on these results, as all the cultures  
8  
9 were carried out in aerobic conditions with a controlled value of the specific oxygen  
10  
11 consumption rate (not nil), the value of *coeffnadph* was fixed at 0.67.  
12  
13  
14  
15

### 16 3.1.2. Anabolism reactions

17  
18 The strategy to describe the major anabolic reactions was to start from the precursors  
19  
20 which were converted into monomers first and then the synthesis of macromolecules  
21  
22 was taken into account until biomass formation. All these anabolic steps (*i.e.* from the  
23  
24 precursors to biomass) were translated as stoichiometric equations in the model.  
25  
26  
27

28 Monomeric and macromolecular compositions in terms of lipids, proteins,  
29  
30 polysaccharides, DNA and RNA were initialized using data from the literature for  
31  
32 micro-organisms comparable to *C.shehatae*.  
33  
34  
35

36 In parallel, the elementary composition of biomass (CHON) was also measured on  
37  
38 culture samples.  
39  
40  
41  
42

43 The quantities of amino acids, in mol AA.g protein<sup>-1</sup>, were obtained from Camicer *et al.*  
44  
45 (2009). The distribution of sterols into ergosterol, squalene, lanosterol and obtusifoliol  
46  
47 was determined according to Abu-Elteen & Whittaker (1997). These authors also gave a  
48  
49 phospholipid distribution, in accordance with Rattray *et al.* (1975). Two groups of fatty  
50  
51 acids were used: the palmitate group representing the fatty acids from C12:0 to C17:1  
52  
53 and the stearate group representing C18 fatty acid according to Thorpe & Ratledge  
54  
55 (1972). Thus, the sterols, phospholipids and triacylglycerols accounted for 0.142, 0.532  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 and 0.326 g.g lipids<sup>-1</sup> (Abu-Elteen and Whittaker, 1997). The carbohydrate content was  
2  
3 derived from Carnicer *et al.* (2009) : glucans and mannans each represented 42% of the  
4  
5 total carbohydrate fraction, glycogen 15% and trehalose less than 0.1%.  
6  
7

8  
9  
10 Based on these data, the metabolic model was used to calculate the elementary  
11  
12 composition of each macromolecule (proteins, lipids, carbohydrates, DNA, RNA) and  
13  
14 compared to elementary macromolecule compositions available in the literature.  
15  
16 Compared to data from Carnicer *et al.*,(2009) in oxygen-limited conditions for *Pichia*  
17  
18 *pastoris*, the differences were below 5%, except for N in proteins (15%), and H and O  
19  
20 for lipids (6%).  
21  
22  
23  
24

25  
26  
27 An optimization method was performed to calculate the fraction of each macromolecule  
28  
29 in the biomass minimizing the differences between the elementary composition of the  
30  
31 measured biomass and that calculated by the metabolic model. A set of lower and upper  
32  
33 bounds were given for each macromolecule based on literature data analysis (Castro et  
34  
35 al., 1971; Rattray et al., 1975; Atkinson and Mavituna, 1983; Ratledge and Wilkinson,  
36  
37 1988; Lange and Heijnen, 2001; Carnicer et al., 2009). Residual water in the dry  
38  
39 biomass was taken into account to correct the experimental measurements of the  
40  
41 CH<sub>x</sub>O<sub>y</sub>N<sub>z</sub> biomass composition (rehydration of samples prior to analysis). Water content  
42  
43 was found at 7% in accordance to Carnicer *et al.*,(2009).  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51  
52 The results are presented in table 2. The calculated protein percentage in dry biomass  
53  
54 was 53% whereas the results of Carnicer *et al.* (2009) were between 35 and 51%  
55  
56 depending on the analysis method (Lowry's quantification or amino acid  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 measurements) and proteins reached a maximum of 39% after their own reconciliation  
2  
3 procedure. Granström *et al.* (2000; 2002) used a protein content of 52% for *C.tropicalis*  
4  
5 on xylose, close to the value obtained in this study on the same substrate. Carbohydrates  
6  
7 represented between 37 and 40% of biomass for Carnicer *et al.* (2009) after their  
8  
9 reconciliation procedure, 42% for Granström *et al.* (2000, 2002) while the value  
10  
11 calculated here was slightly lower (34.6%). The lipid content was calculated at 4.3%  
12  
13 whereas Carnicer *et al.* (2009) obtained values between 6.2% and 8.7% and Granström  
14  
15 *et al.* (2000, 2002) reached 3% corresponding to the sum of both oleate and palmitoleate  
16  
17 groups. For Rattray *et al.*(1975), the lipid contents were qualified as weak for *C.utilis*  
18  
19 (<5% cell dry weight) and middle (5% to 15%) for *C.tropicalis*.  
20  
21

22  
23 For RNA content, Granström *et al.* (2000, 2002) found 6.3% whereas Carnicer *et al.*  
24  
25 (2009) found between 4.9% and 6.6%. The value obtained was 7.8% in this study. The  
26  
27 calculated DNA content was quite low (0.28%) which was different from those obtained  
28  
29 by Carnicer *et al.* (2009), (0.13%) whereas Granström *et al.* (2000, 2002) did not assess  
30  
31 the DNA.  
32  
33

### 34 35 36 37 38 3.1.3. Locations and model construction 39

40  
41 The model was compartmented and reactions occurred either in the cytosol or the  
42  
43 mitochondria as described in previous works (Nissen *et al.*, 1997; Pagliardini *et al.*,  
44  
45 2013). As proposed by Pagliardini,(2013), some amino acids were formed in the  
46  
47 mitochondria (arginine, leucine, proline, valine) and others were synthesized in the  
48  
49 cytosol. Several shuttle mechanisms were included in the model to take into account the  
50  
51 translocation of the redox power between the different compartments. Transport could  
52  
53 be either direct, with some compounds easily crossing between the compartments ,or  
54  
55 more complex, via shuttles (Bruinenberg *et al.*, 1985; Nissen *et al.*, 1997; Celton *et al.*,  
56  
57  
58  
59  
60

1 2012). The shuttles led to substrate cycling that regenerated cytosolic NADH and  
2  
3 increased the mitochondrial NADH pool. In this work, two models were designed: one  
4  
5 based on the ethanol-acetaldehyde shuttle and the other using the malate-aspartate  
6  
7 shuttle (Bakker *et al.*, 2001). The ethanol-acetaldehyde shuttle consisted of an NADH-  
8  
9 dependent mitochondrial alcohol dehydrogenase which converts acetaldehyde into  
10  
11 ethanol, as these compounds can freely diffuse through the membrane. The malate-  
12  
13 aspartate shuttle consisted of two antiport transport systems (glutamate-aspartate and  
14  
15 malate- $\alpha$ -ketoglutarate) coupled with both cytosolic and mitochondrial malate  
16  
17 dehydrogenase and aspartate aminotransferase.  
18  
19  
20  
21

22  
23  
24  
25 The assumption in the models was that pyruvate, oxaloacetate, citrate, succinate,  
26  
27 fumarate and  $\alpha$ -ketoglutarate can diffuse easily across the mitochondrial membrane  
28  
29 (Granström *et al.*, 2000). Pyruvate can be converted only in the cytosol either into  
30  
31 acetaldehyde by pyruvate decarboxylase or into oxaloacetate by pyruvate carboxylase  
32  
33 (anaplerotic reaction) (Passoth *et al.*, 1996). It was assumed that the pyruvate  
34  
35 dehydrogenase was mitochondrial and catalyzed the degradation of pyruvate into acetyl-  
36  
37 coA (Granström *et al.*, 2000). The  $\text{NAD}^+$ -dependent acetaldehyde dehydrogenase was  
38  
39 assumed to be cytosolic as was the  $\text{NADP}^+$  dependent isocitrate dehydrogenase  
40  
41 (Bruinenberg *et al.*, 1985) to replenish the NADPH stock in this compartment.  
42  
43 Cytosolic acetate participated in acetyl-CoA synthesis in the cytosol via acetyl-CoA  
44  
45 synthetase. This compound is involved in sterol and fatty acid synthesis. ATP  
46  
47 consumption for maintenance energy and pH homeostasis were also included according  
48  
49 to Van Gulik & Heijnen, (1995). The oxidative phosphorylation coefficient (PO) was  
50  
51 fixed at 1.33 for both NADH and FADH oxidation by Verduyn *et al.*, (1991).  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 The stoichiometric matrix ( $n \times m$ ) construction resulted in a system containing  $n = 136$   
2 metabolites and  $m = 121$  intracellular rates for the ethanol-acetaldehyde shuttle model  
3  
4 and  $n = 136$  and  $m = 123$  for the malate-aspartate shuttle model. Net rates of fifteen  
5  
6 extracellular factors were considered: xylose, biomass, xylitol, water, pyruvic acid,  
7  
8 acetic acid, ethanol,  $\text{CO}_2$ , glycerol,  $\text{O}_2$ , phosphate ions, hydrogen ions, ammonium ions,  
9  
10 sulfate ions and succinic acid. The degree of freedom for the two models was eight,  
11  
12 meaning that a least eight independent net rates had to be measured to calculate a single  
13  
14 solution for each system.  
15  
16  
17  
18  
19  
20

### 21 **3.2. Experimental fermentation results**

22 The stoichiometric models developed were validated with experimental data. The  
23  
24 dynamic behavior of *C.shehatae* during growth and ethanol production was  
25  
26 characterized during a fed-batch culture with xylose as carbon source. The culture was  
27  
28 carried out in two phases: growth only and both growth and ethanol production (Figure  
29  
30 1). The first phase was dedicated to growth in aerobic conditions (dissolved oxygen  
31  
32 pressure ( $p\text{O}_2$ ) up to 40% of saturation value). This phase allowed a biomass  
33  
34 concentration close to  $50 \text{ g.L}^{-1}$  to be reached in 50 hours of culture. The second phase,  
35  
36 dedicated to both biomass and ethanol production, was monitored under oxygen  
37  
38 limitation ( $p\text{O}_2$  nil).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 Biomass concentration reached nearly  $65 \text{ g.L}^{-1}$  whereas ethanol production was close to  
47  
48  $35 \text{ g.L}^{-1}$  during the next 30 hours culture. Low xylitol production was observed  
49  
50 representing less than 3% of the carbon consumed. Carbon and redox balances were  
51  
52 97.6% and 99.1% respectively.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 As expected, the aerobic phase was dedicated to growth only with a maximal specific  
2 growth rate of  $0.43 \text{ h}^{-1}$  which concurred with that obtained by Fromanger et al.,(2010).  
3  
4 The average biomass yield was  $0.49 \text{ g biomass.g xylose}^{-1}$  according to Du Preez et  
5  
6 al.,(1989) (*i.e.* 96% of the theoretical yield). During the second phase, both ethanol and  
7  
8 biomass were produced with global yields of  $0.10 \text{ g biomass.g xylose}^{-1}$  and  $0.20 \text{ g}$   
9  
10 ethanol.g xylose<sup>-1</sup>. The instantaneous maximal ethanol yield reached  $0.35 \text{ g.g}^{-1}$ , which  
11  
12 was lower than the maximal yield obtained by Slininger *et al.*, (1985) *i.e.*  $0.45 \text{ g.g}^{-1}$  in  
13  
14 aerobic flask cultures. All the rates (expressed in  $\text{g.h}^{-1}$  or  $\text{mol.h}^{-1}$ ) were calculated for  
15  
16 ethanol, xylitol, biomass, organic acids,  $\text{CO}_2$  and glycerol productions and for xylose  
17  
18 and  $\text{O}_2$  consumptions to be used to validate the proposed metabolic models.  
19  
20  
21  
22  
23  
24

### 25 **3.3. Validation of the metabolic models**

26  
27 Model calculations were validated by comparing experimental and calculated rates.  
28  
29 Based on experimental measurements, ten net rates were calculated during culture and  
30  
31 eight were supplied to the metabolic model for resolution. Validation used the two other  
32  
33 extracellular rates. As biomass and  $\text{CO}_2$  were the major products in the two phases  
34  
35 (99% and 65% of the total consumed carbon during the aerobic and the oxygen limited  
36  
37 phases respectively), these two metabolite rates were chosen for error estimation. Figure  
38  
39 2 shows the superimposition of both the calculated and the experimental rates for the  
40  
41 metabolites and for the two proposed models as a function of time. The calculated rates  
42  
43 were quite close to the experimental ones with average discrepancies of 5.1% and 1.0%  
44  
45 for biomass and  $\text{CO}_2$  rates respectively. Moreover, the results showed that the two  
46  
47 models (ethanol-acetaldehyde shuttle and malate-aspartate shuttle) were equivalent to  
48  
49 calculate both the biomass and the  $\text{CO}_2$  extracellular rates throughout culture and did  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 not favor one transport mechanism or the other. Simulation experiments could be  
2  
3 carried out modulating the *coeffnadph* to see differences in co-factor regeneration for  
4  
5 the two shuttles proposed. As the average discrepancies for calculated biomass and CO<sub>2</sub>  
6  
7 rates were quite low, the two models were validated and found able to correctly describe  
8  
9 the metabolism of *C.shehatae*. For the next part, only the ethanol-acetaldehyde model  
10  
11 was used.  
12  
13  
14  
15

### 16 **3.4. Utilization of the models to determine the theoretical maximal ethanol yield**

17  
18 The ethanol-acetaldehyde model was used to calculate the maximal theoretical yield for  
19  
20 xylose conversion into ethanol only. For mathematical resolution, the consumption rate  
21  
22 of xylose was set at -100 mol.h<sup>-1</sup> and the production rates for biomass and other co-  
23  
24 metabolites (xylitol, glycerol, pyruvic, acetic and succinic acid rates) were set at 0.  
25  
26 Oxygen rate varied between 0 and 2.6 mol.h<sup>-1</sup>. Based on these constraints, both CO<sub>2</sub> and  
27  
28 ethanol rates were calculated.  
29  
30  
31  
32  
33

34  
35 Based on thermodynamic or enzymatic constraints, some reactions were defined as  
36  
37 irreversible: the oxidative part of the PPP and the pyruvate dehydrogenase reaction.  
38  
39 These reactions were co-factors dependent on and then impacted by oxygen and had to  
40  
41 be either nil or positive. Depending on the value of the *coeffnadph*, lower and upper  
42  
43 bounds were found to satisfy this criterion. For a *coeffnadph* value of 0.67, the model  
44  
45 resolution gave a range of between 0.33 and 2 mol.mol<sup>-1</sup> for the global oxygen/xylose  
46  
47 yield (Y<sub>O<sub>2</sub>/xylose</sub>). A value for Y<sub>O<sub>2</sub>/xylose</sub> of 0.33 mol.mol<sup>-1</sup> corresponded to an inlet flux  
48  
49 in the TCA cycle equal to 0 mol.mol<sup>-1</sup> which meant no growth and all the carbon flux  
50  
51 converted into ethanol production. For Y<sub>O<sub>2</sub>/xylose</sub> values of up to 2 mol.mol<sup>-1</sup>, the  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 oxidative part of the PPP became negative. Based on these results, the maximal  
 2 theoretical ethanol yield was correlated to the oxygen/xylose yield. The model predicted  
 3 a linear decrease of the targeted yield when  $Y_{O_2/xylose}$  increased. As the critical value for  
 4 oxygen yield was  $0.33 \text{ mol.mol}^{-1}$ , the equation found allowed the calculation of a  
 5 maximal theoretical ethanol yield of  $0.62 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$  (i.e.  $0.475 \text{ g}_{\text{ethanol.g}_{\text{xylose}}^{-1}}$ ) (eq.  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13 2).

$$14 \quad Y_{\text{ethanol/xylose}} = -0.133 * Y_{\text{oxygen/xylose}} + 0.667 \quad (\text{equation 2})$$

15  
 16  
 17 This ethanol yield was suggested by Evans & Ratledge (1984) in various xylose  
 18 consuming yeasts assuming that 15% of xylose was recycled to provide NADPH for  
 19 ethanol production. They suggested that this yield could be enhanced up to  $2 \text{ mol.mol}^{-1}$   
 20 when the phosphoketolase activity - which catalyzes the conversion of xylulose-5-  
 21 phosphate into glyceraldehyde-3-phosphate - was quite high.  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29

30 The model was then used in theoretical conditions to understand that the overproduction  
 31 of mitochondrial NADH during pure conversion of xylose into ethanol was oxidized by  
 32 the respiratory chain in the presence of oxygen. Others authors had already utilized  
 33 elementary mode analysis for xylose-consuming yeast such as Unrean & Nguyen (2012)  
 34 with *Pichia stipitis*. MFA has also been used on Candida strains by Granström *et al.*  
 35 (2000; 2002). Here, MFA determined the limit capacities in oxygen uptake linked to  
 36 ethanol production and allowed us to calculate a theoretical ethanol yield of  $0.62$   
 37  $\text{Cmol.Cmol}^{-1}$  ( $0.475 \text{ g.g}^{-1}$ ) with an oxygen requirement of  $0.33 \text{ mol oxygen per mol}$   
 38 consumed xylose. MFA also proved that a linear correlation exists between  $Y_{O_2/xylose}$   
 39 and  $Y_{\text{ethanol/xylose}}$  in the same way as Unrean & Nguyen (2012), who demonstrated that  
 40 the decrease of  $Y_{O_2/xylose}$  led to an increased  $Y_{\text{ethanol/xylose}}$ .  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65

1 Variations of *coeffnadph* showed the effect of the cofactors on the metabolic pathway  
2 and thus on the ethanol yield. The metabolic model developed in this work can be used  
3  
4 as a technical tool for screening xylose-consuming yeast potential and for the  
5  
6 optimization of oxygen limitation, adapted to each strain, for an efficient conversion of  
7  
8 xylose into ethanol. The coefficient *coeffnadph* was originally created to represent the  
9  
10 dependence of the XR on two cofactors. It can be adjusted for various xylose  
11  
12 consuming yeasts metabolically comparable to *C.shehatae*. For example, the *coeffnadph*  
13  
14 of *Brettanomyces naardenensis* CBS 7540 would be 1 as XR was only NADPH-  
15  
16 dependent (Galafassi *et al.*, 2011), consequently the maximal ethanol yield should be  
17  
18 0.6 Cmol.Cmol<sup>-1</sup> (0.46 g.g<sup>-1</sup>) for an oxygen requirement of 0.5 mol of oxygen per mol  
19  
20 of xylose, based on the hypothesis of the biomass composition of *C.shehatae*. Galafassi  
21  
22 *et al.* (2011) found a maximal ethanol yield 0.09 g.g<sup>-1</sup> from xylose culture in oxygen  
23  
24 limitation (0.21 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).

### 35 36 **3.5. Comparison with experimental yields: how to optimize xylose conversion**

37  
38 Based on the correlation found between Y<sub>O<sub>2</sub>/xylose</sub> and Y<sub>ethanol/xylose</sub>, the next strategy was  
39  
40 to control different Y<sub>O<sub>2</sub>/xylose</sub> in a range between 0.33 and 2 mol.mol<sup>-1</sup> in a chemostat  
41  
42 culture and to study the effect of this ratio on the ethanol yield. The chemostat was  
43  
44 carried out in oxido-reductive mode *i.e.* with a necessary part of biomass production  
45  
46 (and thus the resulting ethanol yield was lower than the expected theoretical one). The  
47  
48 inlet substrate fluxes (both for xylose and oxygen) were controlled in order to reduce the  
49  
50 biomass production to attempt to reach the maximal theoretical ethanol yield which was  
51  
52 calculated in reductive hypothesis without any other co-production except CO<sub>2</sub>. All the  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 culture conditions and results are detailed in table 3. For each steady state, both the  
 2 carbon and redox balances were closed to 97%. Three dilution rates were carried out in  
 3  
 4 aerated conditions under oxygen limitation ( $pO_2 = 0\%$ ). The results showed that  
 5  
 6 decreasing the ratio  $Y_{O_2/xylose}$  led to minimization of the biomass and byproducts  
 7  
 8 formation to 13% of the total carbon consumed (see steady state 1). In this culture  
 9  
 10 condition ( $Y_{O_2/xylose} = 0.47 \text{ mol.mol}^{-1}$ ), the ethanol yield ( $0.51 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ )  
 11  
 12 corresponded to 85% of the expected maximal theoretical ethanol yield (*i.e.*  $0.60$   
 13  
 14  $\text{Cmol.Cmol}^{-1}$ ). Figure 3 shows the experimental ethanol yields obtained for each steady  
 15  
 16 state in comparison with the maximal theoretical ethanol yields calculated by the  
 17  
 18 metabolic model in exclusive reductive conditions (*i.e.* only  $CO_2$  and ethanol  
 19  
 20 production).  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30

31  $Y_{\text{ethanol/xylose}}$  increased as  $Y_{O_2/xylose}$  decreased as predicted by the model. The flux through  
 32  
 33 the TCA cycle (r88) decreased and the carbon flux was directed from the biomass to  
 34  
 35 ethanol.  $Y_{\text{ethanol/xylose}}$  in the three steady states attained 50, 72 and 85% of  $Y_{\text{ethanol/xylose}}$   
 36  
 37 calculated respectively. In oxido-reductive conditions, mainly producing biomass,  
 38  
 39 ethanol and  $CO_2$ , a linear correlation ( $R^2 = 0.9997$ ) between the experimental  
 40  
 41  $Y_{\text{ethanol/xylose}}$  and  $Y_{O_2/xylose}$  was found (eq. 3) :

$$Y_{\text{ethanol/xylose}} = -0.3027 * Y_{\text{oxygen/xylose}} + 0.6524 \quad (\text{equation 3})$$

42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47 In chemostat culture conditions for  $Y_{O_2/xylose}$  equal to  $0.33 \text{ mol.mol}^{-1}$ , the calculated  
 48  
 49 maximal ethanol yield would be  $0.55 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$  *i.e.* 88% of the theoretical yield in  
 50  
 51 fully reductive mode. The residual part of the carbon was due to biomass formation  
 52  
 53 which occurred under these oxido-reductive culture conditions.  
 54  
 55  
 56  
 57

#### 58 **4. CONCLUSION**

1 A metabolic model was successfully developed on *Candida shehatae* for the description  
 2 of xylose metabolism. A coefficient *coeffnadph* originally represented the dependence  
 3  
 4 of the XR on two cofactors. The network structure was validated on experimental data  
 5  
 6 (discrepancy < 5.1%).  
 7  
 8

9  
 10 The model resolution gave a range of between 0.33 and 2 mol.mol<sup>-1</sup> for Y<sub>O<sub>2</sub>/xylose</sub>. An  
 11 ethanol yield of 0.51 Cmol.Cmol<sup>-1</sup> (*i.e.* 85% of the maximal ethanol yield) was obtained  
 12  
 13 in chemostat cultures at Y<sub>O<sub>2</sub>/xylose</sub> = 0.47 mol.mol<sup>-1</sup> controlling both the oxygen and  
 14  
 15 xylose uptake. Pure conversion of xylose into ethanol would be expected for a Y<sub>O<sub>2</sub>/xylose</sub>  
 16  
 17 = 0.33 mol.mol<sup>-1</sup>.  
 18  
 19  
 20  
 21

## 22 **5. ACKNOWLEDGMENTS**

23  
 24 This work was carried out as part of the FUTUROL PROJECT and the authors want to thank  
 25  
 26 OSEO Innovation for its financial support and Dr P. Winterton for help in preparing the  
 27  
 28 English manuscript.  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39

## 40 **6. REFERENCES**

- 41 1. Abu-Elteen, K., Whittaker, P., 1997. Effect of sub-inhibitory concentration of  
 42 chlorhexidine on lipid and sterol composition of shape *Candida albicans*.  
 43 Mycopathologia 140, 69 - 76.
- 44 2. Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E., Uribebarrea, J.L., Goma, G.,  
 45 Benbadis, L., 2002. Improving ethanol production and viability of  
 46 *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch  
 47 process. Applied Microbiology and Biotechnology 60, 67 - 72.
- 48 3. Atkinson, B., Mavituna, F., 1983. Biochemical engineering and biotechnology  
 49 handbook. Macmillan Publishers Ltd.
- 50 4. Bakker, B.M., Overkamp, K.M., van Maris, A.J.A., Kötter, P., Luttik, M.A.H.,  
 51 van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 2001. Stoichiometry and compartmentation of  
 52 NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews  
 53 25, 15-37.  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59

- 1 5. Bideaux, C., Alfenore, S., Cameleyre, X., Molina-Jouve, C., Uribe Larrea, J.-L.,  
2 Guillouet, S.E., 2006. Minimization of glycerol production during the high-  
3 performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces*  
4 *cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. Applied and  
5 Environmental Microbiology 72, 2134 - 2140.
- 6 6. Bideaux, C., Goma, G., Uribe Larrea, J.-L., Dahhou, B., Roux, G., 2008.  
7 Stoichiometric modelling approach for microbial cultures monitoring.  
8 International Journal of Modelling, Identification and Control 3, 413 - 426.
- 9 7. Bruinenberg, P.M., Bot, P.H.M., Dijken, J.P., Scheffers, W.A., 1983. The role of  
10 redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. Applied  
11 Microbiology and Biotechnology 18, 287 - 292.
- 12 8. Bruinenberg, P.M., Bot, P.H.M., Dijken, J.P., Scheffers, W.A., 1984. NADH-  
13 linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by  
14 yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology 19, 256 - 260.
- 15 9. Bruinenberg, P.M., Van Dijken, J.P., Gijs Kuenen, J., Scheffers, W.A., 1985.  
16 Oxidation of NADH and NADPH by mitochondria from the yeast *Candida*  
17 *utilis*. Journal of General Microbiology 131, 1043 - 1051.
- 18 10. Carnicer, M., Baumann, K., Topf, I., Sanchez-Ferrando, F., Mattanovich, D.,  
19 Ferrer, P., Albiol, J., 2009. Macromolecular and elemental composition analysis  
20 and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different  
21 oxygen levels. Microbial Cell Factories 8, 65 - 79.
- 22 11. Castro, A.C., Sinskey, A.J., Tannenbaum, S.R., 1971. Reduction of nucleic acid  
23 content in *Candida* yeast cells by bovine pancreatic ribonuclease A treatment.  
24 Applied Microbiology 22, 422 - 427.
- 25 12. Celton, M., Goelzer, A., Camarasa, C., Fromion, V., Dequin, S., 2012. A  
26 constraint-based model analysis of the metabolic consequences of increased  
27 NADPH oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic Engineering 14, 366  
28 - 379.
- 29 13. Du Preez, J.C., Driessels, B., Prior, B.A., 1989. Effect of aerobiosis on  
30 fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida*  
31 *shehatae* and *Candida tenuis* on D-xylose. Archives of Microbiology 152, 143 -  
32 147.
- 33 14. Du Preez, J.C., van der Walt, J.P., 1983. Fermentation of D-xylose to ethanol by  
34 a strain of *Candida shehatae*. Biotechnology Letters 5, 357 - 362.
- 35 15. DuPreez, J.C., Driessels, B., Prior, B.A., 1989. Ethanol tolerance of *Pichia*  
36 *stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low  
37 dissolved oxygen levels. Applied Microbiology and Biotechnology 30, 53 - 58.
- 38 16. Evans, C., Ratledge, C., 1984. Induction of xylulose-5-phosphate  
39 phosphoketolase in a variety of yeasts grown on D-xylose: the key to efficient  
40 xylose metabolism. Archives of Microbiology 139, 48 - 52.
- 41 17. Fromanger, R., Guillouet, S.E., Uribe Larrea, J.L., Molina-Jouve, C., Cameleyre,  
42 X., 2010. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae*  
43 physiology for ethanol production from xylose and glucose. J. Ind. Microbiol.  
44 Biotechnol. 37, 437 - 445.
- 45 18. Galafassi, S., Merico, A., Pizza, F., Hellborg, L., Molinari, F., Piekur, J.,  
46 Compagno, C., 2011. Dekkera/Brettanomyces yeasts for ethanol production  
47 from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. J. Ind.  
48 Microbiol. Biotechnol. 38, 1079 - 1088.

19. Granström, T., Aristidou, A.A., Leisola, M., 2002. Metabolic Flux Analysis of *Candida tropicalis* growing on xylose in an oxygen-limited chemostat. *Metabolic Engineering* 4, 248 - 256.
20. Granström, T.B., Aristidou, A.A., Jokela, J., Leisola, M., 2000. Growth characteristics and metabolic flux analysis of *Candida milleri*. *Biotechnology and Bioengineering* 70, 197 - 207.
21. Lange, H.C., Heijnen, J.J., 2001. Statistical reconciliation of elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 75, 334 - 344.
22. Llaneras, F., Pici, J., 2008. Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105, 1-11.
23. Nissen, T.L., Schulze, U., Nielsen, J., Villadsen, J., 1997. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 203 - 218.
24. Pagliardini, J., Hubmann, G., Alfenore, S., Nevoigt, E., Bideaux, C., Guillouet, S.E., 2013. The metabolic costs of improving ethanol yield by reducing glycerol formation capacity under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 12, 29.
25. Passoth, V., Zimmermann, M., Klinner, U., 1996. Peculiarities of the regulation of fermentation and respiration in the crabtree-negative, xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-8, 201-212.
26. Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988. *Microbial lipids*. Academic Press, London.
27. Rattray, J.B., Schibeci, A., Kidby, D.K., 1975. Lipids of yeasts. *Bacteriological reviews* 39, 197-231.
28. Sánchez, S., Bravo, V., Castro, E., Moya, A.J., Camacho, F., 1997. The influence of pH and aeration rate on the fermentation of xylose by *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology* 21, 355-360.
29. Singh, A., Mishra, P., 1995. *Microbial pentose utilization: current applications in biotechnology*. Elsevier Science.
30. Slininger, P.J., Bothast, R.J., Okos, M.R., Ladisch, M.R., 1985. Comparative evaluation of ethanol production by xylose fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnology Letters* 7, 431-436.
31. Thorpe, R.F., Ratledge, C., 1972. Fatty acid distribution in triglycerides of yeasts grown on glucose or n-alkanes. *Journal of General Microbiology* 72, 151-163.
32. Toivola, A., Yarrow, D., Van Den Bosch, E., Van Dijken, J.P., Scheffers, W.A., 1984. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Applied Environmental Microbiology* 47, 1221-1223.
33. Unrean, P., Nguyen, N.A., 2012. Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94, 1387-1398.
34. Van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., 1995. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering* 48, 681 - 698.
35. Verduyn, C., Stouthamer, A.H., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P., 1991. A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 59, 49 - 63.

**Figure****Captions**

Table 1: Enzymatic activity of xylose reductase in *Candida shehatae* strain from the literature.

Table 2: Elemental composition of the macromolecules.

Table 3: Main characteristics of the chemostat experiment.

Figure 1: Evolution of substrate and product masses during the validation experiment.

Experimental values: ◆ xylose (g), ● biomass (g), Δ ethanol (g), □ xylitol (g) –

Reconciled values: dashed lines.

Figure 2: Comparison of experimental and calculated rates for two simulations: (thin line) Malate-aspartate shuttle model calculated rates, (thick line) Ethanol-acetaldehyde shuttle model calculated rates, ○ biomass experimental rate, ◇ CO<sub>2</sub> experimental rate.

Figure 3: Comparison of theoretical ethanol yield and experimental chemostat ethanol yield versus oxygen yield. The steady state yields are plotted in solid squares and the theoretical relationship is a solid line. The limits of validity are plotted as a dashed line.

## Table

Table 1: Enzymatic activity of xylose reductase in *Candida shehatae* strain from the literature.

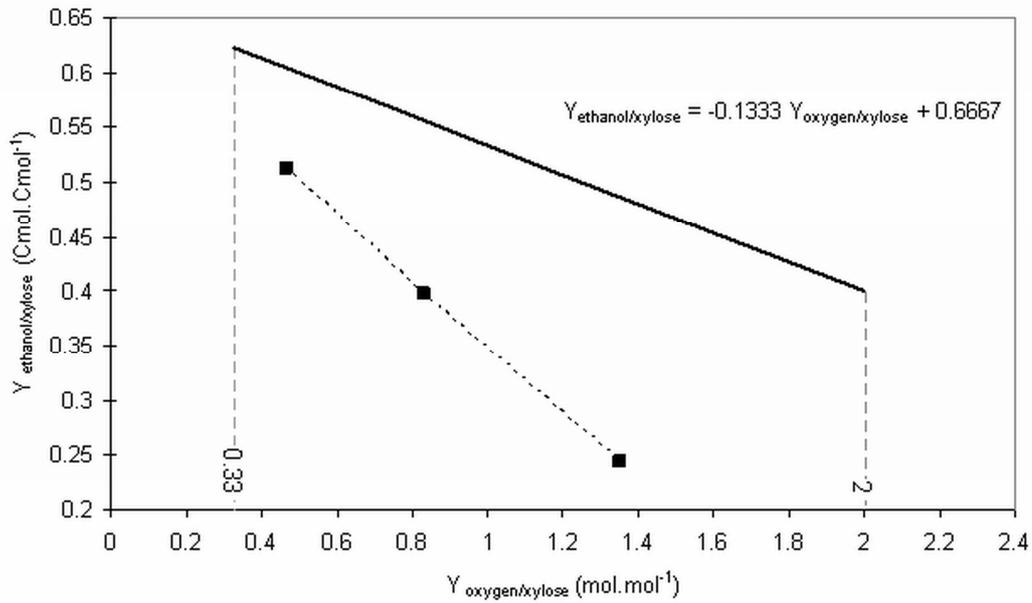
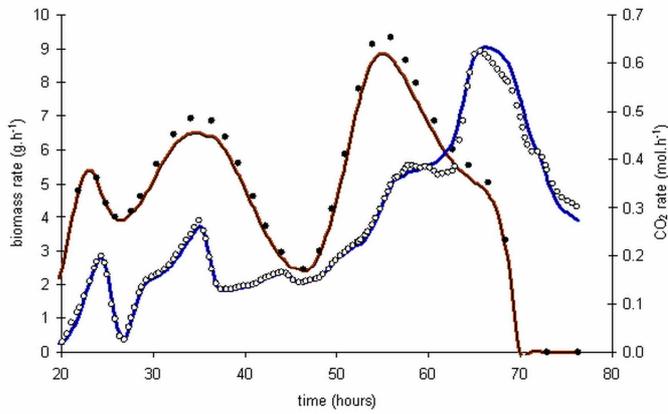
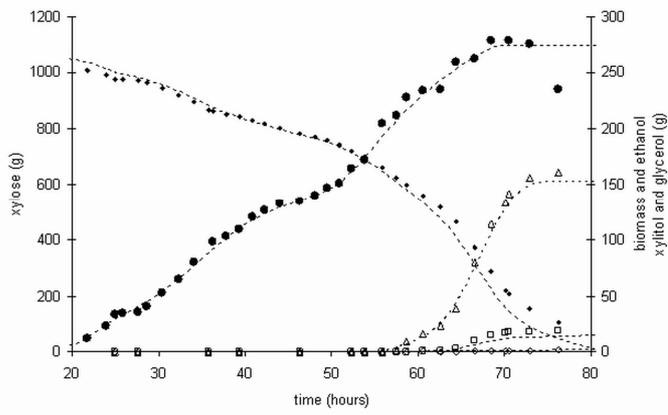
<i>C. shehatae</i> strain	xylose reductase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ )		Calculated <i>coeffnadph</i>	Condition	References
	NADH	NADPH			
CSIR Y 492	0.37	0.58	0.61	aerobic	DuPreez <i>et al.</i> ,(1989)
	0.28	0.54	0.66	micro-aerobic	
	0.28	0.51	0.65	anoxic	
ATCC 22984	0.07	0.28	0.8	aerobic	Alexander <i>et al.</i> ,(1988)
	0.08	0.31	0.79	micro-aerobic	
	0.1	0.33	0.77	anoxic	
CSIR Y 1632	4.93	3.4	0.41	micro-aerobic	Yablochkova <i>et al.</i> ,(2003)
CSIR Y 1632	3.1	4.81	0.61	aerobic	Yablochkova <i>et al.</i> ,(2004)
	4.93	3.4	0.41	micro-aerobic	
	2.31	5.02	0.68	anoxic	
CBS 5813	0.21	0.48	0.69	aerobic	Bruinenberg <i>et al.</i> ,(1984)
ATCC 22984	0.3	0.48	0.62	anoxic	Fromanger <i>et al.</i> ,(2010)
ATCC 22984	0.11	0.21	0.66	Oxygen Transfer Rate descending in flask cultures	Girio <i>et al.</i> ,(1989)
	0.15	0.29	0.66		
	0.13	0.26	0.67		
	0.13	0.33	0.72		
	0.1	0.23	0.68	aerobic	
	0.14	0.35	0.71	micro-aerobic	
	0.33	0.87	0.73	anoxic	

Table 2: Elemental composition of the macromolecules.

	C	H	O	N	P	S	calculated % wt in dry biomass
protein	1	1.57	0.35	0.3	0.01	0.0018	0.5307
carbohydrates	1	1.67	0.83	0	0	0	0.3461
lipids	1	1.85	0.14	0.0051	0.0076	0	0.0426
RNA	1	1.23	0.73	0.4	0.1	0	0.0778
DNA	1	1.26	0.61	0.38	0.1	0	0.0028
Calculated elementary biomass composition	1	1.82	0.60	1.178	0.01	0.001	
Analyzed elementary biomass composition	1	1.86 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.184 ± 0.003	0.02	0.002	

Table 3: Main characteristics of the chemostat experiment.

	Steady state 1	Steady state 2	Steady state 3
dilution rates ( $\text{h}^{-1}$ )	0.039 ± 0.006	0.039 ± 0.007	0.09 ± 0.01
qS ( $\text{mmol xylose}\cdot\text{gX}\cdot\text{h}^{-1}$ )	3.95 ± 0.04	2.037 ± 0.002	2.61 ± 0.01
qO <sub>2</sub> ( $\text{mmol O}_2\cdot\text{gX}\cdot\text{h}^{-1}$ )	1.86 ± 0.03	1.696 ± 0.004	3.52 ± 0.01
Y oxygen/xylose ( $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	0.47 ± 0.03	0.83 ± 0.01	1.35 ± 0.05
Y ethanol/xylose ( $\text{Cmol}\cdot\text{Cmol}^{-1}$ )	0.512 ± 0.001	0.397 ± 0.001	0.245 ± 0.002
Y biomass/xylose ( $\text{Cmol}\cdot\text{Cmol}^{-1}$ )	0.103 ± 0.001	0.197 ± 0.001	0.279 ± 0.04
Y CO <sub>2</sub> /xylose ( $\text{Cmol}\cdot\text{Cmol}^{-1}$ )	0.358 ± 0.001	0.3797 ± 0.0003	0.413 ± 0.004
Y acids/xylose ( $\text{Cmol}\cdot\text{Cmol}^{-1}$ )	0.003 ± 0.001	0.001 ± 0.0004	0.019 ± 0.006
Y xylitol+glycerol/xylose ( $\text{Cmol}\cdot\text{Cmol}^{-1}$ )	0.024 ± 0.003	0.024 ± 0.002	0.044 ± 0.001



### 3.4. Les résultats des modèles

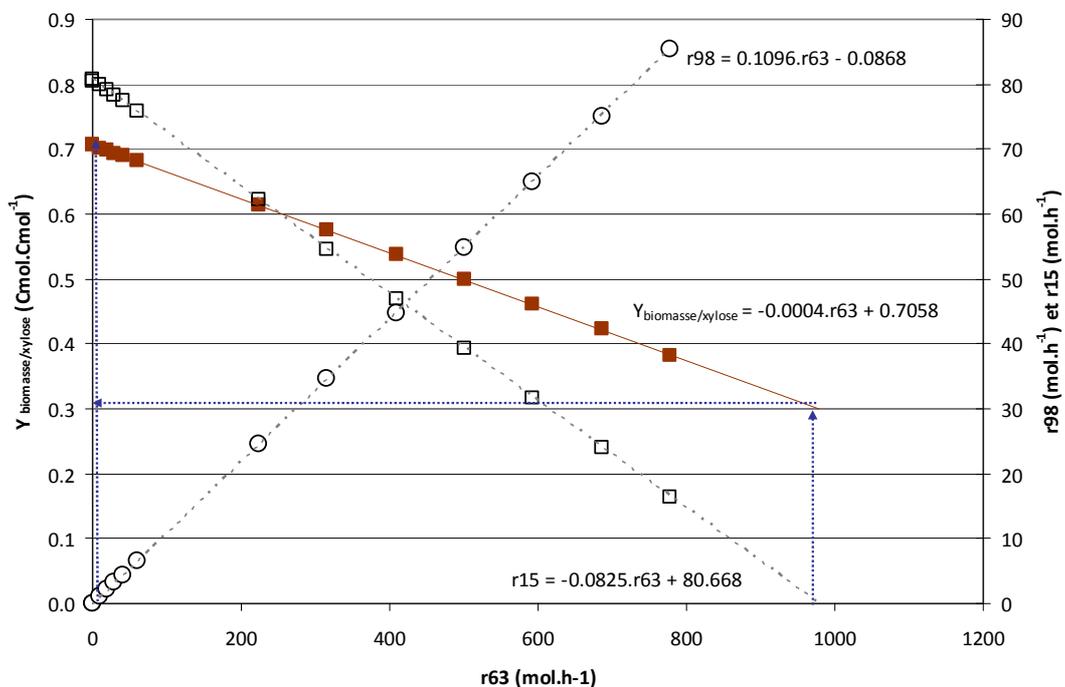
Après validation, le modèle métabolique développé pour *C.shehatae* est utilisé pour calculer les rendements théoriques limite de production d'éthanol (cf. publication) et de biomasse en prenant en compte l'équilibre oxydo-réductif intracellulaire. La structure du modèle tient compte de la dualité des cofacteurs NADH et NADPH de la xylose réductase sur le métabolisme via le *coeffnadph* inséré dans le modèle. Des études par simulation sont réalisées afin de quantifier l'impact de ce coefficient sur la répartition des flux et sur les rendements théoriques limite sous différentes conditions théoriques de fonctionnement (du métabolisme purement oxydatif à un métabolisme purement réductif). Certaines réactions considérées comme thermodynamiquement irréversibles permettent de fixer les limites biologiquement acceptables de fonctionnement du métabolisme et donc de déterminer les performances maximales qu'il est alors possible d'atteindre. Ces réactions concernent la partie oxydative des pentoses-phosphates (glucose-6-phosphate  $\rightarrow$  ribulose-5-phosphate, notée r15), la réaction catalysée par la pyruvate déshydrogénase (notée r88) et l'oxydation du FADH<sub>2</sub> dans la chaîne respiratoire (notée r98). Ces flux intracellulaires ne peuvent être que positifs ou nuls.

#### 3.4.1. Calcul du rendement théorique limite de production de biomasse

Ces simulations sont réalisées en supposant un métabolisme purement oxydatif (appelé « croissance » où la réaction produit seulement du CO<sub>2</sub> et de la biomasse). Le *coeffnadph* est fixé à 0.67, correspondant à des conditions de cultures aérobies (cf. publication). Le degré de liberté du système est de 8, aussi huit vitesses sont nécessaires à la résolution du système. Les vitesses suivantes sont imposées, la 8<sup>ème</sup> vitesse prenant plusieurs valeurs :

- $r_{XYLOSE} = -100 \text{ mol.h}^{-1}$
- $r_{PRODUITS} = 0 \text{ mol. h}^{-1}$  (les produits sont : acide acétique, succinique et pyruvique, xylitol, glycérol et éthanol)
- Le choix de la huitième vitesse se base sur l'hypothèse que la maintenance énergétique (*r63*) est faible en condition de croissance maximale et sans stress. La variation pour la valeur du flux de maintenance a été fixée entre  $0 \text{ mol}_{ATP} \cdot \text{h}^{-1}$  et un flux maximal de  $800 \text{ mol}_{ATP} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Chaque résolution permet alors d'obtenir des valeurs de flux intracellulaires, notamment pour les vitesses  $r_{15}$ ,  $r_{88}$  et  $r_{98}$  qui sont spécifiquement examinées (respectivement partie oxydative des PP, pyruvate déshydrogénase et oxydation du  $FADH_2$  dans la chaîne respiratoire). Pour ces conditions, seuls les flux intracellulaires  $r_{15}$  et  $r_{98}$  s'avèrent déterminants et sont représentés sur la Figure 25. Par ailleurs, l'analyse de flux permet entre autre de déterminer le rendement théorique en biomasse par rapport au xylose ( $Y_{\text{biomasse/xylose}}$ ) qui est également tracé en fonction des valeurs imposées pour  $r_{63}$  (Figure 25).



**Figure 25.** Rendement en biomasse ( $\blacksquare$ ), flux  $r_{15}$  dans la partie oxydative des PP  $r_{15}$  ( $\square$ ) et du  $FADH_2$  dans la chaîne respiratoire  $r_{98}$  ( $\circ$ ) simulés en mode oxydatif pur (i.e. production de biomasse et  $CO_2$  exclusivement). Le coefficient  $\eta$  est fixé à 0.67. Le flux  $r_{63}$  varie entre 0 et 800  $mol.h^{-1}$  et chaque point correspond à une valeur de flux  $r_{63}$  imposée. Les flèches correspondent aux limites imposées par le sens thermodynamique possible des réactions  $r_{98}$  et  $r_{15}$ .

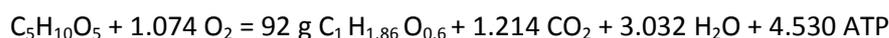
L'analyse de la figure montre alors deux limites thermodynamiques dans les conditions testées. La première limite est imposée par le flux d'oxydation du  $FADH_2$  dans la chaîne respiratoire ( $r_{98}$ ). La forte demande en  $\alpha$ -cétoglutarate, précurseur des acides aminés, entraîne une diminution des flux en aval du Cycle de Krebs et par conséquent la diminution du

flux de FADH<sub>2</sub> oxydé dans la chaîne respiratoire jusqu'à atteindre une valeur nulle. Dans ces conditions, le rendement théorique limite de production de biomasse en prenant en compte l'équilibre oxydo-réductif propre à la souche est donc de **0.705 Cmol<sub>biomasse</sub>.Cmol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup> (soit 0.61 g.g<sup>-1</sup>)**. La maintenance cellulaire est alors de 1 mol<sub>ATP</sub>.h<sup>-1</sup> soit 0.01 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>.

Cette valeur peut être comparée à celle obtenue dans les travaux de Santos *et al.*, (2003) lors de cultures de *Candida guilliermondii* sur xylose en condition de croissance avec des apports variables d'oxygène. Les auteurs estiment la maintenance à 0.13 mol<sub>ATP</sub>.g<sub>biomasse</sub><sup>-1</sup> soit 9.95 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>, en considérant Y<sub>biomasse/xylose</sub> de 0.51 g.g<sup>-1</sup>. La valeur obtenue ici pour *C.shehatae* est 1000 fois plus faible que celle calculée par Santos *et al.*, (2003), traduisant bien un métabolisme purement oxydatif tourné vers la production de biomasse seule, sans dissipation énergétique.

Par ailleurs, le rendement en biomasse calculé est supérieur à celui annoncé dans la littérature (0.51 g.g<sup>-1</sup> soit 0.59 Cmol.Cmol<sup>-1</sup>). D'après la relation calculée par notre modèle (Figure 25), ce rendement de la littérature correspondrait à une valeur de flux pour la maintenance de 291 mol.h<sup>-1</sup> soit 2.91 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>. Cette valeur serait donc 3.5 fois plus faible que celle calculé par Santos *et al.*, (2003) pour *C.guilliermondii*.

Ces valeurs conduisent à un quotient respiratoire de 1.13 molCO<sub>2</sub>.molO<sub>2</sub><sup>-1</sup> lorsque le rendement est maximal. Le bilan énergétique du métabolisme oxydatif calculé dans cette condition maximale de production peut s'écrire :



D'après l'analyse de flux, 40 % de l'ATP formé vient de la glycolyse et 60 % provient de la chaîne respiratoire. Le rendement en ATP est alors de 20.3 g<sub>biomasse</sub>.mol<sub>ATP</sub><sup>-1</sup>. Dans la littérature, le Y<sub>ATP</sub><sup>max</sup> théorique calculé pour *Candida utilis*, en condition de croissance aérobie sur glucose, est de 20.8 g<sub>biomasse</sub>.mol<sub>ATP</sub><sup>-1</sup> (Verduyn *et al.*, 1991). Le rendement en ATP théorique limite calculé par le modèle concorde avec cette valeur théorique obtenue dans la littérature.

La valeur limite inférieure déterminée par le modèle correspond à un rendement Y<sub>biomasse/xylose</sub> égal à 0.31 Cmol<sub>biomasse</sub>.Cmol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup> (soit 0.27 g.g<sup>-1</sup>). Cette valeur est imposée par la valeur limite du flux intracellulaire dans la voie oxydative des PP (r15 nulle). La diminution du rendement en biomasse s'accompagne d'une forte augmentation du flux global dans le Cycle de Krebs et du

flux de maintenance cellulaire dont la valeur correspond alors à celle référencée dans la littérature ( $9.8 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ ). Avec la diminution de l'activité dans la voie des PP, la régénération du NADPH est alors rendue possible par l'augmentation du flux via l'isocitrate déshydrogénase. Cette limite signifie qu'en dessous de ce rendement, le métabolisme est obligatoirement oxydo-réductif. Le quotient respiratoire est alors de  $1.03 \text{ molCO}_2 \cdot \text{molO}_2^{-1}$ .

Lorsque la limite inférieure est atteinte ( $r_{15}$  nul et  $Y_{\text{biomasse/xylose}}$  à  $0.27 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), les résultats issus du modèle montrent que le bilan énergétique peut s'écrire :



D'après l'analyse de flux, 23 % de l'ATP formé vient de la glycolyse et 77 % provient de la chaîne respiratoire et du Cycle de Krebs. Ce bilan permet d'obtenir un rendement en ATP de  $15.5 \text{ g}_{\text{biomasse}} \cdot \text{mol}_{\text{ATP}}^{-1}$  soit un rendement inférieur à la valeur théorique de la littérature (Verduyn *et al.*, 1991) mais proche du rendement ATP expérimental déterminé dans les travaux de Carvalho *et al.*, (2005) : au début de la croissance de *Candida guilliermondii* sur un hydrolysats contenant du xylose, le  $Y_{\text{ATP}}$  calculé par ces auteurs à partir de données expérimentales est de  $12.4 \text{ g}_{\text{biomasse}} \cdot \text{mol}_{\text{ATP}}^{-1}$ .

Compte tenu de ces simulations, il est alors possible de définir un intervalle du quotient respiratoire compris entre 1.03 et 1.13  $\text{molCO}_2 \cdot \text{molO}_2^{-1}$  révélateur d'un métabolisme purement oxydatif. Ces résultats montrent que les rendements énergétiques en métabolisme oxydatif sur xylose sont compris entre 4.43 et 3.37 moles d'ATP par mole de xylose soit environ 4 fois plus faibles que les valeurs données dans le cas de l'oxydation complète d'une mole de xylose sans production de biomasse (cf. Analyse bibliographique, 1.1, page 27).

### 3.4.2. Calcul du rendement théorique limite de production d'éthanol

Cette partie reprend certains résultats de la publication (page 15) et apporte des compléments d'informations.

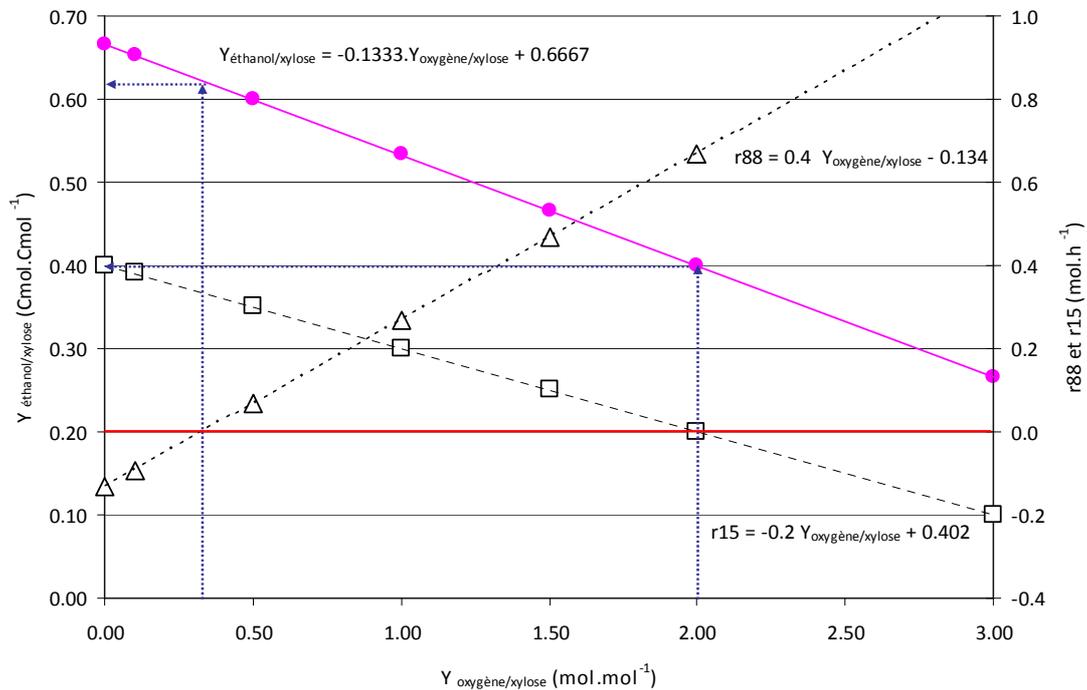
Différentes simulations ont permis de prédire la vitesse nette de production d'éthanol en conditions théoriques où l'éthanol et le  $\text{CO}_2$  seraient les seuls produits du métabolisme *i.e.* en mode strictement réductif. Le *coeffnadph* est fixé à 0.67. Les sept vitesses nettes imposées au

modèle sont les suivantes et la 8<sup>ème</sup> vitesse correspond à la vitesse de consommation d'oxygène :

- $r_{XYLOSE} = -100 \text{ mol.h}^{-1}$
- $r_{PRODUITS} = 0 \text{ mol.h}^{-1}$  (Les produits sont : acide acétique, succinique et pyruvique, xylitol, glycérol et biomasse)
- L'hypothèse pour la huitième vitesse est posée sur le flux d'oxygène  $r_{O_2}$ , variant entre 0 et  $300 \text{ mol.h}^{-1}$ , ce qui correspond à un intervalle de rendements en oxygène de 0 à  $3 \text{ mol}_{oxygène} \cdot \text{mol}_{xylose}^{-1}$ .

Par ailleurs, l'analyse bibliographique a en effet mis en évidence que le flux d'oxygène avait un rôle prépondérant dans le métabolisme réductif. Unrean & Nguyen,(2012) ont exprimé la variation du rendement en éthanol en fonction du rendement en oxygène/xylose dans un intervalle compris entre 0 et  $6 \text{ mol}_{oxygène} \cdot \text{mol}_{xylose}^{-1}$ .

Les vitesses de consommation d'oxygène  $r_{O_2}$  imposées dans l'intervalle fixé permettent alors de calculer les valeurs de flux intracellulaires. L'analyse des flux permet de dégager deux vitesses dont le sens thermodynamiquement possible permet alors de fixer les limites du métabolisme réductif : voie oxydative des pentoses-phosphates (PP) (r15) et réaction catalysée par la pyruvate déshydrogénase (r88). L'évolution de ces vitesses est représentée en fonction du rendement d'oxygène par rapport au xylose ( $Y_{oxygène/xylose}$ ) sur la Figure 26. Le rendement théorique en éthanol est calculé à partir des valeurs obtenues par le modèle et tracé en fonction du  $Y_{oxygène/xylose}$ .



**Figure 26. Simulation du rendement théorique limite en éthanol (●), du flux via la pyruvate déshydrogénase  $r_{88}$  (△) et du flux de glucose-6-phosphate dans la voie oxydative des pentoses phosphates  $r_{15}$  (□) en fonction du rendement oxygène sur xylose (mol.mol<sup>-1</sup>) avec le coefficient fixé à 0.67. Les flèches indiquent les limites de validité de la relation due au sens thermodynamique.**

Les différentes simulations montrent que le flux via la pyruvate déshydrogénase ( $r_{88}$ ) est nul pour une vitesse  $r_{O_2}$  de 33.5 mol.h<sup>-1</sup> soit un  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$  de 0.33 mol<sub>oxygène</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>. Cette limite montre donc que la production exclusive d'éthanol en anaérobie stricte est impossible car elle entraînerait un flux négatif dans cette voie. Le modèle confirme donc l'incapacité de *C.shehatae* à produire de l'éthanol en anaérobie stricte, comme cela avait été soulevé par les travaux de DuPreez,(1994).

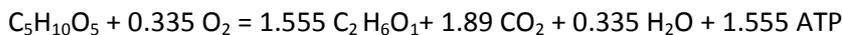
Le flux de glucose-6-phosphate entrant dans la voie oxydative des PP ( $r_{15}$ ) devient nul pour un  $Y_{O_2/xylose}$  de 2 mol<sub>oxygène</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>, le mode réductif pur n'est plus possible au delà de ce rendement car un flux négatif dans cette voie est thermodynamiquement impossible. Le rendement en éthanol est alors de 0.40 Cmol<sub>éthanol</sub>.Cmol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup> et le QR est de 1.5 molCO<sub>2</sub>.molO<sub>2</sub><sup>-1</sup>. Au vu des résultats obtenus précédemment, à savoir une valeur de QR

comprise entre 1.03 et 1.13 molCO<sub>2</sub>.molO<sub>2</sub><sup>-1</sup> lors du métabolisme oxydatif (cf. 3.4.1), le contrôle du QR pourrait constituer un paramètre de régulation de la transition respiro-fermentaire.

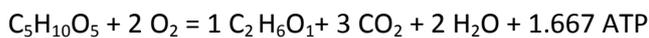
Le rendement théorique limite de production d'éthanol diminue linéairement avec l'augmentation du rendement en oxygène ( $Y_{\text{éthanol/xylose}} = -0.1333 * Y_{\text{O}_2/\text{xylose}} + 0.667$ ) et le maximum admissible est de **0.622 Cmol<sub>éthanol</sub>.Cmol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup> (soit 0.477 g.g<sup>-1</sup>)**. Le quotient respiratoire est alors de 5.6 molCO<sub>2</sub>.molO<sub>2</sub><sup>-1</sup>.

La diminution du rendement en oxygène concorde avec l'augmentation du flux via le complexe de la pyruvate décarboxylase. Ce résultat est corroboré par l'observation de Passoth *et al.*, (1996), qui montrent que la diminution de la pression partielle en O<sub>2</sub> entraîne une augmentation de l'activité de cette enzyme (cf. 1.2.4).

Le bilan énergétique du métabolisme oxydo-réductif, quand le rendement maximal en éthanol (0.622 Cmol<sub>éthanol</sub>.Cmol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>) est atteint est :

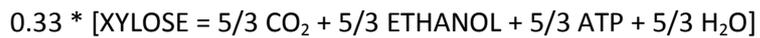


Lorsque le rendement en éthanol est de 0.40 Cmol<sub>éthanol</sub>.Cmol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>, le bilan énergétique est :



Dans ces conditions, en l'absence de production de biomasse, le rendement ATP est faible et varie entre 1.55 et 1.67 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>. Ce rendement se situe dans la gamme indiquée dans l'étude bibliographique (cf. 1.1 page 27). En effet, Rizzi *et al.*, (1989) et Van Dijken & Scheffers, (1986) obtiennent une valeur de rendement de 1.67 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>, le premier en posant l'hypothèse d'une XR strictement NADH et le second en posant l'hypothèse d'une phosphokétolase, les auteurs se plaçant en conditions de métabolisme réductif anaérobie. Les travaux de Kuyper *et al.*, (2004), en prenant l'hypothèse d'une XR strictement NADPH dépendante concluent à un rendement compris en 0.75 et 2.85 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>, la première valeur est obtenue dans l'hypothèse d'un métabolisme oxydo-réductif, avec un rapport P/O de 1.35 mol<sub>ATP</sub>.mol<sub>O</sub><sup>-1</sup> et la seconde valeur est obtenue dans l'hypothèse d'une excrétion de xylitol conduisant à l'équilibre du NADH au niveau de l'XDH. Les valeurs obtenues ici sont donc en adéquation avec les résultats de la littérature. Les calculs théoriques limites sont effectués

avec un *coeffnadph* de 0.67, signifiant que 33 % de l'activité de la XR est NADH dépendante. En reprenant les bilans théoriques du métabolisme du xylose (cf. 1.1 page 27), les équations s'écriraient comme ci-dessous, avec une XR strictement NADPH dépendante et une XR strictement NADH dépendante :



Le bilan énergétique conduirait à une production directe de 1.67 moles d'ATP par mole de xylose et 0.67 mole de NADH à régénérer par la chaîne respiratoire, conduisant à un rendement maximal de  $2.57 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ . La différence entre cette valeur et celles obtenues par le modèle pourrait s'expliquer par une dissipation énergétique liée à la maintenance. L'analyse des cartes de flux métaboliques pourra permettre de vérifier ces hypothèses.

### **3.5. Etude de l'impact des cofacteurs de la xylose réductase sur le métabolisme**

La dualité des cofacteurs NADH et NADPH de la XR a été intégrée dans le modèle via un coefficient symbolique *coeffnadph*. Pour l'ensemble des simulations liées à l'obtention des rendements théoriques limite, cette valeur a été fixée à 0.67 correspondant, au vu de la bibliographie, à des conditions aérobies (cf. publication et 1.3.3.1). La phase de validation des deux modèles (basés sur deux navettes cytosol-mitochondrie) n'a pas permis de discriminer ces deux modèles sur la base des vitesses nettes extracellulaires. Néanmoins, de par le choix de ces navettes, le transport cytosol/mitochondrie est différent pour plusieurs composés : le glutamate, l' $\alpha$ -cétoglutarate et l'oxaloacétate, ainsi que sur certains flux intracellulaires comme le flux via l'alcool déshydrogénase (r10), le flux via l'aspartate aminotransférase (r23) et le flux via la malate déshydrogénase mitochondriale (r95). Dans les modèles, la voie citrate -  $\alpha$ -cétoglutarate est NADPH dépendante et permet d'échanger ce cofacteur entre le cytosol et la mitochondrie (réaction r78 et r90). La navette malate – aspartate fait intervenir, outre le malate et l'aspartate, l'oxaloacétate.

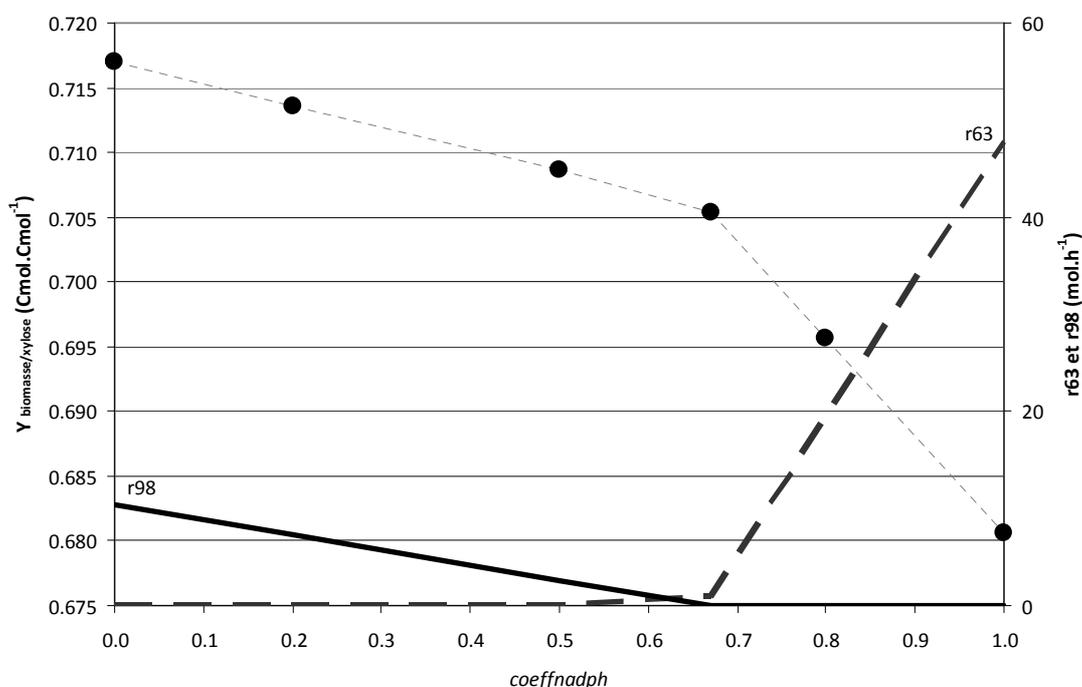
Plusieurs simulations ont donc été réalisées en faisant varier la valeur du *coeffnadph* et quantifier son impact sur les rendements théoriques limite et sur les flux intracellulaires calculés par chacun des deux modèles élaborés.

#### **3.5.1. Impact du *coeffnadph* en condition de croissance**

Les simulations ont été réalisées en fixant les vitesses suivantes comme précédemment (3.4.1) :

- $r_{XYLOSE} = -100 \text{ mol.h}^{-1}$
- $r_{PRODUITS} = 0 \text{ mol. h}^{-1}$  (les produits sont : acide acétique, succinique et pyruvique, xylitol, glycérol et éthanol)
- La maintenance énergétique (r63) varie entre 0 à  $800 \text{ mol}_{ATP} \cdot \text{h}^{-1}$
- Le *coeffnadph* varie entre 0 et 1

L'impact de la valeur de *coeffnadph* sur les rendements théoriques limite en biomasse est présenté dans la Figure 27. Pour chaque valeur de *coeffnadph*, différents calculs sont réalisés à différentes valeurs de maintenance cellulaire (*r63*), conduisant chacune à une valeur du rendement théorique limite en biomasse sur xylose. Le critère retenu est la valeur maximale de ce rendement pour laquelle est associée une valeur du flux *r63*. La figure suivante (Figure 27) présente donc les valeurs maximales de rendement théorique limite en biomasse obtenues pour chaque valeur de *coeffnadph* ainsi que les valeurs des flux calculés pour *r98* et retenus pour *r63*. Les résultats obtenus dans ce cas sont identiques pour les deux modèles.



**Figure 27.** Rendement biomasse sur xylose en  $\text{Cmol.Cmol}^{-1}$  (●), flux du  $\text{FADH}_2$  dans la chaîne respiratoire *r98* (trait plein) et du flux pour la maintenance cellulaire *r63* (trait pointillé) en fonction du *coeffnadph* traduisant la dualité de l'activité XR NADH et NADPH dépendantes. Calculs obtenus avec le modèle intégrant la navette éthanol-acétaldéhyde.

L'analyse de l'ensemble des flux calculés par le modèle permet de mettre en évidence des limites métaboliques notamment au niveau du flux de FADH<sub>2</sub> oxydé dans la chaîne respiratoire (r98) et du flux lié à la maintenance cellulaire (r63) (cf. 3.4.1). On observe que le rendement théorique limite en biomasse diminue lorsque *coeffnadph* augmente (*i.e.* la XR utilise préférentiellement le NADPH comme cofacteur). Le rendement maximal accessible est de  $0.7155 \text{ Cmol}_{\text{biomasse}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  pour une valeur de *coeffnadph* de 0 et de  $0.68 \text{ Cmol}_{\text{biomasse}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  pour une valeur de *coeffnadph* de 1. La diminution du rendement en biomasse est directement liée à la diminution du flux de ré-oxydation du FADH<sub>2</sub> de par la construction même du modèle où ce cofacteur est uniquement présent au niveau du Cycle de Krebs entre le succinate et le fumarate soit en aval de la synthèse d' $\alpha$ -cétoglutarate (akg), précurseur majeur dans la synthèse de la biomasse. Lorsque ce flux devient nul, soit à une valeur de *coeffnadph* correspondant à 0.67, le rendement en biomasse chute fortement et une augmentation du flux r63 est observée (dissipation d'énergie).

Les flux intracellulaires pour quatre *coeffnadph* (0, 0.5, 0.67 et 1) avec les deux modèles sont détaillés dans la Figure 28. Les flux sont normés par rapport à la biomasse ( $1000 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ ).



L'augmentation de la demande en cofacteur NADPH pour la XR (*i.e.* augmentation du *coeffnadph* de 0 à 1) entraîne une diminution par 4 du flux entre le citrate et l' $\alpha$ -cétoglutarate. Dans ces conditions, le flux global ( $r78 + r90$ ) atteint la valeur limite pour couvrir les besoins anaboliques en  $\alpha$ -cétoglutarate. Le flux dans le Cycle de Krebs diminue donc, en particulier le flux de la réaction  $r93$  (succinate vers fumarate), seule réaction productrice de  $FADH_2$ , qui devient nul pour un *coeffnadph* supérieur à 0.67, d'où un flux dans la chaîne respiratoire ( $r98$ ) qui diminue jusqu'à devenir nul lui aussi comme indiqué précédemment. Par ailleurs l'augmentation de la valeur du *coeffnadph* se traduit également par une augmentation du flux dans la partie oxydative des PP ( $r15$ ) nécessaire à la régénération du  $NADP^+$ . Le fructose-6-phosphate (F6P) généré par la voie des PP remonte alors la glycolyse et une partie du flux de carbone est dissipé en  $CO_2$  par la 6-phosphogluconate déshydrogénase ( $r15$ ) à raison de 1 mole de  $CO_2$  par mole de F6P consommée (décarboxylation du G6P en R5P). Dans la Figure 28, le flux dans la voie des PP augmente de 2.3 fois quand la valeur de *coeffnadph* varie de 0 à 1, entraînant une augmentation d'un facteur 1.24 (+ 24 %) du flux de  $CO_2$ . Le quotient respiratoire moyen, tout *coeffnadph* confondu, est de  $1.13 \pm 0.01 \text{ molCO}_2 \cdot \text{molO}_2^{-1}$ .

Le modèle possédant une navette malate montre une forte activité de la malate déshydrogénase mitochondriale permettant de fournir du NADH mitochondrial tandis que ce rôle est assuré par l'alcool déshydrogénase mitochondriale dans le cas d'une navette éthanol. Le flux au travers des deux navettes est équivalent pour les deux modèles et augmente avec la valeur de *coeffnadph*, traduisant une augmentation de la demande en  $NAD^+$  mitochondrial (de 189 à 245  $\text{mol}_{NADH}/100\text{mol}_{xylose}$  soit + 30 %). La consommation en oxygène est alors accrue (+ 26 % entre *coeffnadph* minimum et maximum) pour répondre au besoin de régénération du pouvoir réducteur.

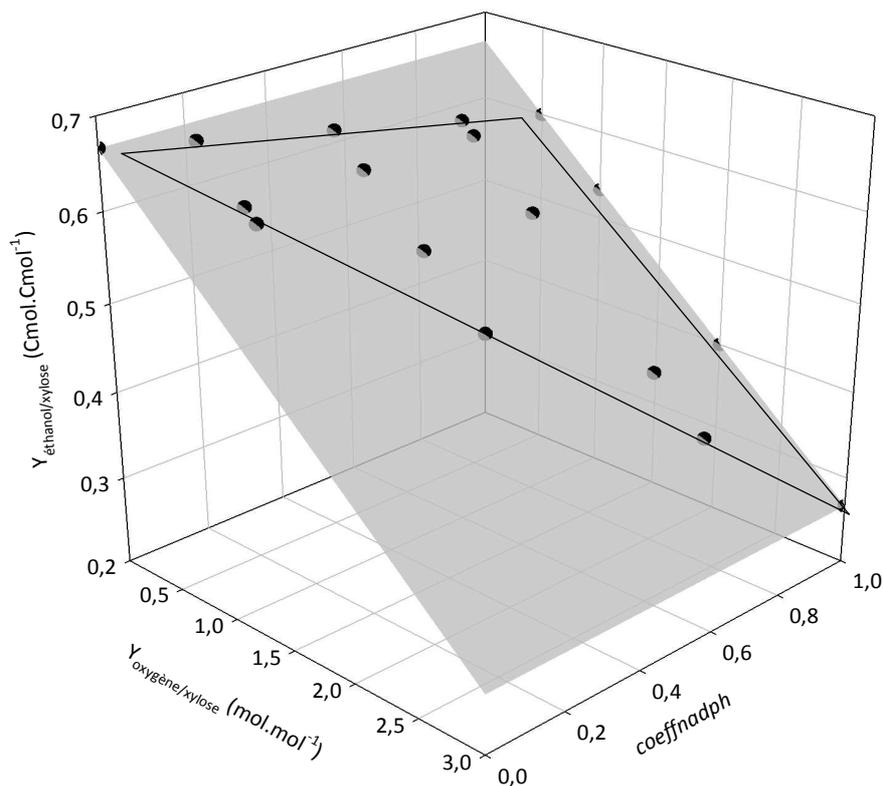
### 3.5.2. Impact en condition de production d'éthanol

Les simulations ont été réalisées dans les conditions suivantes comme précédemment (cf. 3.4.2) :

- $r_{XYLOSE} = -100 \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1}$
- $r_{PRODUITS} = 0 \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1}$  (Les produits sont : acide acétique, succinique et pyruvique, xylitol, glycérol et biomasse)

- le flux de consommation d'oxygène  $r_{O_2}$  varie entre 0 et  $300 \text{ mol.h}^{-1}$ , ce qui correspond à des rendements en oxygène entre 0 et  $3 \text{ mol}_{\text{oxygène}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$
- Le *coeffnadph* varie entre 0 et 1

Le sens des réactions est examiné, en particulier r88 et r15, flux intracellulaires de la pyruvate déshydrogénase et de la partie oxydative des PP. Seules les solutions correspondant à une réalité thermodynamique sont conservées. Les rendements théoriques limites en éthanol obtenus sont tracés en fonction de la valeur du *coeffnadph* et du rendement en oxygène sur xylose issu des valeurs imposées pour  $r_{O_2}$  (Figure 29). Les solutions thermodynamiquement acceptables sont contenues dans une surface triangulaire dont le périmètre correspond aux limites métaboliques.



**Figure 29.** Surface des solutions thermodynamiquement acceptables reliant le rendement éthanol ( $\text{Cmol.Cmol}^{-1}$ ), le rendement oxygène ( $\text{mol.mol}^{-1}$ ) et l'activité NADH et NADPH dépendante de la XR. Le  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$  varie entre 0 et  $3 \text{ mol.mol}^{-1}$  et le *coeffnadph* entre 0 et 1, l'équation du plan est  $Y_{\text{éthanol/xylose}} = -4.5495 \cdot 10^{-16} \cdot \text{coeffnadph} - 0.1333 \cdot Y_{\text{oxygène/xylose}}$ . La surface grisée représente l'ensemble des solutions et la surface triangulaire délimitée (trait plein) représente les solutions thermodynamiquement acceptables.

Les résultats obtenus et notamment l'équation du plan des solutions thermodynamiquement acceptables  $Y_{\text{éthanol/xylose}} = -4.5495 \cdot 10^{-16} \cdot \text{coeffnadph} - 0.1333 \cdot Y_{\text{oxygène/xylose}} + 0.667$  montre que la valeur de *coeffnadph* n'a aucune influence sur le rendement théorique limite en éthanol. Celui-ci peut être considéré comme seulement dépendant de la valeur du rendement en oxygène/xylose. La relation peut alors s'écrire  $Y_{\text{éthanol/xylose}} = -0.1333 \cdot Y_{\text{oxygène/xylose}} + 0.667$  (cf.3.4.2). Les résultats révèlent par ailleurs qu'il existe majoritairement des couples  $Y_{\text{oxygène/xylose}} - \text{coeffnadph}$  incompatibles d'un point de vue thermodynamique (surface hors triangle).

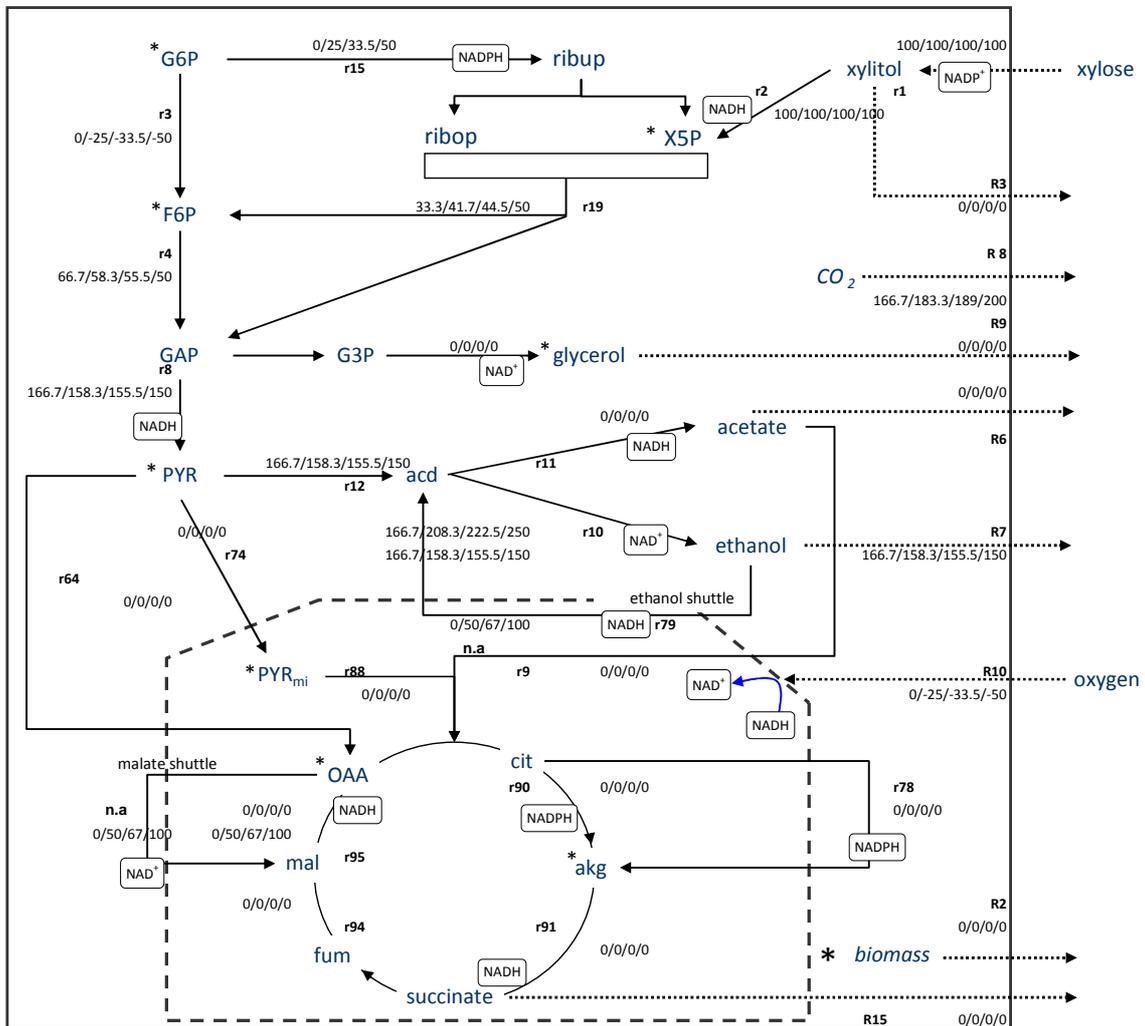
L'analyse de la surface obtenue permet de montrer que :

- Si *coeffnadph* = 0, la seule solution possible ne demande pas d'oxygène. Les rendements théoriques limite en éthanol sont donc compris entre 0.667 et 0.267  $\text{Cmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  dans ces deux cas limites.
- Pour un micro-organisme qui possède une XR uniquement NADH dépendante, le rendement maximum serait de 0,667  $\text{Cmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  pour un rendement en oxygène sur xylose nul, *i.e.* en anaérobie stricte. Ce rendement théorique limite  $Y_{\text{éthanol/xylose}}$  correspond à celui donné par Bruinenberg *et al.*,(1984) (cf. 1.1, Tableau 2).
- Par ailleurs, en condition aérobie à un rendement oxygène/xylose égal à 0.5  $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ , le rendement théorique limite obtenu dans les mêmes conditions (XR réductase totalement NADPH dépendante, *coeffnadph* = 1) est de 0.600  $\text{Cmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$ , en accord avec Unrean & Nguyen,(2012) et Evans & Ratledge (1984).
- La valeur de *coeffnadph* n'a aucune influence sur le rendement  $Y_{\text{éthanol/xylose}}$ .
- L'augmentation du rendement oxygène/xylose conduit à une diminution drastique du rendement théorique limite en éthanol. Le  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$  est étroitement lié aux besoins anaboliques et donc à la balance  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Plus le rendement oxygène/xylose augmente et plus la chaîne respiratoire est capable de régénérer du NADH.
- Lorsque que le *coeffnadph* augmente et tend vers 1 et le flux de NADPH à régénérer augmente donc ce qui nécessite une augmentation de flux dans la voie des PP et conduit à une augmentation de la production de  $\text{CO}_2$ . Les résultats sont confirmés par le calcul du quotient respiratoire qui dans ces conditions varie entre 7.3 et 4  $\text{molCO}_2 \cdot \text{molO}_2^{-1}$  lorsque la valeur de *coeffnadph* varie entre 0.5 et 1 (le QR est infini pour un *coeffnadph* = 0, c'est-à-dire en anaérobie).

Les flux intracellulaires pour quatre *coeffnadph* (0, 0.5, 0.67 et 1), avec les deux modèles sont détaillés dans la Figure 30. Les flux sont normés par rapport à l'entrée de xylose ( $100 \text{ mol.h}^{-1}$ ). Toutes les productions de coproduits étant nulles, notamment la croissance, il est impossible de calculer des vitesses spécifiques de consommation/production.

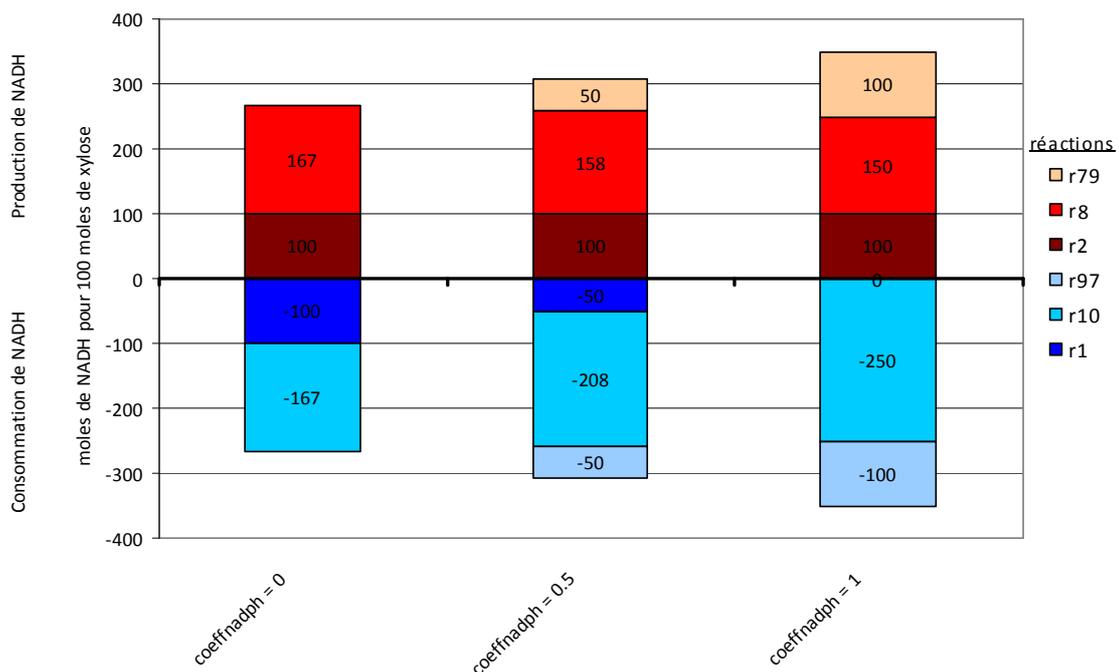
La voie des PP (r15) est strictement couplée au *coeffnadph* et fournit l'ensemble du NADPH nécessaire à la XR à raison de 2 moles de NADPH par mole de fructose-6-phosphate produite. Pour une consommation équivalente de xylose, la vitesse nette de production d'éthanol diminue de 10 % et la vitesse nette d'oxygène augmente de 0 à  $0.5 \text{ molO}_2.\text{mol}_{\text{éthanol}}^{-1}$  lorsque le *coeffnadph* passe de 0 à 1. À cette valeur de  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$ , on retrouve un rendement de  $1.5 \text{ mol}_{\text{éthanol}}.\text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  soit  $0.6 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$  comme indiqué précédemment.

De par les conditions de calculs (absence de production de biomasse), le flux de carbone dans le Cycle de Krebs est nul et tout le carbone est dirigé vers l'alcool déshydrogénase, exception faite du  $\text{CO}_2$ . On comprend ici que le besoin en oxygène est lié à la nécessité d'oxyder le NADH produit par l'alcool déshydrogénase ou la malate déshydrogénase mitochondriales (en fonction du modèle utilisé). Compte tenu de l'absence d'activité au niveau du Cycle de Krebs, la demande de pouvoir réducteur se situe donc au niveau cytosolique.



**Figure 30. Carte des flux intracellulaires pour quatre valeurs différentes de  $\text{coeff}_{\text{nadh}}$  0/0.5/0.67/1; les valeurs de flux identifiées sont normées par rapport au flux de xylose entrant ( $100 \text{ mol}_{\text{xylose}}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Les calculs sont réalisés avec les 2 modèles construits : les valeurs données sur la ligne supérieure sont obtenues avec le modèle navette éthanol-acétaldéhyde, les valeurs données sur la ligne inférieure sont celles obtenues avec le modèle navette malate-aspartate. Si les flux obtenus par les deux modèles sont identiques, une seule ligne est présentée. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la réaction. Les flux sont exprimés en  $\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$  excepté le flux de biomasse ( $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$ ). n.a. = non attribué (n'est pas calculé selon le modèle considéré). 100 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes.**

Le bilan sur les cofacteurs montre un lien direct entre la demande en NADH mitochondrial et cytosolique. La navette éthanol (r79) permet de produire du NADH mitochondrial qui pourra être consommé au niveau de la chaîne respiratoire (r97) pour produire du  $\text{NAD}^+$  mitochondrial (Figure 31). Au niveau cytosolique, le NADH produit par la XDH (r2) est constant (100  $\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$  correspondant au flux de xylose imposé). En fonction de la valeur de *coeffnadph*, la XR (r1) consomme tout ou partie du NADH produit par la XDH (r2). Lorsque *coeffnadph* augmente, le flux dans la voie des PP (r15) augmente pour régénérer le NADPH et donc le flux dans la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (r8) diminue produisant moins de NADH (Figure 30). L'ensemble du NADH cytosolique en excès hors fraction consommée par r1 (valeur dépendante du *coeffnadph*) ne peut alors être reconsumé que par la voie de production de l'éthanol (r10).



**Figure 31. Quantités de NADH produites ou consommées exprimées en  $\text{mol}_{\text{NADH}}$  pour 100 moles de xylose consommé à trois valeurs différentes *coeffnadph* (0, 0.5, 1). Les résultats sont obtenus avec le modèle possédant la navette éthanol. Les réactions cytosolique sont : r1 xylose  $\rightarrow$  xylitol ; r2 xylitol  $\rightarrow$  xylulose-5-phosphate ; r8 glycéraldéhyde-3-phosphate  $\rightarrow$  pyruvate ; r10 acétaldéhyde  $\rightarrow$  éthanol. Les réactions mitochondriales sont : r79 éthanol  $\rightarrow$  acétaldéhyde ; r97  $\text{NADH} + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{ATP}$ .**

### **3.6. Conclusion et discussion sur la construction de deux modèles pour *Candida shehatae***

Ce chapitre présente (1) les étapes de construction de deux modèles métaboliques développés pour décrire et comprendre le métabolisme de *Candida shehatae* et sa validation, (2) son utilisation pour obtenir les rendements théoriques limite en production de biomasse ou d'éthanol et (3) l'analyse des cartes de flux intracellulaires en conditions théoriques qui permettent de dégager les mécanismes de régulation entre les besoins en oxygène (anabolisme), l'énergétique cellulaire et la régénération des cofacteurs ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ).

Dans la première partie de ces travaux, deux modèles métaboliques ont été développés sur la base de travaux antérieurs issus de l'Equipe de Recherche et d'une étude bibliographique sur les différentes voies métaboliques, les cofacteurs enzymatiques et la composition de la biomasse pour *C.shehatae* ou des souches métaboliquement proches de celle-ci. Les modèles intègrent outre la compartimentation cellulaire qui rend compte de la complexité métabolique, notamment de la localisation des cofacteurs, un *coeffnadph* qui traduit la dualité de fonctionnement de la xylose réductase, première enzyme impliquée dans la dégradation du xylose en xylulose. Par ailleurs, les deux modèles se distinguent par un système de transport du NADH différent entre le cytosol et la mitochondrie, permettant l'échange de ce cofacteur entre les deux compartiments intracellulaires. Ces navettes sont appelées « éthanol-acétaldéhyde » et « malate-aspartate ». Les modèles comprennent alors 121 à 122 réactions biochimiques stœchiométriques et 136 métabolites. La résolution est faite de manière symbolique et l'utilisation de données expérimentales (dont le nombre est fonction du degré de liberté du système) permet alors de donner une solution numérique.

Ces modèles sont validés par comparaison des vitesses de production de biomasse et de  $\text{CO}_2$  calculées et expérimentales (expérience réalisée en mode discontinu alimenté). L'écart moyen entre les vitesses de production de  $\text{CO}_2$  calculées et mesurées est inférieur à 1 % et celui entre les vitesses de production de biomasse calculées et mesurées est de l'ordre de 5 %. Les résultats obtenus sont identiques quel que soit le modèle de navette utilisé.

**Lors des simulations réalisées avec le modèle possédant la navette éthanol à une valeur de  $coeff_{nadph}$  égale à 0.67** (caractéristique d'une condition aérobie), le flux au niveau de l'alcool déshydrogénase cytosolique est plus important en condition de production d'éthanol ( $222.5 \text{ mol.h}^{-1}$ ) qu'en condition de croissance ( $191.6 \text{ mol.h}^{-1}$ ). Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature qui indique une augmentation de l'activité spécifique de l'ADH de *P.stipitis* (facteur 10) lors de la production d'éthanol obtenue sur substrat xylose par diminution de la pression partielle en oxygène dissous (Passoth *et al.*, 1996). Par ailleurs, en condition de croissance maximale, une activité non nulle de l'ADH est obtenue par le modèle. Ces résultats sont corroborés par Bruinenberg *et al.*, (1983b) qui mesurent cette activité enzymatique lors de deux cultures continues de *C.utilis* en mode oxydatif (taux de dilution de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ ) sur substrat glucose ( $32 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}_{\text{protéine}}^{-1}$ ) et xylose ( $35 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}_{\text{protéine}}^{-1}$ ).

**Concernant le modèle malate-aspartate :** ce modèle repose sur un cycle futile autour de cette navette, impliquant plusieurs intermédiaires du Cycle de Krebs (notamment l'oxaloacétate) et suppose une forte activité amino-transférase et malate déshydrogénase. À une valeur de  $coeff_{nadph}$  égale à 0.67, le flux de malate cytosolique est de  $191.6 \text{ mol.h}^{-1}$  en condition de croissance maximale et de  $67 \text{ mol.h}^{-1}$  en condition de production maximale d'éthanol. L'activité spécifique de la malate déshydrogénase (MDH) a été dosée chez différents micro-organismes sur différents substrats. L'activité spécifique MDH chez *C.albicans* est de 107 et 24  $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}_{\text{protéine}}^{-1}$  en condition aérobie et anaérobie respectivement sur milieu Sabouraud (Tylicki *et al.*, 2008). La diminution constatée de cette activité MDH en condition aérobie vers l'anaérobie corroborent les résultats de flux obtenus par le modèle qui diminuent également de conditions oxydative pur à oxydo-réductive. Cette activité a également été mesurée chez *C.utilis* sur glucose (Van Urk *et al.*, 1989b) ( $7.25 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}_{\text{protéine}}^{-1}$  soit 68 fois plus forte que celle mesurée chez *C.albicans*). Par ailleurs, une concentration de malate intracellulaire de l'ordre de  $0.3 \text{ mmol.L}^{-1}$  a été mesurée lors de culture de *S.cerevisiae* sur glucose ou xylulose (Senac & Hahn-Hägerdal, 1990).

Ces comparaisons peuvent laisser supposer que les deux systèmes de navettes coexisteraient *in vivo*. Compte tenu des activités enzymatiques recensées (Bruinenberg *et al.*, 1983a; Passoth *et al.*, 2006; Senac & Hahn-Hägerdal, 1990; Tylicki *et al.*, 2008; Van Urk *et al.*, 1989b), la

navette malate serait prédominante en mode oxydatif et la navette éthanol en mode oxydo-réductif.

L'ajout des deux navettes dans le même modèle entraînerait une augmentation du degré de liberté et il serait impossible de trouver une solution unique à la résolution du système sur la base des mesures expérimentales disponibles. Il serait alors nécessaire de fournir des mesures de flux intracellulaires pour la résolution numérique de ce nouveau modèle. Au vu des résultats, les calculs de flux intracellulaires ont été réalisés avec le modèle possédant la navette éthanol, les principaux flux intracellulaires pertinents n'étant pas impactés par le choix de la navette.

La seconde étape est l'utilisation de ce modèle pour le calcul des rendements théoriques limites. Deux conditions sont examinées : la croissance en mode oxydatif pur et la production d'éthanol (en mode oxydo-réductif). Pour chaque condition, des hypothèses ont été formulées afin d'obtenir 8 vitesses, correspondant au degré de liberté du système matriciel, permettant le calcul des flux intracellulaires et vitesses extracellulaires d'intérêt (biomasse et éthanol). Les différentes simulations ont permis d'établir les résultats suivants compte tenu des hypothèses notamment sur la valeur de *coeffnadh* fixée à 0.67 pour *C.shehatae*, et en considérant les limites thermodynamiquement acceptables sur les sens de certaines réactions intracellulaires.

- Les rendements théoriques limite en biomasse varient entre  $0.31 \text{ Cmol}_{\text{biomasse}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  et  $0.70 \text{ Cmol}_{\text{biomasse}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  (soit  $0.27 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  et  $0.61 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) obtenus pour des valeurs de maintenance énergétique entre  $9.8 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  et  $0.01 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ .
- De manière plus consensuelle avec la bibliographie, un rendement théorique limite en biomasse de  $0.59 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$  soit  $0.51 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  peut être atteint, ce qui supposerait un flux de maintenance cellulaire de  $2.91 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ .
- Pour cette valeur de rendement biomasse, le rendement théorique en ATP serait de  $20.3 \text{ g}_{\text{biomasse}} \cdot \text{mol}_{\text{ATP}}$  soit  $1.23 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{Cmol}_{\text{biomasse}}^{-1}$ .
- Les rendements théoriques limite en éthanol varient entre  $0.40 \text{ Cmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  et  $0.62 \text{ Cmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  correspondant à une gamme de rendement  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$  comprise entre  $2 \text{ mol}_{\text{oxygène}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  et  $0.33 \text{ mol}_{\text{oxygène}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ . De plus, une

corrélation linéaire entre ces deux rendements a été déterminée, fixant les potentialités maximales admissibles pour la production d'éthanol.

Par ailleurs, l'étude de la variation de la valeur de *coeffnadph* en condition théorique, a montré que :

- La valeur de ce coefficient n'a aucun impact sur la valeur calculée du rendement théorique limite en éthanol, mais influence la valeur du rendement théorique limite en biomasse (pour des valeurs de *coeffnadph* supérieures à 0.67 induisant une dissipation d'énergie via la maintenance cellulaire).
- Le flux via la voie oxydative des pentoses-phosphates est directement lié à la valeur de *coeffnadph* et augmente avec celle-ci.
- La diminution du NADH et l'augmentation du NADPH produits dans le cytosol au niveau de la XR conduisent à une augmentation de l'activité au niveau de la chaîne respiratoire, qui tend à faire diminuer le rendement éthanol et augmenter la production de CO<sub>2</sub> (ces calculs ont été obtenus en condition de croissance nulle).



---

CHAPITRE 4 :

CARACTERISATION DU MÉTABOLISME  
DU XYLOSE CHEZ *CANDIDA SHEHATAE*  
EN CONDITION AÉROBIE,  
OXYGÈNE LIMITÉ ET ANAÉROBIE

---



## Chapitre 4.      **Caractérisation du métabolisme du xylose chez *C.shehatae* en condition aérobie, oxygène limité et anaérobie**

---

Ce chapitre s'intéresse à la caractérisation et la compréhension du métabolisme de *Candida shehatae*, et notamment au rôle des flux de substrats xylose et oxygène sur l'orientation du métabolisme. Le Chapitre 3 a montré qu'il existe une relation linéaire entre le rendement oxygène consommé sur xylose consommé et le rendement théorique limite de production d'éthanol. En fonction du mode de conduite de culture choisi, les flux de substrats seront donc dirigés vers la croissance et/ou la production d'éthanol et les rendements attendus seront alors inférieurs aux rendements théoriques limites définis dans le chapitre précédent. Plusieurs expérimentations en conditions maîtrisées d'apport de xylose et d'oxygène ont été réalisées et sont décrites dans ce chapitre. Ces expérimentations associées aux simulations permettent de comprendre l'impact des flux de substrats sur la bascule métabolique de *C.shehatae*.

Les capacités fermentaires de la souche *C.shehatae* sont ici étudiées en condition aérobie, oxygène limité et anaérobie lors de cultures sur substrat xylose.

La première culture, notée « A », est réalisée en mode discontinu alimenté par des ajouts pulsés de xylose. La maîtrise de l'apport en oxygène permet d'obtenir trois phases distinctes : une phase aérobie, une phase où la pression partielle en oxygène diminue jusqu'à ce que la culture soit limitée en O<sub>2</sub> et une phase anaérobie sous azote. La seconde culture (« B ») est réalisée également en mode discontinu alimenté mais avec un apport en xylose limitant. Deux phases successives sont réalisées : une phase aérobie et une phase limitée en oxygène où la valeur de la vitesse spécifique d'oxygène est contrôlée. La dernière culture, notée « C », est réalisée en mode continu alimenté avec une limitation en oxygène et/ou en xylose de façon à obtenir trois régimes oxydo-réductifs différents correspondant à des rendements en oxygène sur xylose quantifiés.

Dans une première partie, les différentes phases de cultures sont décrites et les cinétiques des variables macroscopiques sont présentées. Les rendements globaux sont déterminés par phase. La viabilité de la souche est mesurée et suivie en fonction de l'avancement de la fermentation.

Dans une seconde partie, une analyse des flux intracellulaires est réalisée avec le modèle développé au chapitre 3 pour certains points-clés de ces expériences. Ces informations sont comparées pour décrire les phénomènes liés à la croissance, à la production d'éthanol et à la transition respiro-fermentaire.

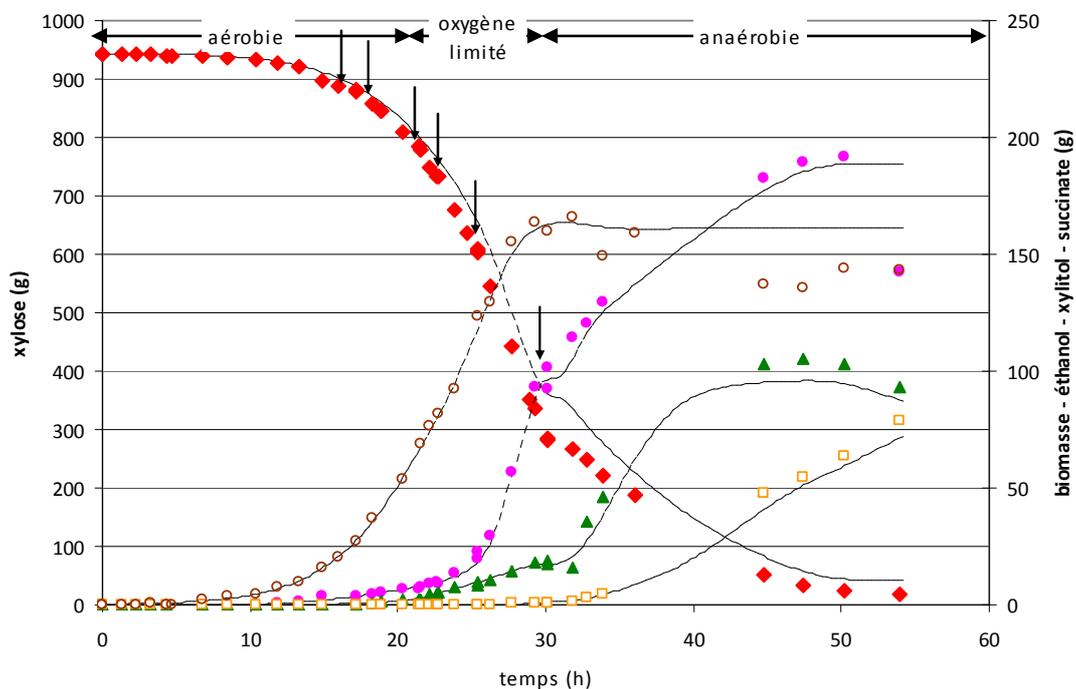
## **4.1. Cultures de *C.shehatae* en environnement contrôlé : analyses quantitatives macroscopiques et dynamiques**

### **4.1.1. Analyses macroscopiques**

NB : les pourcentages de répartition en carbone consommé sont donnés en Cmol pour 100 Cmol de Carbone.

- Culture « A »

La culture a été menée en mode discontinu alimenté et trois phases se sont succédées : une phase aérobie durant laquelle la pression partielle en oxygène est maintenue au dessus de 20 % de la valeur à saturation, une phase transitoire où la pression partielle en oxygène dissous ( $pO_2$ ) chute de 20 % à 0 %, l'oxygène est toutefois toujours apporté dans le milieu de façon limitante puis une phase anaérobie où l'air d'entrée est remplacé par de l'azote. Le substrat est apporté par 6 pulses successifs d'une solution concentrée de xylose. L'évolution des masses au cours des 55 heures de cultures est présentée dans la Figure 32. Les bilans carbone et d'oxydo-réduction sont recouverts à  $92 \pm 8 \%$  et  $92 \pm 10 \%$  respectivement (moyennes sur données lissées  $\pm$  écart-type).



**Figure 32. Evolution de la masse de xylose consommé (◆), des masses de biomasse (○), xylitol (▲), éthanol (●) et acide succinique (□) produites au cours de la culture « A » de *C.shehatae* en mode discontinu alimenté. Les symboles correspondent aux données brutes et les lignes aux données réconciliées. Les flèches correspondent aux ajouts de xylose : t = 17.1h – 46.9 g ; t = 18.8h – 40 g ; t = 21.4h – 40.7 g ; t = 22.7h – 110.6 g ; t = 25.4h – 312.5 g ; t = 30.1h – 301.7 g.**

Au cours de la première phase de culture, les produits majoritaires sont la biomasse et le CO<sub>2</sub>. La biomasse atteint une concentration de 20 g.L<sup>-1</sup>, représentant 59 % du carbone consommé. Le CO<sub>2</sub> correspond à 33 % du carbone et une faible production d'éthanol est observée : 2.4 g cumulés sur la phase considérée, correspondant à 6 % du carbone consommé. Le métabolisme est oxydo-réductif puisqu'une faible production d'éthanol est mesurée mais peut être considéré comme principalement oxydatif.

Durant la seconde phase, qui s'étend de 21 à 31 heures de culture, la pression partielle en oxygène chute en dessous de 20 %, le métabolisme oxydo-réductif est induit et les métabolites majoritaires sont (1) la biomasse, qui atteint 33 g.L<sup>-1</sup> et représente 29 % du carbone consommé (2) le CO<sub>2</sub> qui représentant 43 % du carbone consommé et (3) l'éthanol, dont la concentration augmente pour atteindre 20 g.L<sup>-1</sup>, et représente 21 % du carbone consommé. Certains

coproduits apparaissent, tel que le xylitol et l'acide pyruvique mais ces métabolites représentent moins de 7 % du carbone consommé.

La troisième phase menée sous flux d'azote s'étend au-delà de 31 heures de culture. Aucune croissance n'est quantifiée durant cette phase et de la lyse cellulaire est observée en fin d'expérience (diminution réelle de la masse totale de biomasse produite). Ce phénomène n'est pas pris en compte lors des calculs de réconciliation de données afin de ne pas entraîner une augmentation fictive du carbone consommé (ce qui explique que le profil réconcilié reste constant dans la Figure 32). Les coproduits synthétisés lors de la phase limitée en oxygène deviennent majoritaires en anaérobiose : les résultats montrent une production de xylitol atteignant une concentration de  $17.8 \text{ g.L}^{-1}$  (87.5 g) et d'acide succinique jusqu'à une concentration de  $14.6 \text{ g.L}^{-1}$  (71 g) représentant respectivement 17 et 27 % du carbone consommé. De l'éthanol est encore formé et la concentration finale atteint  $38.4 \text{ g.L}^{-1}$  correspondant à 38 % du carbone consommé. La part du carbone consommé dirigé vers le  $\text{CO}_2$  (20 %) diminue par rapport aux phases précédentes.

Des coproduits tels que l'acide acétique, l'acide pyruvique et le glycérol sont retrouvés en faibles quantités : la somme de leurs masses finales représente 11 g soit un maximum d'environ 4 % du carbone total consommé au cours de cette expérience. L'acide pyruvique est produit durant la phase de croissance puis est re-consommé durant la phase de production d'éthanol.

- Culture « B »

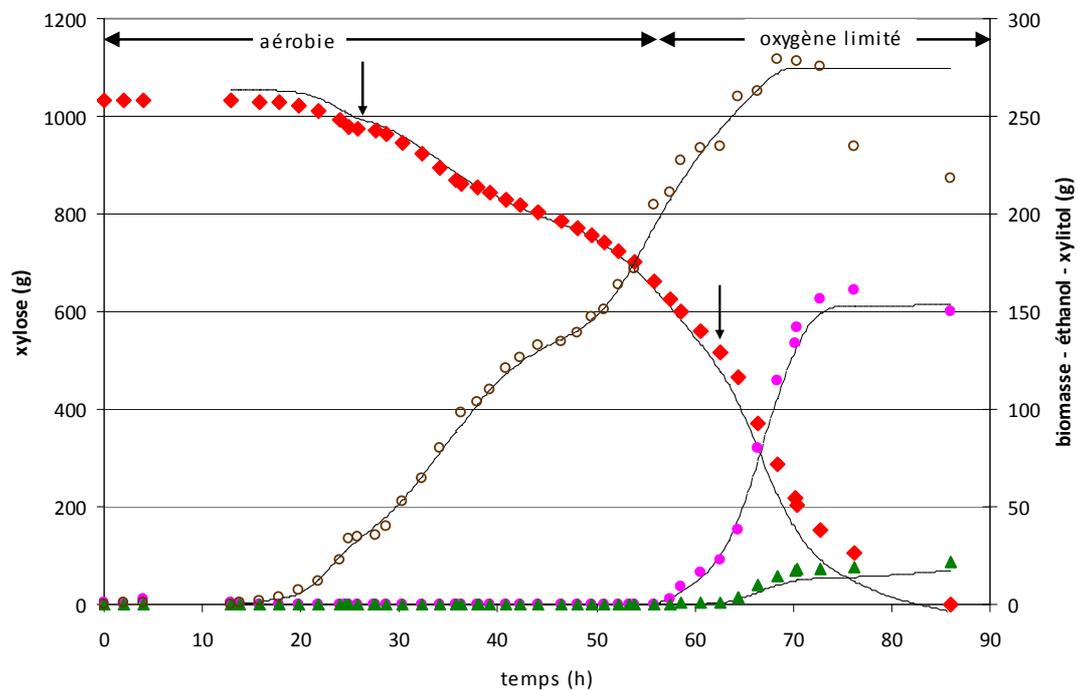
La culture a été menée en deux phases, l'une aérobie durant laquelle la  $p\text{O}_2$  a été maintenue au dessus de 20 % jusqu'à 55 heures de culture et une seconde en limitation d'oxygène ( $p\text{O}_2$  nulle) jusqu'à la fin de la culture. Le substrat est apporté initialement à une concentration en xylose égale à  $23 \text{ g.L}^{-1}$ . Cette première phase (discontinue et aérée) a permis la croissance de la souche jusqu'à  $11.6 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse en 27 heures de cultures. Dans une deuxième phase, lorsque le xylose devient limitant, un apport continu en xylose est imposé selon le profil détaillé dans le Tableau 13.

**Tableau 13. Profil des vitesses d'apport en xylose imposées lors de la culture B**

t initial	t final	vitesse d'ajout ( $\text{g}_{\text{xylose}} \cdot \text{h}^{-1}$ )	$[\text{xylose}]_{\text{résiduel}}$
0.00	27.40	0.0	>0
27.40	35.70	13.1	0
35.70	44.77	8.1	0
44.77	52.68	8.9	0
52.68	57.35	18.8	0
57.35	63.43	21.5	0
63.43	68.40	62.1	>0
68.40	70.50	14.1	>0
70.50	86.00	41.3	>0

A partir de 63.4 heures, la vitesse d'apport en xylose est supérieure à la vitesse de consommation de celui-ci et le xylose s'accumule dans le milieu. L'évolution en fonction du temps des variables produites et consommées (calculées en masses) est présentée dans la Figure 33. Les bilans carbone et d'oxydo-réduction sont recouverts à  $99 \pm 10 \%$  et  $102 \pm 16 \%$  respectivement (moyennes sur données lissées  $\pm$  écart-type).

Après 27 h et jusqu'à 55 heures de culture, le xylose est apporté en condition limitante à un débit variant entre 8.1 et 18.8  $\text{g}_{\text{xylose}} \cdot \text{h}^{-1}$  et l'oxygène est apporté en condition non limitante ( $p\text{O}_2$  maintenue au dessus de 30 %). Le métabolisme est purement oxydatif et traduit par une production de biomasse et de  $\text{CO}_2$ . La concentration en biomasse atteint 58  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  sans aucun coproduit dosé. La biomasse représente 55 % du carbone consommé et le  $\text{CO}_2$  44 %.



**Figure 33.** Evolution de la masse de xylose consommé (♦), des masses de biomasse (○), xylitol (▲), et éthanol (●) produites au cours de la culture « B » de *C.shehatae* en mode discontinu alimenté. Les symboles correspondent aux données brutes et les lignes aux données réconciliées. Les flèches correspondent à la zone de limitation en xylose.

La seconde phase est conduite sous limitation d'oxygène, l'aération est maintenue mais la pression partielle en oxygène est nulle, la vitesse de consommation d'oxygène est donc égale à la vitesse de transfert et contrôle le métabolisme de la souche. Le débit de xylose est tout d'abord de  $18.8 \text{ g}_{\text{xylose}} \cdot \text{h}^{-1}$  jusqu'à 57.3 h puis augmente de  $21.5 \text{ g}_{\text{xylose}} \cdot \text{h}^{-1}$  sans que le xylose ne s'accumule pas dans le milieu.

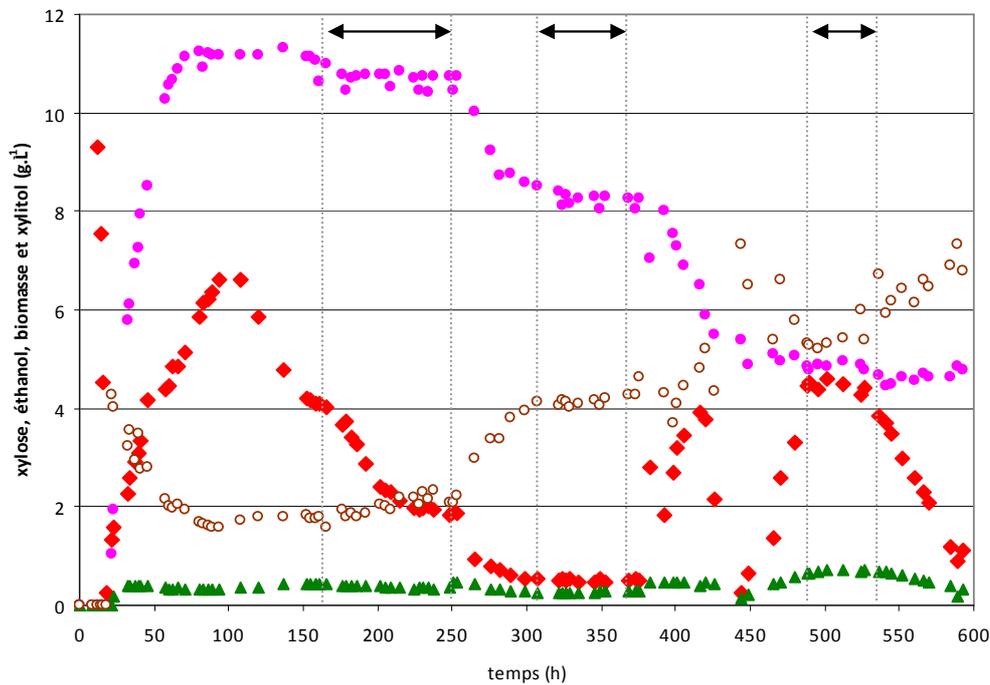
La limitation en oxygène induit une production d'éthanol de  $34.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  en 14 heures de culture correspondant à 26 % du carbone consommé tandis que la production de  $\text{CO}_2$  représente de 48 % carbone consommé. La concentration finale en biomasse obtenue est de  $67.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  et constitue une performance jamais atteinte dans la littérature à notre connaissance. Après 5 heures de phase stationnaire, un phénomène important de lyse cellulaire est observé. Ce phénomène semble coïncider avec l'arrêt de la production d'éthanol alors que la production de xylitol semble persister légèrement plus longtemps, tout comme la consommation du

xylose. Durant cette phase limitée en oxygène, les coproduits tels que l'acide succinique, le xylitol, et l'acide acétique représentent 13 % du carbone consommé. Les concentrations maximales pour ces métabolites sont inférieures à 5 g.L<sup>-1</sup>. Les quantités de coproduits formés sont inférieures à celles obtenues lors de la culture « A ». Les masses finales produites sont de 11.3 g d'acide succinique et de 17.5 g de xylitol soit respectivement 6.3 et 5 fois moins que lors de la culture A (où les niveaux de production sont obtenus en phase anaérobie).

- Culture « C »

La culture C a été menée en mode continu sur substrat xylose, en métabolisme oxydo-réductif. Les points de fonctionnement sont calculés sur la base des résultats obtenus dans le Chapitre 3 fixant les conditions théoriques de conversion du xylose en éthanol par le contrôle du rendement oxygène/xylose et en condition de limitation des flux de substrat (oxygène et/ou xylose). La publication présentée au Chapitre 3 explicite la stratégie définie pour l'optimisation du rendement de production d'éthanol. Le rendement  $Y_{O_2/xylose}$  doit se situer dans une gamme entre 0.33 et 2 molO<sub>2</sub>.mol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup>, le rendement éthanol variant alors entre 0.62 et 0.40 Cmol<sub>éthanol</sub>.Cmol<sub>xylose</sub><sup>-1</sup> (0.477 g.g<sup>-1</sup> 0.31 g.g<sup>-1</sup>), valeurs fixées par les limites thermodynamiques.

Trois régimes permanents avaient été définis. Du fait des contraintes expérimentales (faible débit d'alimentation) il n'a pas été possible de stabiliser de manière rigoureuse le premier régime permanent sur l'ensemble des variables d'état. Les taux de dilution sont de 0.039 h<sup>-1</sup> pour les deux premiers régimes et de 0.086 h<sup>-1</sup> pour le dernier régime. Le débit d'aération est de 0.25 L.min<sup>-1</sup> pour le premier régime et le gaz entrant est un mélange composé de 12 % d'azote et de 88 % d'air (afin de diminuer la quantité d'oxygène disponible dans le gaz d'entrée et atteindre de faibles vitesses spécifiques de consommation d'oxygène). Les deux régimes suivants sont réalisés en utilisant de l'air comme gaz d'entrée et les débits sont respectivement de 0.5 et 1 L.min<sup>-1</sup>. La concentration en xylose dans la solution d'alimentation est fixée à 33.2 g.L<sup>-1</sup>. Les bilans carbone sont recouverts à 100 % pour les 3 régimes et les bilans d'oxydo-réduction sont recouverts à 101 ± 1 %, 103.0 ± 0.6 % et 103 ± 3 % respectivement (moyennes sur données lissées ± écart-type).



**Figure 34.** Evolution de la concentration en xylose (◆), des concentrations en biomasse (○), xylitol (▲), et éthanol (●) au cours de la culture « C » de *C.shehatae* en mode continu. Données expérimentales, les flèches représentent les zones définies en régime permanent.

Le régime « permanent » (RP1) a été défini entre 160 et 250 h, soit environ 90 h de culture. Comme expliqué précédemment, les contraintes expérimentales n'ont pas permis d'obtenir un vrai régime permanent, notamment par rapport à la concentration et de la vitesse de consommation xylose. Les valeurs utilisées notamment pour les cartes de flux ont donc été moyennées sur cette zone. Le rendement oxygène est stabilisé à  $0.47 \pm 0.03 \text{ molO}_2 \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ . Le xylose n'est pas limitant, contrairement aux objectifs fixés, mais la concentration résiduelle est faible (entre 4 et 2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Dans le premier régime, l'éthanol est le produit principal et représente 51 % du carbone pour une concentration de 10.7  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , la production de  $\text{CO}_2$  correspond à 36 % du carbone consommé et la biomasse atteint 2.2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  représentant 10 % du carbone consommé.

Le second régime (RP2) est maintenu 50 h (entre 310 et 360 h) en limitation de xylose et d'oxygène à un  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$  de  $0.83 \pm 0.01 \text{ molO}_2 \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ . L'éthanol est le produit majoritaire lors du second régime permanent, avec une concentration de 8.3  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  et 40% du carbone

consommé. Le CO<sub>2</sub> s'élève à 38 % du carbone consommé et la biomasse atteint une concentration de 4.4 g.L<sup>-1</sup> représentant 20 % du carbone consommé.

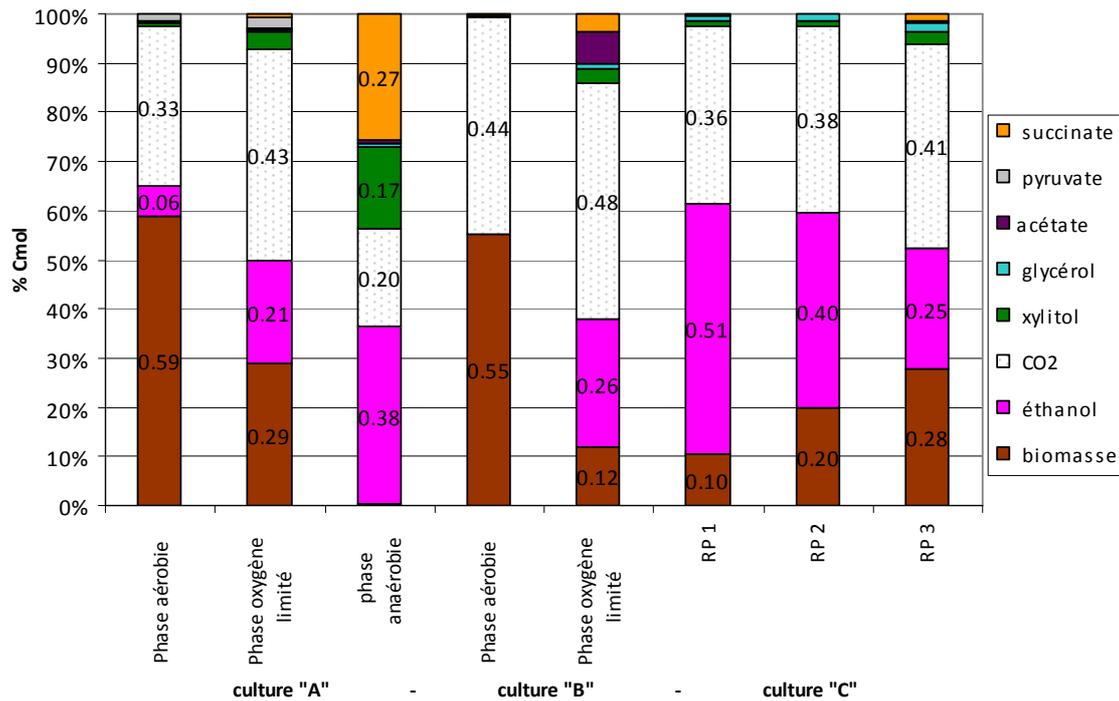
Le troisième régime permanent (RP3) est caractérisé par un rendement  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$  de  $1.35 \pm 0.05 \text{ molO}_2 \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  et dure 60 h entre 470 h et 530 heures de culture. Durant ce régime, le xylose n'est pas limitant puisque la concentration résiduelle est de l'ordre de 4.4 g.L<sup>-1</sup>. La concentration en éthanol n'est plus que de 4.9 g.L<sup>-1</sup> (25% du carbone consommé). La balance carbonée se fait au profit de la production de biomasse dont la concentration augmente à 5.5 g.L<sup>-1</sup> représentant 26 % du carbone consommé, la part du CO<sub>2</sub> augmente également pour atteindre 41 % du carbone consommé.

Sur l'ensemble de la culture, les acides organiques, le xylitol et le glycérol représentent une part négligeable du carbone avec moins de 3 % sur les deux premiers régimes et un maximum de 6.3 % sur le dernier. Les bilans carbone et redox globaux sont recouverts indiquant que les principaux produits de la fermentation ont été quantifiés.

Durant cette culture continue, les résultats montrent que l'augmentation du rendement O<sub>2</sub>/xylose se traduit par une augmentation de la production de biomasse au détriment de la production d'éthanol comme l'a montré l'étude théorique.

#### 4.1.2. Analyse comparée des distributions macroscopiques du carbone en fonction des conditions de culture

Les rendements moyens par phase pour les différentes cultures présentées précédemment sont indiqués dans la Figure 35.



**Figure 35. Rendements moyens calculés en Cmol pour les différentes phases identifiées au cours des cultures A, B et C de *C.shehatae*.**

La valeur maximale du rendement en éthanol ( $0.51 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$  soit  $0.39 \text{ g.g}^{-1}$ ) a été obtenue lors du premier régime permanent de la culture continue de *C.shehatae* en conditions quantifiées d'apport de xylose et d'oxygène correspondant à un rendement en oxygène/xylose de  $0.47 \pm 0.03 \text{ molO}_2.\text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ . Le rendement théorique limite pour cette valeur de  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$  est de  $0.604 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ , d'après la corrélation donnée au Chapitre 3 ( $Y_{\text{éthanol/xylose}} = -0.1333 Y_{\text{O}_2/\text{xylose}} + 0.6667$ ). Le rendement obtenu expérimentalement correspond donc à 85 % du rendement théorique limite de production d'éthanol dans les conditions définies par le modèle. Par ailleurs, le rendement en éthanol obtenu est inférieur de 10 % à celui annoncé lors d'une culture continue en réacteur bi-étagé ( $D_1 = 0.096 \text{ h}^{-1}$ ,  $D_2 = 0.025 \text{ h}^{-1}$ ) par Alexander *et*

*al.*, (1988b). Il est inférieur de 15 % au rendement maximal relevé dans la littérature ( $0.45 \text{ g.g}^{-1}$  soit  $0.59 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ ), obtenu lors de culture en fioles de *C.shehatae* (Slininger *et al.*, 1985).

En métabolisme oxydatif pur (phase aérobie de la culture « B »), le rendement en biomasse obtenu est de  $0.55 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ , le reste du carbone étant dissipé sous forme de  $\text{CO}_2$ . Néanmoins un rendement moyen en biomasse de  $0.59 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$  ( $0.51 \text{ g.g}^{-1}$ ) a pu être obtenu lors de la phase aérobie de la culture « A ». De manière surprenante, ce rendement est plus élevé que le précédent alors qu'une production d'éthanol est mesurée. La balance carbone se fait au détriment de la production de  $\text{CO}_2$  qui n'est alors que de  $0.33 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ . L'analyse des cartes de flux pourra peut-être permettre d'expliquer cette différence. Ces rendements corroborent ceux de l'ordre de  $0.51 \text{ g.g}^{-1}$  annoncés dans la littérature (Alexander *et al.*, 1988a; DuPreez *et al.*, 1989a). Par ailleurs, les résultats obtenus pour les rendements théoriques limites sur la base du modèle ont montré que ces rendements pouvaient thermodynamiquement varier entre  $0.31$  et  $0.70 \text{ Cmol}_{\text{biomasse}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  et dépendaient de la dissipation d'énergie par la maintenance cellulaire. L'analyse des cartes de flux intracellulaires devrait permettre de vérifier cette hypothèse.

Lors de la phase anaérobie de la culture « A », une quantité importante d'acide succinique est produite atteignant un rendement moyen de  $0.27 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$  (soit  $0.26 \text{ g.g}^{-1}$ ). Ce résultat est original car ce niveau de production n'a jamais été mentionné dans la littérature pour *C.shehatae*. De faibles quantités d'acide succinique sont également mesurées au cours des cultures en condition limitée en oxygène, avec des rendements inférieurs à  $0.05 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ . Les micro-organismes utilisés classiquement pour la production d'acide succinique (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*) permettent d'atteindre des rendements de  $1 \text{ g}_{\text{succinate}} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$  soit  $1.01 \text{ Cmol}_{\text{succinate}} \cdot \text{Cmol}_{\text{glucose}}^{-1}$  (McKinlay *et al.*, 2007).

Par ailleurs, durant cette phase, les 2/3 du carbone consommé sont dirigés vers les coproduits ( $\text{CO}_2$ , xylitol et acide succinique). Un apport en oxygène limitant (phases oxygène limité des cultures « A » et « B ») permet de limiter la production de coproduit, notamment de xylitol et d'acide succinique par rapport à un apport nul en oxygène (phase anaérobie de la culture « A »). Le flux de carbone associé est alors préférentiellement redirigé vers la biomasse et le

CO<sub>2</sub> plutôt que vers l'éthanol (puisque le rendement en éthanol est inférieur lors de la phase anaérobie par rapport aux phases limitées en oxygène).

La gestion des flux de substrats (O<sub>2</sub> et xylose) lors de la culture « C » permet de réduire les coproduits à moins de 7 % du carbone consommé (acides organiques, glycérol et xylitol). Lorsque le rendement  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$  augmente d'un régime permanent à l'autre, le rendement en éthanol diminue au profit du rendement en biomasse, le rendement en CO<sub>2</sub> restant à peu près constant. Le régime permanent 3 n'étant pas à xylose résiduel limitant, il semble que la synthèse de coproduits (acides organiques, xylitol et glycérol) soit alors liée à un excès de xylose.

#### 4.1.3. Analyse des cinétiques de cultures

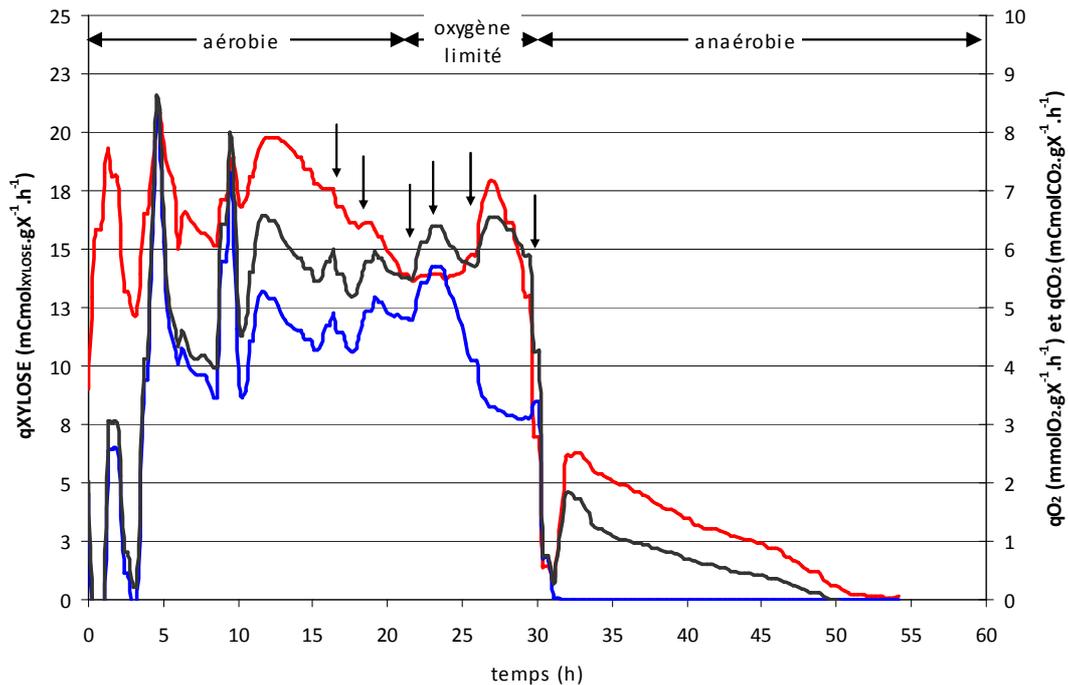
Les cinétiques de cultures sont calculées sur la base des données réconciliées à partir de la concentration en biomasse totale. Elles sont présentées en fonction du temps et exprimées en  $\text{mCmol.g}^{-1}_{\text{biomasse}}\cdot\text{h}^{-1}$ .

- Culture « A »

Le taux de croissance maximum observé durant la phase aérobie est de  $0.31 \text{ h}^{-1}$ , le taux de croissance moyen sur cette phase est de  $0.27 \text{ h}^{-1}$ . En condition limitée d'oxygène (entre 21 h et 30 heures de cultures), le  $\mu$  moyen est de  $0.10 \text{ h}^{-1}$  et aucune croissance n'est observée en anaérobie.

La vitesse spécifique de consommation d'oxygène  $q_{\text{O}_2}$  est maximale en début de culture et atteint  $7.9 \text{ mmolO}_2\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Elle oscille ensuite autour d'une valeur moyenne de  $4.5 \pm 0.5 \text{ mmolO}_2\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  en fin de phase aérobie. Durant la phase oxygène limitée, la vitesse spécifique de consommation d'oxygène varie entre 6 et 3  $\text{mmolO}_2\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Figure 36). La vitesse spécifique maximale de consommation d'oxygène obtenue est 8 % plus faible que celle mesurée par Fromanger *et al.*, (2010) mais quasiment 3 fois plus élevée que celle donnée par Alexander *et al.*, (1988a).

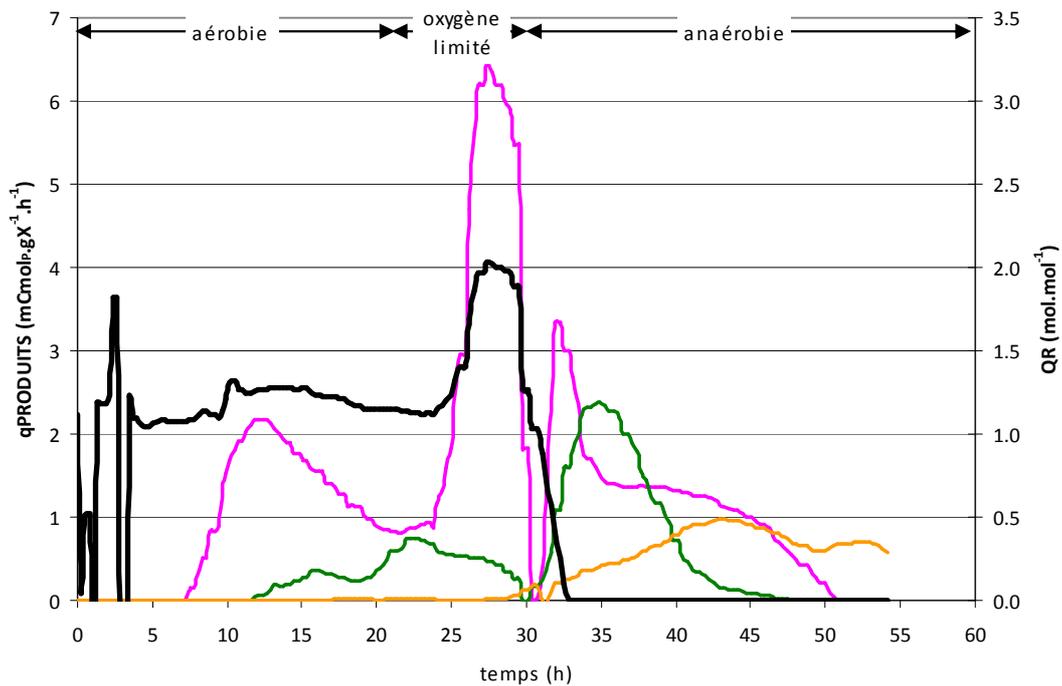
La vitesse spécifique maximale de consommation de xylose maximale ( $q_{XYLOSE_{max}}$ ) est de l'ordre de  $20.8 \text{ mCmol}_{xylose} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  et varie entre 20 et  $13 \text{ mCmol}_{xylose} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  durant les phases aérobie et oxygène limité. La valeur maximale obtenue est environ 10 % plus faible que celle relevée dans les travaux de Fromanger *et al.*, (2010) mesurée à  $22.3 \text{ mCmol}_{xylose} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .



**Figure 36.** Vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de xylose et de production de dioxyde de carbone au cours de la culture « A » de *C.shehatae* en mode discontinu alimenté. Les flèches correspondent aux ajouts de xylose.

Une faible production d'éthanol est obtenue durant la phase aérobie (Figure 37), avec une vitesse spécifique de production d'éthanol maximale de  $2.2 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Cette production d'éthanol au cours d'une phase aérobie est due à une brève limitation d'oxygène durant laquelle la  $pO_2$  a chuté pour atteindre 0 % de la valeur à saturation survenue à 3.6 heures. Dans le même temps, la vitesse spécifique de consommation d'oxygène chute brutalement avant d'être à nouveau stabilisée (Figure 36). Cette production d'éthanol en aérobie est partiellement couplée à une faible production de xylitol ( $q_{XYLITOL_{max}} = 0.75 \text{ mCmol}_{xylitol} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Durant cette phase, la valeur du quotient respiratoire QR est égale à  $1,2 \pm 0.1$  ce qui est cohérent avec les valeurs théoriques obtenues au Chapitre 3 et traduisant un

métabolisme oxydo-réductif. La vitesse spécifique de production d'éthanol chute ( $0.8 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) mais reste positive alors que la vitesse spécifique de consommation en oxygène  $qO_2$  est de l'ordre de  $5 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Cette observation suggère l'incapacité de *C.shehatae* à recouvrir un métabolisme purement oxydatif après une limitation en oxygène même très brève.



**Figure 37. Vitesses spécifiques de productions des métabolites principaux (éthanol, xylitol, succinate) et du quotient respiratoire (noir) au cours de la culture « A » de *C.shehatae* en mode discontinu alimenté.**

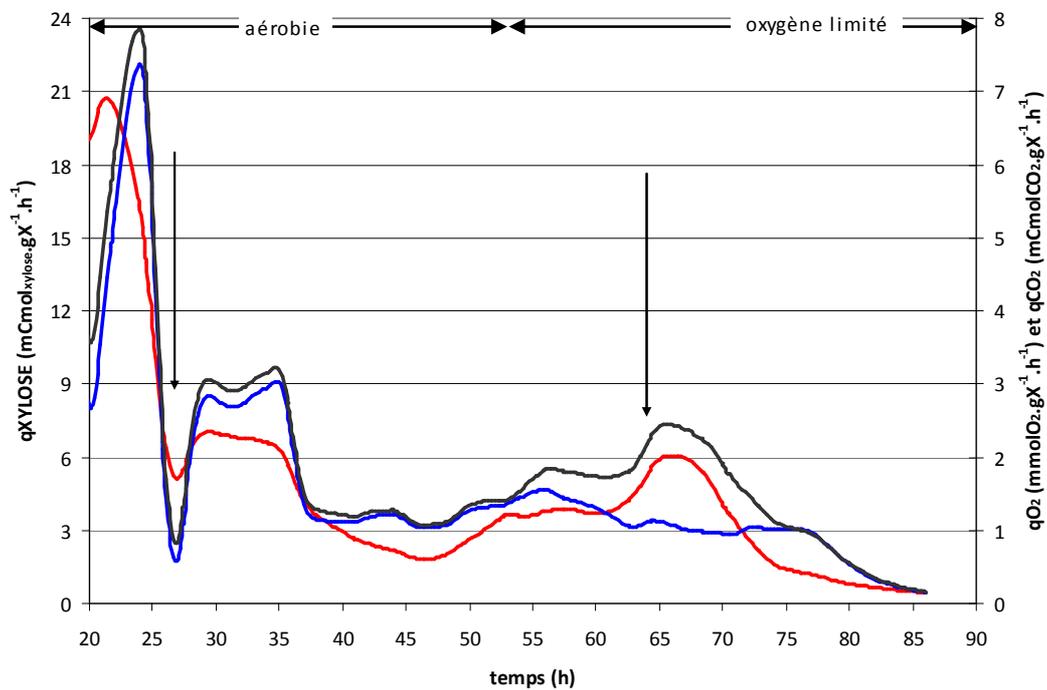
Lors de la phase limitée en oxygène, la vitesse spécifique de production d'éthanol augmente fortement pour atteindre une valeur maximale de  $6.4 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . La valeur du quotient respiratoire atteint la valeur maximale de 2 (Figure 37). Cette vitesse spécifique maximale de production correspondant à  $0.14 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  est nettement inférieure (-36 %) à celles relevées dans la littérature, qui sont de l'ordre de  $0.22 \text{ g}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  mais pour des conditions de limitations en oxygène supérieures (Alexander *et al.*, 1988a; Fromanger *et al.*, 2010).

Lorsque la culture est conduite en anaérobie, une diminution brutale et instantanée des vitesses de production et consommation est observée. Néanmoins, la cellule s'adapte à ces nouvelles conditions d'environnement et la vitesse spécifique de consommation du xylose augmente pour atteindre  $6.2 \text{ mCmol.gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$  et une vitesse spécifique de production de  $\text{CO}_2$  d'environ  $1.8 \text{ mCmol.gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (Figure 37). Cette phase est caractérisée par une augmentation de  $q_{\text{XYLITOL}}$  jusqu'à un maximum de  $2.3 \text{ mCmol}_{\text{xylitol}}.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$  obtenu 5 heures après l'induction de la phase anaérobie. La vitesse spécifique de production d'éthanol augmente plus rapidement que lors de la phase précédente et atteint une valeur maximale de  $3.3 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}}.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$  quasi instantanément (coïncidant avec un quotient respiratoire nul). Cette vitesse chute pour atteindre une valeur constante de  $1.3 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}}.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . La valeur décroît à partir de 45 heures de culture pour atteindre une valeur nulle à 50 heures de culture. La vitesse spécifique de production d'acide succinique  $q_{\text{SUCCINATE}}$  augmente graduellement durant les 15 premières heures de la phase anaérobie pour atteindre une valeur maximale de  $1 \text{ mCmol}_{\text{succinate}}.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$  qui semble se maintenir jusqu'à la fin de la culture.

- Culture « B »

Le taux de croissance maximal atteint au cours de la phase aérobie est de  $0.41 \text{ h}^{-1}$  mais chute rapidement, entraînant un taux de croissance moyen de  $0.09 \text{ h}^{-1}$  entre 20 h et 53 heures de cultures (phase aérobie). A partir de 53 h, le taux de croissance moyen est  $0.03 \text{ h}^{-1}$  et la croissance est nulle à partir de 70 heures. Lors de cette culture, une phase de latence a été observée et les résultats sont donc présentés à partir de 20 heures de culture. La phase de limitation en xylose est imposée entre 27 h et 64 heures de culture.

À 25 heures de culture, l'ensemble des vitesses de consommation de xylose et d'oxygène et de production de  $\text{CO}_2$  sont maximales avec des valeurs respectivement de  $20.6 \text{ mCmol}_{\text{xylose}}.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ,  $7.4 \text{ mmolO}_2.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$  et  $7.8 \text{ mCmolCO}_2.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$  soit un quotient respiratoire de 1.05 (Figure 38). Le métabolisme est donc dans ce cas purement oxydatif et la valeur obtenue correspond exactement à celle calculée dans le Chapitre 3 pour les limites théoriques en condition de croissance pure (cf. 3.4.1).



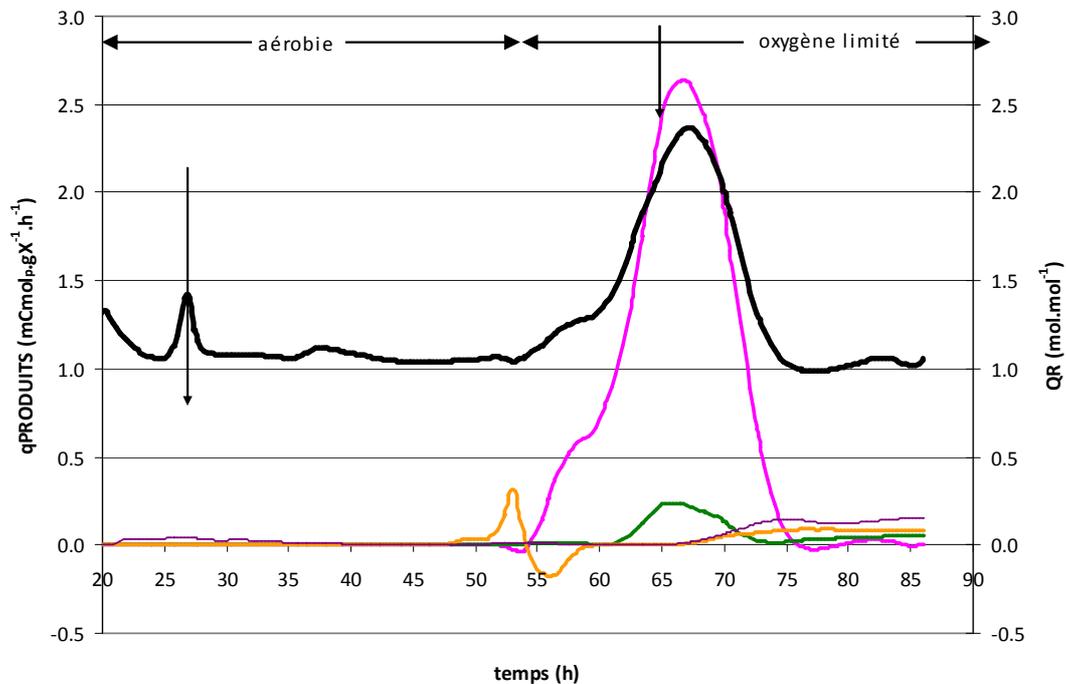
**Figure 38. Vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de xylose et de production de dioxyde de carbone au cours de la culture « B » de *C.shehatae* en mode discontinu alimenté. Les flèches correspondent à la zone de limitation en xylose.**

La vitesse maximale de consommation d'oxygène ( $qO_2$  max) est 7 % plus faible que celle mesurée au cours de la culture « A » tandis que la même valeur de  $qXYLOSE$  max est obtenue pour les deux cultures aérobies.

Entre 25 et 35 heures de culture, l'apport de xylose est contrôlé sans accumulation dans le milieu à un débit de  $13.1 \text{ g.h}^{-1}$  (cf. Tableau 13). Ce débit correspond à une vitesse spécifique de consommation de  $6.6 \text{ mCmol}_{xylose} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Les vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de production de  $CO_2$  sont alors constantes et caractérisées par un quotient respiratoire identique au précédent (1.09).

À partir de 35 h et jusqu'à 55 heures de culture, le débit d'apport de xylose est modifié (cf. Tableau 13), les vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de production de  $CO_2$  se stabilisent entre 1 et  $1.5 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  à QR identique. Après 53 heures, la culture devient limitée en oxygène. Le quotient respiratoire augmente pour atteindre 2.4 après 67 heures de culture (production d'éthanol induite) (Figure 39). Par la suite, du xylose commence à

s'accumuler dans le milieu et la vitesse spécifique de consommation de xylose chute à partir de 67 heures de culture.



**Figure 39.** Vitesses spécifiques de production des métabolites principaux (éthanol, xylitol, succinate, acétate) et du quotient respiratoire (noir) au cours de la culture « B » de *C.shehatae* en mode discontinu alimenté. Les flèches correspondent à la zone de limitation en xylose.

Comme indiquée, la vitesse spécifique de production d'éthanol,  $q_{\text{ETHANOL}}$ , augmente à partir de la transition entre la phase aérobie et la phase en limitation d'oxygène (Figure 39), pour atteindre une vitesse maximale de  $2.6 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 2.5 fois plus faible que celle obtenue lors de la culture « A ». La production d'éthanol est couplée à la production de xylitol mais celle-ci est 10 fois plus faible que celle obtenue lors de la culture « A » en anaérobie ( $q_{\text{XYLITOL}_{\text{max}}} = 0.2 \text{ mCmol}_{\text{xylitol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Les vitesses de production d'éthanol et de xylitol chutent à partir de 67 heures avec la diminution du QR de 2.4 à 1. La transition entre la phase aérobie et la phase en limitation d'oxygène entraîne une faible production d'acide succinique ( $q_{\text{SUCCINATE}_{\text{max}}} = 0.3 \text{ mCmol}_{\text{succinate}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) qui est ensuite re-consommé. Une faible production d'acide acétique ( $0.15 \text{ mCmol}_{\text{acétate}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) et d'acide succinique ( $0.12$

$\text{mCmol}_{\text{succinate}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) est observée à partir de 67 heures de cultures, lorsque  $q_{\text{ETHANOL}}$  chute et devient nul.

De manière générale, les vitesses spécifiques de production des principaux métabolites sont inférieures au cours de la culture « B » par rapport à celles obtenues lors de la culture « A ». Ce phénomène est lié à la limitation en xylose imposée au cours de la culture « B » entre 27 h et 65 heures de culture. En effet, la vitesse spécifique de consommation du xylose est en moyenne de  $10.5 \text{ mCmol}_{\text{xylose}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  au cours de la culture « A » et de  $5.2 \text{ mCmol}_{\text{xylose}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  au cours de la culture « B ».

- Culture « C »

Comme indiqué précédemment, le régime « permanent » 1 correspond à une moyenne des valeurs obtenues entre 160 heures et 250 heures de culture. L'ensemble des variables macroscopiques est stabilisé excepté pour le xylose résiduel. Au niveau des cinétiques, les vitesses spécifiques de production d'éthanol et de  $\text{CO}_2$  ainsi que de consommation de xylose ne sont pas stables sur l'intervalle considéré (Figure 40). Des valeurs moyennes ont donc été calculées pour caractériser ce point de fonctionnement difficile à stabiliser.

Les valeurs de  $q_{\text{XYLOSE}}$  varient entre 17.8 et 21.1  $\text{mCmol}_{\text{xylose}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pour le premier régime permanent, est stabilisé à 10.3  $\text{mCmol}_{\text{xylose}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pour le deuxième et à  $13 \pm 0.5 \text{ mCmol}_{\text{xylose}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pour le troisième régime permanent. Ces vitesses sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans la culture « A » où la culture est toujours en excès de xylose.

Les valeurs de  $q_{\text{O}_2}$  varient dans les gammes suivantes : [1.5 -2], [1.6 -1.7] et [3.4 -3.7]  $\text{mmolO}_2 \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pour les régimes permanents 1, 2 et 3 respectivement (Figure 40.A). Ces valeurs sont comprises entre les  $q_{\text{O}_2}$  moyens des cultures « A » et « B » et bien inférieures au  $q_{\text{O}_2}$  max obtenu précédemment.

Les valeurs des vitesses spécifiques de production de  $\text{CO}_2$  pendant chaque régime permanent conduisent à des valeurs stabilisées de QR de  $3.8 \pm 0.3$ , 2.2 et 1.4 respectivement (Figure 40.B).

La vitesse spécifique maximale de production d'éthanol ( $q_{\text{ETHANOL}_{\text{max}}} = 11 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Figure 40.B) obtenue lors du premier régime permanent est 1.7 fois supérieure au maximum obtenu lors de la culture « A » et est supérieure de 15 % aux valeurs obtenues par Alexander *et al.*, (1988a) et Fromanger *et al.*, (2010).

Durant le premier régime permanent, cette vitesse diminue jusqu'à  $9 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  d'où une valeur moyenne utilisée pour le calcul de la carte des flux intracellulaires à  $10.1 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Les vitesses spécifiques moyennes de production d'éthanol des régimes 2 et 3 sont respectivement de 4 et  $3.2 \text{ mCmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Comme attendu, plus le rapport  $q_{\text{O}_2}/q_{\text{XYLOSE}}$  augmente, et plus la vitesse spécifique de production d'éthanol diminue. Les vitesses de production d'acide succinique et de xylitol sont faibles et atteignent un maximum  $0.25 \text{ mCmol}_{\text{succinate}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  et  $0.42 \text{ mCmol}_{\text{xylitol}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  lors du dernier régime permanent. Ces valeurs sont proches des vitesses maximales mesurées au cours de la culture « B ».

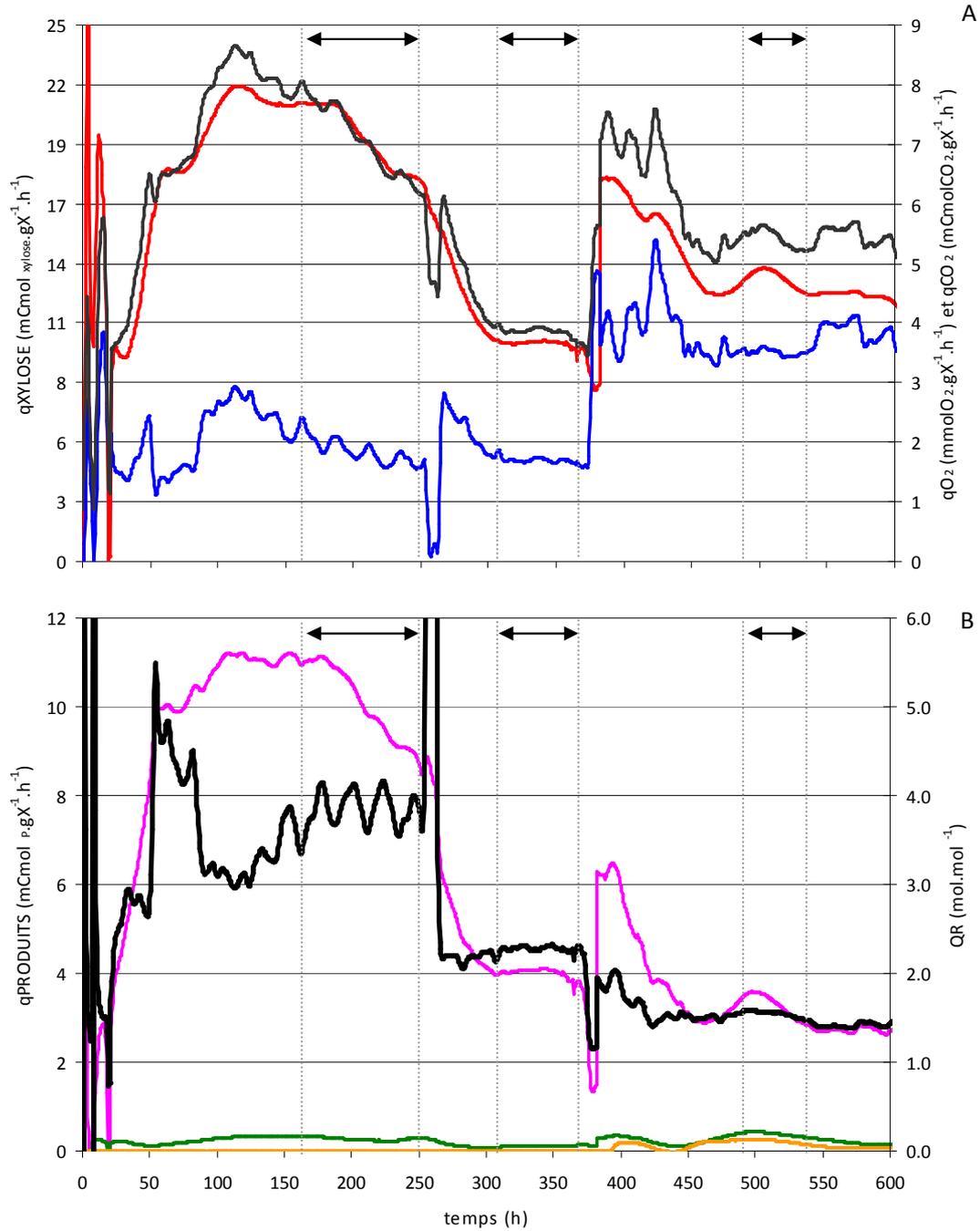


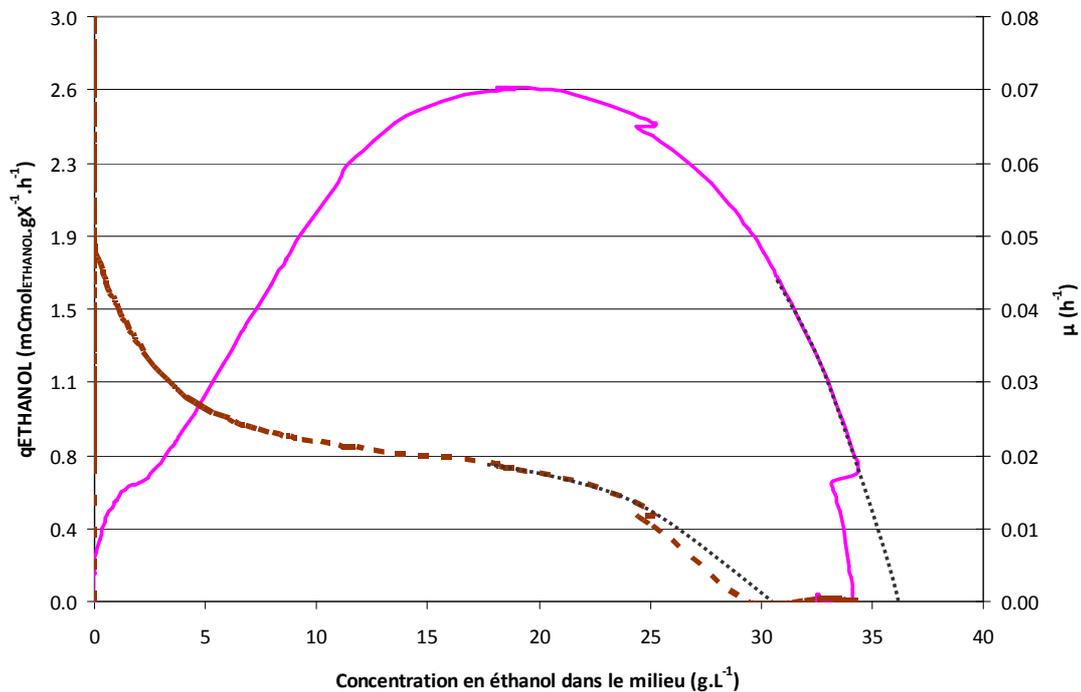
Figure 40. Vitesses spécifiques de consommation de xylose, d'oxygène et de production de CO<sub>2</sub> (A), quotient respiratoire et vitesses de production d'éthanol, xylitol et succinate (B) en fonction du temps au cours de la culture en continue - les flèches correspondent aux trois régimes permanents.

#### 4.1.4. Tolérance à l'éthanol et viabilité

La viabilité n'a pas été mesurée au cours de la culture « A », mais au cours des cultures « B » et « C ». Durant la culture « C », la viabilité est supérieure à 80 % tout au long de la culture et supérieure à 90 % lors des régimes permanents. Les concentrations en éthanol ne dépassent pas  $11 \text{ g.L}^{-1}$ , n'entraînant pas de problème de tolérance.

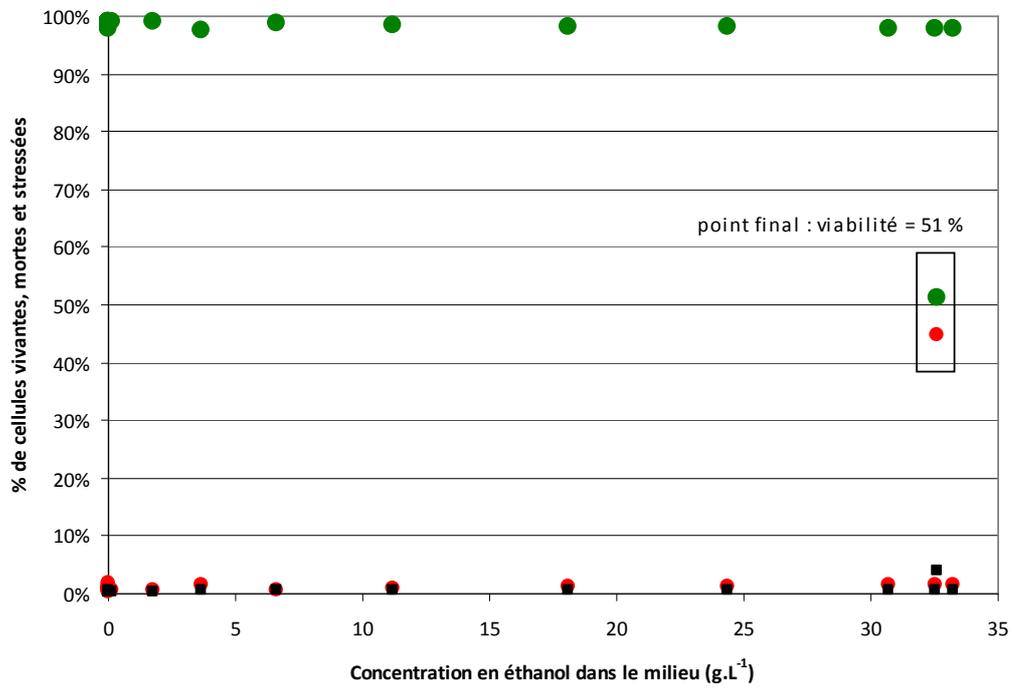
La Figure 41 présente les cinétiques de croissance et de production d'éthanol en fonction de l'avancement de la fermentation alcoolique au cours de la culture « B » (concentration en éthanol dans le milieu). Les concentrations critiques en éthanol pour la croissance et la vitesse de production sont :  $[\text{ETHANOL}]_{\text{critique}}/\mu = 30 \text{ g.L}^{-1}$  et  $[\text{ETHANOL}]_{\text{critique}}/q_{\text{ETHANOL}} = 37 \text{ g.L}^{-1}$ .

La courbe du taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol est très proche de celle obtenue par DuPreez *et al.*, (1989c) et la valeur  $[\text{ETHANOL}]_{\text{critique}}/\mu$  est identique à celui obtenu par ces auteurs (cf. 1.2.4). En revanche, la courbe  $q_{\text{ETHANOL}} = f([\text{ETHANOL}])$  est plus proche de celle obtenue par Fromanger *et al.* (2010) avec une valeur de  $[\text{ETHANOL}]_{\text{critique}}/q_{\text{ETHANOL}}$  inférieure à celle de la littérature (45 et  $50 \text{ g.L}^{-1}$  pour les travaux de DuPreez *et al.*, (1989c) et Fromanger *et al.* (2010) respectivement).



**Figure 41. Vitesse spécifique de production d'éthanol (—), taux de croissance (---) en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu au cours de la culture « B » de *C.shehatae* en mode discontinu alimenté.**

La tolérance de la souche à l'éthanol est faible comparée à celle de *S.cerevisiae* pour laquelle la chute de la viabilité au cours de la culture explique l'arrêt de la fermentation alcoolique (Alfenore *et al.*, 2004). Pour *C.shehatae*, le phénomène d'arrêt de la production d'éthanol ne semble pas lié à la perte de viabilité. En effet, la viabilité est supérieure à 98 % tout au long de la culture indépendamment de la concentration en éthanol mais chute en fin de fermentation (Figure 42); la viabilité en fin de culture est encore de 51 % lorsque la concentration en éthanol est de 32.6 g.L<sup>-1</sup> dans le milieu. Par ailleurs, la diminution de la vitesse spécifique de production d'éthanol commence à une concentration extracellulaire de 20 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol, la viabilité étant alors de 98 %.



**Figure 42.** Pourcentage de cellules vivantes (●), stressées (■) et mortes (●) dans le milieu de culture en fonction de la concentration en éthanol déterminés par la méthode de cytométrie développée au cours de ses travaux (Monthéard et al., 2012).

## 4.2. Analyse comparée

Afin de comprendre les mécanismes de la bascule de *C.shehatae* de la croissance oxydative à la production oxydo-réductive d'éthanol, des cartes de flux intracellulaires calculées via le modèle métabolique décrit au Chapitre 3 sont présentées pour différents points des cultures décrites précédemment ainsi que pour les calculs théoriques réalisés dans le Chapitre 3.

Les flux intracellulaires sont calculés à partir des données expérimentales en utilisant le modèle possédant la navette éthanol-acétaldéhyde. Les huit vitesses mesurées et imposées au système pour la résolution sont les vitesses nettes de consommation de xylose (R1) et d'oxygène (R10), les vitesses nettes de production d'éthanol (R7), de xylitol (R3), de glycérol (R9) et d'acides acétique, pyruvique et succinique (R6, R5 et R15). Les vitesses de production de CO<sub>2</sub> (R8) et de biomasse (R2) sont donc calculées et peuvent être comparées à celles qui ont été mesurées expérimentalement.

Les cartes de flux intracellulaires sont comparées et analysées dans un premier temps pour les deux conditions métaboliques considérées : d'une part la croissance et d'autre part la production d'éthanol. Une troisième partie permet de décrire les phénomènes biologiques au cours de la transition respiro-fermentaire. Une dernière partie abordera la production de xylitol et des acides organiques.

Pour cela, un ensemble de conditions, représentant le comportement de *C.shehatae* au cours des fermentations réalisées ou en condition théoriques sont analysées sous forme de cartes de flux. Les différentes cartes de flux sont numérotées et classées comme présenté ci-dessous (Figure 43).

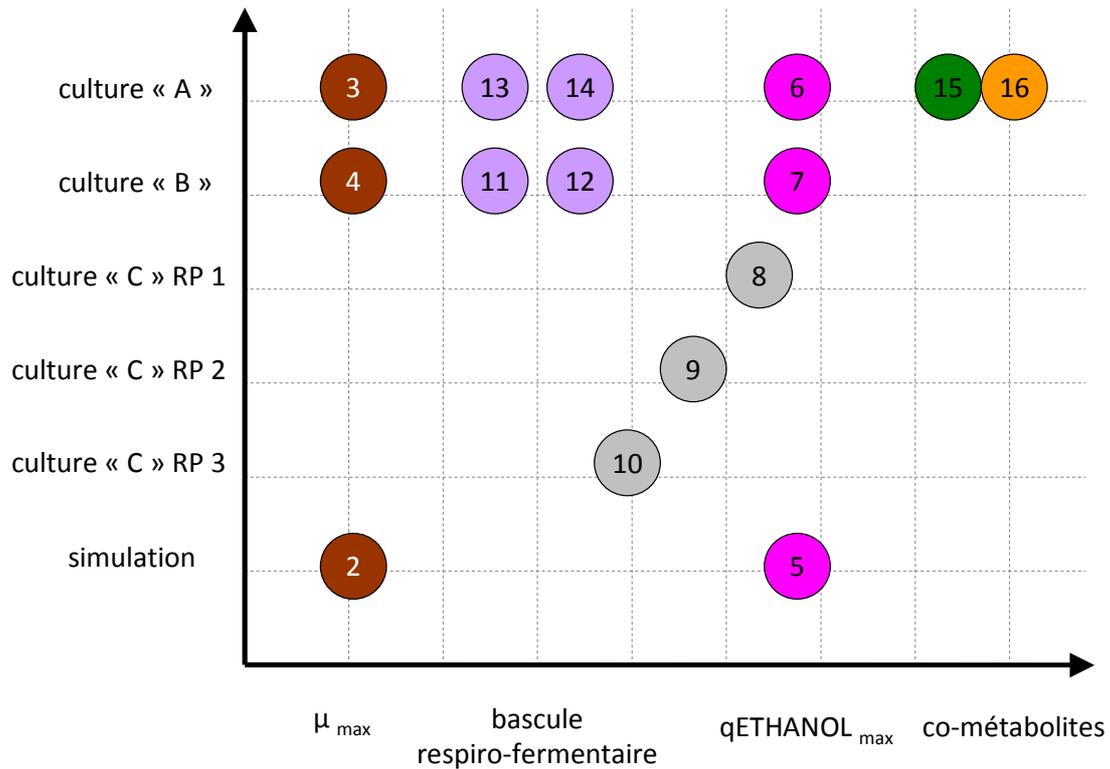


Figure 43. Représentation schématique des différents points pour lesquels une carte de flux sera présentée, chaque numéro correspondant à un calcul de flux.

#### 4.2.1. Analyse comparée lors de la croissance

Les données obtenues expérimentalement et par simulation dans des conditions de croissance sont comparées. Lors des simulations en condition purement oxydative, il a été montré que le rendement maximal en biomasse est de  $0.705 \text{ Cmol}_{\text{biomasse}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$ , soit  $0.61 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ , dans l'hypothèse où la maintenance ( $r_{63}$ ) est faible ( $1 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{h}^{-1}$  à  $\text{coeff}_{\text{nadph}}=0.67$ ). Dans ces conditions, le flux dans le Cycle de Krebs est nul après la formation de l' $\alpha$ -cétoglutarate, intermédiaire de la synthèse des acides aminés.

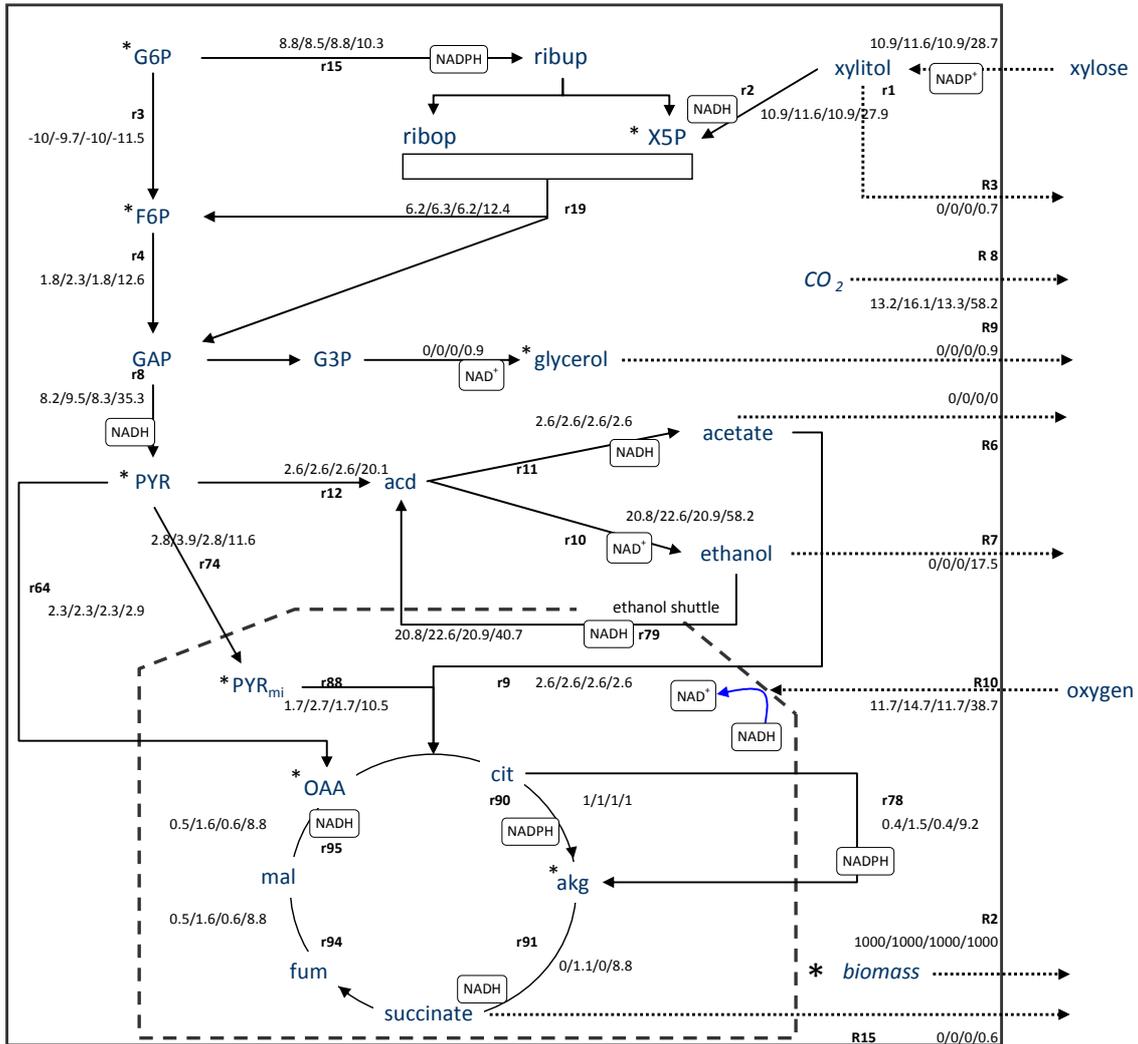
Lors des cultures « A » et « B », l'expérience est initiée en phase aérobie permettant exclusivement la croissance. Les caractéristiques cinétiques sont présentées dans le Tableau 14 pour les points 3 et 4 sélectionnés à croissance maximale (*i.e.*  $\mu_{\max}$ ) pour les cultures « A » et « B ». Pour mémoire, la culture « A » présente juste après le point choisi (point 3) une légère fuite de production vers l'éthanol. Ces deux points de fonctionnement sont comparés aux

données issues du troisième régime permanent de la culture « C » réalisée en mode continu stabilisé à une valeur de QR de 1.53 et donc en mode oxydo-réductif. Ce régime est le plus proche de la bascule entre le métabolisme oxydatif et le métabolisme oxydo-réductif. Les résultats issus des simulations en condition théorique limite pour le production de biomasse sont également indiqués.

**Tableau 14. Caractéristiques macroscopiques et cinétiques des points de fonctionnement à  $\mu_{max}$  lors des cultures « A » et « B », du troisième régime permanent de la culture « C » et de la simulation à  $coeffnadph = 0.67$  en condition théorique limite de production de biomasse.**

		Culture A	Culture B	Culture C	Simulation
t	h	5.33	20.92	RP 3	-
$\mu$	$h^{-1}$	0.31	0.41	0.09	-
[biomasse]	$g.L^{-1}$	0.36	3.14	5.54	-
[xylose] résiduel	$g.L^{-1}$	23.59	20.27	4.42	-
[éthanol]	$g.L^{-1}$	0.00	0.00	4.88	-
QR	$molO_2.molCO_2^{-1}$	1.08	1.26	1.53	1.13
$qO_2$	$mmolO_2.gX^{-1}.h^{-1}$	4.67	3.54	3.52	11.66
$qXYLOSE$	$mCmolS.gX^{-1}.h^{-1}$	18.37	20.45	13.03	54.31
$qEtOH$	$mCmolEtOH.gX^{-1}.h^{-1}$	0.00	0.00	3.22	-
$Y_{oxygène/xylose}$	$molO_2.mol_{xylose}^{-1}$	1.27	0.87	1.35	1.07
Rendements instantanés		$CmolP.CmolS^{-1}$			
éthanol/xylose		0.00	0.00	0.25	0.00
CO2/xylose		0.27	0.28	0.41	0.29
X/xylose		0.73	0.72	0.26	0.71
acides/xylose		0.00	0.00	0.02	0.00
xylitol+glycérol/xylose		0.00	0.00	0.05	0.00
<i>carte</i>		3	4	10	2

Dans un premier temps, les vitesses spécifiques de consommation de xylose et d'oxygène établies lors de la simulation à  $coeffnadph = 0.67$  sont très supérieures à celles obtenues expérimentalement. Cette différence peut être due à une limitation du flux de xylose par le transport dans les conditions expérimentales, phénomène qui n'est pas pris en compte dans le modèle.



**Figure 44.** Carte des flux intracellulaires pour quatre points de fonctionnement (2/3/4/10) : simulation en condition théorique limite de croissance (à  $\text{coeff}_{\text{nadh}} = 0.67$ ), conditions de  $\mu_{\text{max}}$  pour les culture « A » et « B » et troisième régime permanent pour la culture « C ». Les flux sont normés par la biomasse ( $1000 \text{ g}_{\text{biomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Les valeurs sont obtenues avec le modèle possédant la navette éthanol. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la réaction. Les flux sont exprimés en  $\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$  excepté le flux de biomasse ( $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Plus de 94 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes le reste étant contenu au niveau des réactions minoritaires non indiquées sur les cartes.

Le rendement expérimental en biomasse obtenu pour les cultures « A » et « B » est identique au rendement obtenu par simulation.

L'analyse comparée des cartes de flux intracellulaire sur les points de fonctionnement 2,3 et 4 (métabolisme oxydatif pur) et 10 (métabolisme oxydo-réductif post-bascule) permet de dégager les remarques suivantes :

- Certains flux tels que les flux isocitrate déshydrogénase mitochondriale (r90) et acétylCoA synthétase cytosolique (r9) sont proportionnels à la synthèse de biomasse (Figure 44). En effet, la première enzyme fournit du NADPH mitochondrial, utilisé uniquement lors de la synthèse des acides aminés dans ce compartiment et la seconde enzyme produit de l'acétylCoA, précurseur de la synthèse lipidique.
- En métabolisme oxydatif pur, 92 % du flux de xylose consommé remonte la glycolyse à partir du fructose-6-phosphate. En métabolisme oxydo-réductif, ce flux ne représente plus que de 40 % du flux de xylose entrant. Pour la culture « A », il n'est que de 84 %. Cet écart par rapport aux résultats des cartes 2 et 4 (92%) pourrait diagnostiquer précocément le phénomène de fuite vers l'éthanol.
- Une prise en charge du pyruvate de l'ordre de 1/3 par la pyruvate déshydrogénase (r88), 1/3 par la pyruvate carboxylase (r64) et 1/3 par la pyruvate décarboxylase (r12).
- En métabolisme oxydatif pur, la dissipation énergétique est faible, inférieure à  $1 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ .

Les flux calculés à partir des conditions expérimentales oxydatives, à production de biomasse équivalente, sont très proches de ceux simulés par le modèle métabolique (Figure 44). Le modèle décrit donc parfaitement la répartition de carbone pour les conditions identifiées. L'hypothèse d'une faible dispersion énergétique est vérifiée, comme le montre le Tableau 15 : la dissipation énergétique est inférieure à  $1 \text{ mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  en mode oxydatif, mais est multipliée par 4 en mode oxydo-réductif (RP3 de la culture « C »).

**Tableau 15. Valeur du flux d'ATP dissipé via la maintenance en  $\text{mol}_{\text{ATP}}/\text{mol}_{\text{xylose}}$ .**

	r63 : maintenance
simulation croissance	0.01
$\mu_{\text{max}}$ culture A	0.91
$\mu_{\text{max}}$ culture B	0.04
RP3	3.72

Une forte différence est observée entre le régime oxydo-réductif (RP3) et les conditions strictement oxydatives (simulation et  $\mu_{max}$ ). En effet, le flux d'entrée de xylose, normé pour une production de 1000 g de biomasse, est 2.6 fois plus élevé en condition oxydo-réductive qu'en condition oxydative, le flux dans le TCA et le flux d'oxygène entrant sont également plus élevés respectivement multiplié par 10 et par 3.3.

#### 4.2.2. Analyse comparée en production d'éthanol

Les données obtenues expérimentalement et par simulation dans des conditions de production d'éthanol sont comparées. Lors des simulations en condition oxydo-réductive, il a été montré que le rendement théorique limite est de  $0.62 \text{ Cmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  à un rendement en oxygène/xylose de  $0.33 \text{ mol}_{\text{oxygène}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  pour une valeur de *coeffnadph* égale à 0.67 (carte 5).

Pour obtenir les cartes de flux intracellulaires, les points de fonctionnement expérimentaux ont été choisis à  $q_{\text{ETHANOL}_{max}}$  pour les cultures « A » et « B » (mode oxydo-réductif, cartes 6 et 7) ainsi que le premier régime permanent de la culture « C » en mode oxydo-réductif (carte 8). Les caractéristiques macroscopiques et cinétiques sont présentées dans le Tableau 16. Ce régime permanent est caractérisé par une valeur de QR la plus élevée (3.84) ainsi qu'une vitesse spécifique de production d'éthanol la plus élevée ( $10.13 \text{ mCmol} \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

La simulation est réalisée en condition oxydo-réductive mais sans production de biomasse. Par conséquent, il est impossible de calculer des vitesses spécifiques de consommation et de production. Néanmoins, les vitesses nettes de consommation d'oxygène et de xylose issues du modèle sont respectivement de  $33.5 \text{ molO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$  et  $100 \text{ mol}_{\text{xylose}} \cdot \text{h}^{-1}$  pour une vitesse nette de production d'éthanol de  $155.5 \text{ mol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{h}^{-1}$ .

**Tableau 16. Caractéristiques macroscopiques et cinétiques des points de fonctionnement à  $q_{\text{ETHANOL}_{\text{max}}}$  lors des cultures « A » et « B », des trois régimes permanents de la culture « C » et de la simulation en condition théorique limite de production d'éthanol à  $\text{coeff}_{\text{nadph}} = 0.67$  et à  $Y_{\text{O}_2/\text{xylose}}$  de  $0.33 \text{ mol.mol}^{-1}$ .**

		Culture A	Culture B	Culture C	Culture C	Culture C	Simulation
t	h	27.09	66.47	RP 1	RP 2	RP 3	-
$\mu$	$\text{h}^{-1}$	0.10	0.00	0.039	0.037	0.09	-
[biomasse]	$\text{g.L}^{-1}$	33.43	64.17	2.22	4.42	5.54	-
[xylose] <sub>résiduel</sub>	$\text{g.L}^{-1}$	63.08	21.70	2.71	0.51	4.42	-
[éthanol]	$\text{g.L}^{-1}$	9.82	18.13	10.68	8.26	4.88	-
QR	$\text{molO}_2.\text{molCO}_2^{-1}$	1.97	2.34	3.84	2.28	1.53	5.64
$q_{\text{O}_2}$	$\text{mmolO}_2.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$	3.32	1.03	1.86	1.70	3.52	-
$q_{\text{XYLOSE}}$	$\text{mCmolS}.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$	17.87	6.04	19.77	10.19	13.03	-
$q_{\text{EtOH}}$	$\text{mCmolEtOH}.\text{gX}^{-1}.\text{h}^{-1}$	6.17	2.61	10.13	4.05	3.22	-
$Y_{\text{oxygène/xylose}}$	$\text{molO}_2.\text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$	0.93	0.86	0.47	0.83	1.35	0.33
Rendements instantanés		$\text{CmolP}.\text{CmolS}^{-1}$					
éthanol/xylose		0.35	0.44	0.51	0.40	0.25	0.62
$\text{CO}_2/\text{xylose}$		0.37	0.40	0.36	0.38	0.41	0.34
X/xylose		0.22	0.12	0.10	0.20	0.26	0.00
acides/xylose		0.03	0.01	0.003	0.00	0.02	0.00
xylitol+glycérol/xylose		0.04	0.04	0.02	0.02	0.05	0.00
carte		6	7	8	9	10	5

Lorsque les vitesses spécifiques maximales de production d'éthanol sont atteintes pour chaque culture, les rendements en éthanol sont inférieurs au rendement théorique limite prévu par le modèle. Une partie du carbone sert à la croissance (entre 10 et 22 %). La production de  $\text{CO}_2$  est par ailleurs toujours supérieure de 6 à 20 % à la valeur estimée par le modèle. Le rapport entre les vitesses de consommation d'oxygène et de xylose (en  $\text{mol.mol}^{-1}$ ) est inférieur à 1 et expérimentalement plus faible pour le premier régime permanent : les valeurs sont respectivement de 0.93, 0.86 et 0.47 pour les cultures « A », « B » et « C ».



- Au niveau du nœud pyruvate, le flux est divisé entre la PDC (r12) (de 94 à 77 % du flux), la pyruvate carboxylase (r64) (maximum 5 % du flux), et la PDH (r88) (maximum 18 % du flux) alors que la simulation prévoit que 100 % du flux de pyruvate soit converti en acétaldéhyde via la PDC puis l'ADH (r12+r10). Ceci est dû au fait que dans la simulation le Cycle de Krebs ne fonctionne pas compte tenu de l'absence de croissance.
- Par ailleurs, en fonction de la quantité de biomasse produite expérimentalement, le flux dans le Cycle de Krebs est évidemment non nul. L'analyse du flux au niveau de l'isocitrate déshydrogénase (r90) montre qu'en mode oxydo-réductif 0.95 mmol d' $\alpha$ -cétoglutarate sont nécessaires à la synthèse d'un gramme de biomasse.
- Comme interprété dans le Chapitre 3, l'analyse des flux de production d'éthanol (R7) montre que le rendement éthanol/xylose diminue quand le rendement  $Y_{\text{oxygène/xylose}}$  augmente.
- La dissipation énergétique en conditions oxydo-réductives varie entre 2 et 4  $\text{mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  soit un facteur de 2 à 100 par rapport aux conditions oxydatives (entre 0.04 et 1  $\text{mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ ) (Tableau 17).

**Tableau 17. Valeur du flux d'ATP dissipé en  $\text{mol}_{\text{ATP}} \cdot \text{h}^{-1} / \text{mol}_{\text{xylose}} \cdot \text{h}^{-1}$ .**

	r63 : maintenance
simulation éthanol	2.45
qETHANOL <sub>max</sub> culture A	2.87
qETHANOL <sub>max</sub> culture B	3.26
RP1	2.16

### 4.2.3. Analyse de la bascule respiro-fermentaire

Quatre points de fonctionnement ont été choisis dans la zone de la transition respiro-fermentaire lors des cultures « A » et « B » (points 11, 12, 13 et 14). Les caractéristiques macroscopiques et cinétiques de ces points de fonctionnement sont présentées dans le Tableau 18. Ces points de fonctionnement correspondent à des valeurs de quotient respiratoire de 1.06 et 1.07 (cartes 11 et 13) caractéristiques d'un métabolisme oxydatif (limite

théorique établie à 1.13). Les deux autres points de fonctionnement (cartes 12 et 14) se caractérisent par des valeurs de QR de respectivement 1.24 et 1.33, caractéristiques de condition d'induction de la production d'éthanol.

**Tableau 18. Caractéristiques macroscopiques et cinétiques des points de fonctionnement au moment de la bascule respiro-fermentaire au cours des cultures « A » et « B ».**

		Culture A		Culture B	
		bascule 1	bascule 2	bascule 1	bascule 2
t	h	6.75	10.22	50.98	57.21
$\mu$	$h^{-1}$	0.30	0.26	0.04	0.04
[biomasse]	$g.L^{-1}$	0.57	1.48	45.06	57.44
[xylose] <sub>résiduel</sub>	$g.L^{-1}$	23.29	21.40	0.00	0.00
[éthanol]	$g.L^{-1}$	0.00	0.06	0.00	0.77
QR	$molO_2.molCO_2^{-1}$	1.07	1.33	1.06	1.24
qO <sub>2</sub>	$mmolO_2.gX^{-1}.h^{-1}$	3.99	3.49	1.30	1.46
qXYLOSE	$mCmolS.gX^{-1}.h^{-1}$	16.36	16.80	2.94	3.84
qEtOH	$mCmolEtOH.gX^{-1}.h^{-1}$	0.00	1.69	0.00	0.49
Y <sub>oxygène/xylose</sub>	$molO_2.mol_{xylose}^{-1}$	1.22	1.04	2.22	1.90
Rendements instantanés		$CmolP.CmolS^{-1}$			
éthanol/xylose		0.00	0.10	0.00	0.13
CO <sub>2</sub> /xylose		0.26	0.27	0.47	0.47
X/xylose		0.72	0.61	0.51	0.42
acides/xylose		0.02	0.03	0.02	0.00
xylitol+glycérol/xylose		0.00	0.00	0.00	0.00
carte		13	14	11	12

La transition respiro-fermentaire est mise en évidence pour les deux cultures sur les rendements en éthanol : le rendement augmente de 0 à 10 et 13 % entre les deux points de fonctionnement. Les deux cultures sont dans des conditions très différentes. Le substrat est en excès dans la culture « A », la concentration en biomasse est faible, puisque qu'il s'agit du début de la fermentation et le taux de croissance est élevé. Pour la culture « B », le taux de croissance est faible, la concentration en biomasse est très élevée et la culture est menée en limitation de substrat (concentration en xylose résiduel nulle). On observe que l'augmentation du rendement en éthanol se fait au détriment de la biomasse tandis que le rendement en CO<sub>2</sub> n'est pas modifié dans un premier temps.

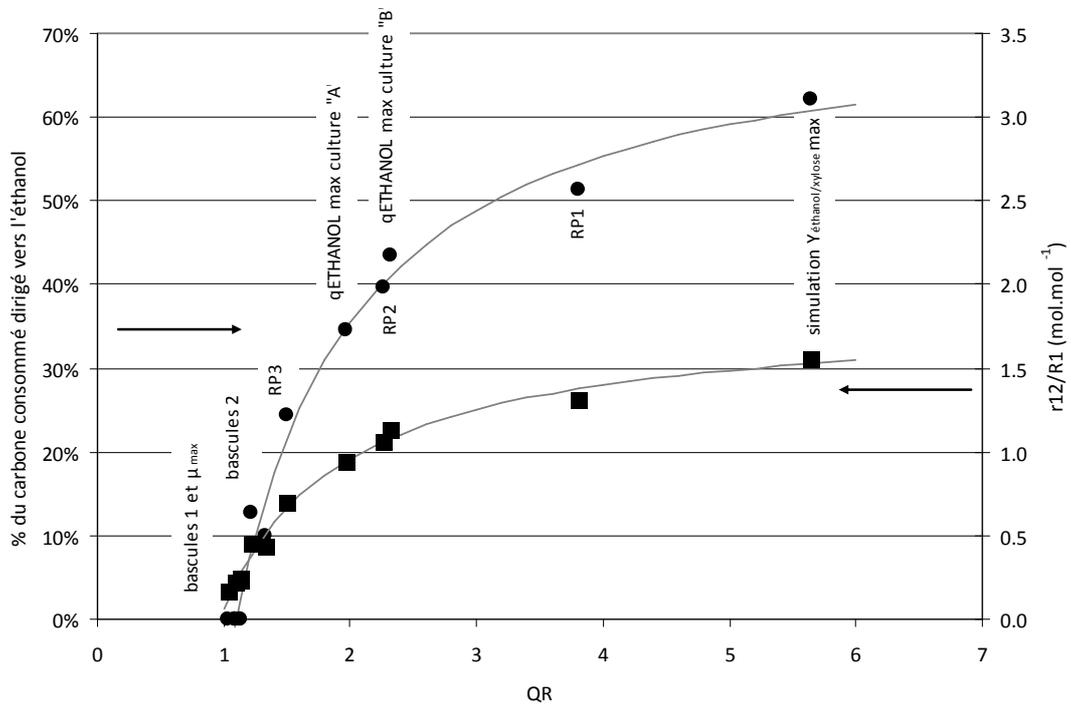
Pour la culture « A », la vitesse de consommation de xylose qXYLOSE est quasi-identique entre les deux points tandis que la vitesse spécifique de consommation d'oxygène qO<sub>2</sub> chute de

12 %. Le tableau montre par ailleurs que les deux points de fonctionnement ne diffèrent que par la valeur du rendement  $Y_{O_2/xylose}$  qui diminue de 1.22 à 1.04 mol.mol<sup>-1</sup>, la culture n'étant limitée ni en oxygène ni en xylose et les valeurs de taux de croissance sont proches.

Pour les points de fonctionnement de la culture « B », la transition respiro-fermentaire se produit alors que les valeurs de  $Y_{O_2/xylose}$  sont de 2.22 et 1.90 mol.mol<sup>-1</sup>. Cette différence est principalement due à la vitesse spécifique de consommation du xylose qui augmente de 30% tandis que la vitesse spécifique de consommation d'oxygène n'augmente que de 12 %.



métabolisme oxydo-réductif de plus en plus producteur d'éthanol, le point maximum correspondant à la simulation du rendement théorique limite de production d'éthanol. La zone de bascule respiro-fermentaire semble se situer à environ  $1.15 \text{ molCO}_2.\text{molO}_2^{-1}$ , ce qui correspond à un flux normé de  $0.30 \text{ mol}_{\text{pyruvate}}.\text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$  ( $r_{12}/R_1$ ). La limite thermodynamique supérieure définie par le modèle donne une valeur de QR de 1.13 pour des conditions théoriques limite de production de biomasse.



**Figure 47. Pourcentage de carbone consommé converti en éthanol (●) et flux via la pyruvate décarboxylase ( $r_{12}$ ) normé par l'entrée de xylose ( $R_1$ ) (■) en fonction de la valeur du QR expérimental.**

L'analyse comparée des cartes de flux intracellulaires entre les conditions de culture de « A » et de « B » (comportement au niveau des points 13 - 14 versus 11 - 12) montre :

- Le flux de carbone dans la partie oxydative des PP est 2 fois plus important en condition non limitante de xylose (culture « A ») qu'en condition limitante (culture « B »). Néanmoins, le flux de  $\text{CO}_2$  excrété est plus important pour la culture « B » (1.7 fois). Cette différence peut être expliquée par le fait qu'en condition de limitation en xylose (culture « B »), le flux de production de NADPH dans la voie des PP ( $r_{15}$ ) est

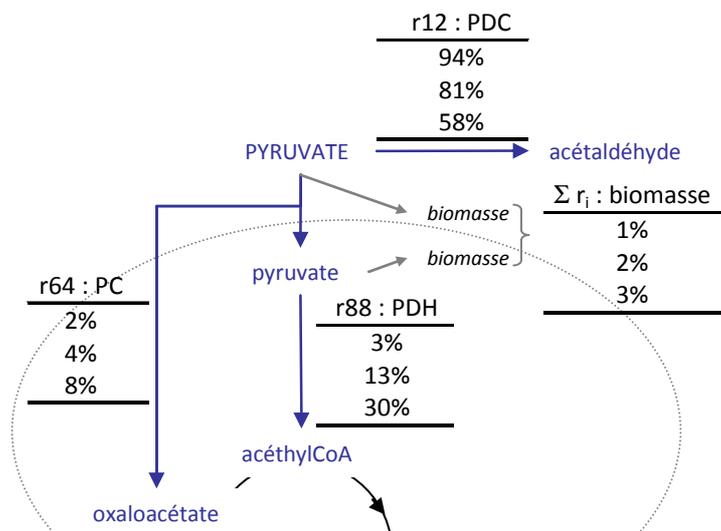
plus faible et donc le flux dans la voie r78 (citrate ->  $\alpha$ -cétoglutarate cytosolique) doit augmenter pour couvrir les besoins cytosoliques en NADPH. Cette augmentation de flux se traduit par une augmentation globale des flux dans le Cycle de Krebs (facteur 10 au niveau de r91). Comme le Cycle de Krebs conduit à 3 décarboxylations au lieu de une via la voie oxydative des PP (r15), la production de CO<sub>2</sub> est augmentée.

- De plus, l'augmentation de l'activité globale du Cycle de Krebs en limitation de xylose se traduit par une plus forte production de NADH mitochondrial qui doit être régénéré via la chaîne respiratoire, conduisant ainsi à une augmentation de la consommation d'oxygène (R10).
- Lors de la transition respiro-fermentaire, les flux dans la glycolyse entre le F6P et le pyruvate (r4 et r8) augmentent due à la diminution du flux de F6P vers la voie oxydative des PP (r3 et r15). Ce phénomène induit une augmentation de la production de NADH cytosolique dans la réaction r8 qui ne peut être reconstitué que par la voie de production d'éthanol r10. La production d'éthanol augmente donc et le métabolisme bascule d'un mode oxydatif à un mode oxydo-réductif. Ces résultats sont corroborés également par l'analyse des flux dans la PDC (r12) qui sont multipliés par deux après la transition respiro-fermentaire (de 17 et 22 mol.h<sup>-1</sup> avant à 44 et 46 mol.h<sup>-1</sup> après la bascule). De nombreuses études sur *S.cerevisiae* ont démontrées l'implication du noeud pyruvate dans la bascule respiro-fermentaire pour les levures Crabtree positives (Pronk *et al.*, 1996; Van Urk *et al.*, 1989b; Van Urk *et al.*, 1990).

Au vu des cartes de flux, d'autres enzymes peuvent révéler les différences de métabolismes, à savoir outre la PDC, la pyruvate carboxylase (r64), la pyruvate déshydrogénase (r88), l'alcool déshydrogénase (r10) et l'acétaldéhyde déshydrogénase (r11).

En effet, chez *S.cerevisiae*, la bascule respiro-fermentaire serait due à la succession des événements suivants : dans un premier temps, la saturation de la pyruvate déshydrogénase entraîne une déviation du flux de pyruvate vers le by-pass de la pyruvate déshydrogénase. Ensuite, l'acétylCoA synthétase est saturée, entraînant une accumulation d'acétate. L'acide acétique accumulé a un effet découplant sur la respiration, se traduisant par une augmentation du qO<sub>2</sub>. Ainsi, la capacité maximale d'oxydation par la mitochondrie est atteinte. Le micro-organisme doit alors générer de l'ATP supplémentaire par la voie fermentaire entraînant la bascule métabolique vers la production d'éthanol.

La PDH est considérée comme constitutive chez *P.stipitis* (Passoth *et al.*, 1996) mais aucune étude n'a été menée chez *C.shehatae* dans ce sens. Au cours de la culture « A », le flux via la PDH diminue graduellement avec la diminution de la respiration ne permettant pas de conclure à la saturation de cette enzyme (Tableau 19). En revanche, au cours de la culture « B », ce flux augmente avant la bascule puis diminue juste après la bascule, allant dans le sens de la saturation de cette enzyme. Au cours de la culture continue « C », le flux via la PDH représente 3 à 30 % du flux de pyruvate pris en charge (Figure 48). Le flux de pyruvate dirigé vers l'acétylCoA diminue avec l'augmentation du niveau de respiration. La valeur pour le 3<sup>e</sup> régime permanent correspond à celles obtenues en oxydatif pour les cultures discontinues alimentées et la culture est pourtant en mode oxydo-réductif.



**Figure 48. Répartition du pyruvate dans les différentes voies métaboliques en fonction du régime permanent : de haut en bas RP1, RP2, RP3. PC : pyruvate carboxylase, PDH : pyruvate déshydrogénase, PDC : pyruvate décarboxylase. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du flux total de pyruvate consommé.**

**Tableau 19. Répartition du pyruvate dans les différentes voies métaboliques en fonction des différentes simulations et cultures. PC : pyruvate carboxylase, PDH : pyruvate déshydrogénase, PDC : pyruvate décarboxylase. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du flux total de pyruvate consommé.**

	r12 : PDC	r64 : PC	r88 : PDH	$\Sigma r_i$ : biomasse
simulation croissance	33%	30%	21%	15%
$\mu_{max}$ culture A	29%	27%	31%	13%
bascule1 culture A	30%	27%	29%	14%
bascule2 culture A	51%	20%	19%	10%
qETHANOL <sub>max</sub> culture A	77%	5%	16%	2%
$\mu_{max}$ culture B	34%	30%	22%	15%
bascul1 culture B	16%	15%	62%	7%
bascul2 culture B	40%	8%	47%	5%
qETHANOL <sub>max</sub> culture B	82%	3%	14%	1%
simulation éthanol	100%	0%	0%	0%

Chez *S.cerevisiae*, le flux dévié de la PDH est détourné vers le by-pass constitué de la pyruvate décarboxylase, de l'acétaldéhyde déshydrogénase, de l'acétylCoA synthétase et du transport de l'acétylCoA vers la mitochondrie. Dans le cas de *C.shehatae*, le flux via la PDC augmente lors de la bascule respiro-fermentaire pour les cultures discontinues alimentées. Le flux d'acétaldéhyde cytosolique total (dont une majeure partie provient de l'acétaldéhyde mitochondrial impliqué dans le cycle futile autour de la navette éthanol) est divisé entre l'alcool déshydrogénase (r10) et l'acétaldéhyde déshydrogénase (r11). Si on ne tient pas compte du flux spécifique à la navette éthanol qui augmente artificiellement le flux de l'ADH, la répartition de l'acétaldéhyde est tournée vers le by-pass de la PDH avant la bascule et vers l'ADH après la bascule (Tableau 20). Le flux d'acétate formé par l'Ald.DH est converti en acétylCoA à plus de 90 %. La bascule est donc caractérisée par la déviation de l'acétaldéhyde du by-pass de la PDH vers l'ADH.

**Tableau 20. Répartition de l'acétaldéhyde dans les différentes voies métaboliques en fonction des différentes simulations et cultures. ADH : alcool déshydrogénase, Ald.DH : acétaldéhyde déshydrogénase.**

	r10 : ADH	r11 : Ald.DH
simulation croissance	0%	100%
$\mu_{\max}$ culture A	0%	100%
bascule1 culture A	0%	100%
bascule2 culture A	57%	43%
qETHANOL <sub>max</sub> culture A	92%	8%
$\mu_{\max}$ culture B	0%	100%
bascul1 culture B	0%	100%
bascul2 culture B	70%	30%
qETHANOL <sub>max</sub> culture B	96%	4%
RP1	98%	2%
RP2	94%	6%
RP3	87%	13%
simulation éthanol	100%	0%

D'autres données seraient nécessaires afin d'étudier plus précisément la bascule métabolique, notamment par l'utilisation de molécules découplantes ou par productions de mutants pour les enzymes impliquées dans le nœud pyruvate, tel que cela a été réalisé chez *S.cerevisiae*. En fonction des conditions de culture (oxygène et/ou xylose limitant ou non), les résultats ont montré une réorganisation du métabolisme au niveau de la régénération des cofacteurs NADH et NADPH induisant une modulation du flux via la chaîne respiratoire (et donc de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène) et la nécessité ou non de passer par la voie de production d'éthanol (voie de la PDC r12). Afin de définir des stratégies simples de conduite pour l'intensification de la production d'éthanol, l'étude de l'impact du rendement oxygène/xylose est évalué à partir des données expérimentales de la culture continue (RP1, RP2 et RP3 ; cartes 8, 9 et 10).

#### 4.2.4. Etude sur l'impact du rendement oxygène

L'importance du rendement oxygène/xylose est analysée via la comparaison des cartes des flux intracellulaires calculées pour les 3 points de fonctionnement issus de la culture continue « C » réalisée en mode oxydo-réductif.



Les différences les plus importantes sont – une fois encore – observées après le nœud pyruvate. Le flux pris en charge par la PDC (r12) diminue de 20% entre RP1 et RP2 et de 47% entre RP1 et RP3. En contrepartie, les flux dans les voies de la PDH et de la PC (r88 et r64) augmentent d'un facteur 4.3 et 9.4 entre les régimes RP1 et RP2 et RP1 et RP3 pour la PDH et d'un facteur 1.7 et 3.4 pour la PC dans les mêmes conditions.

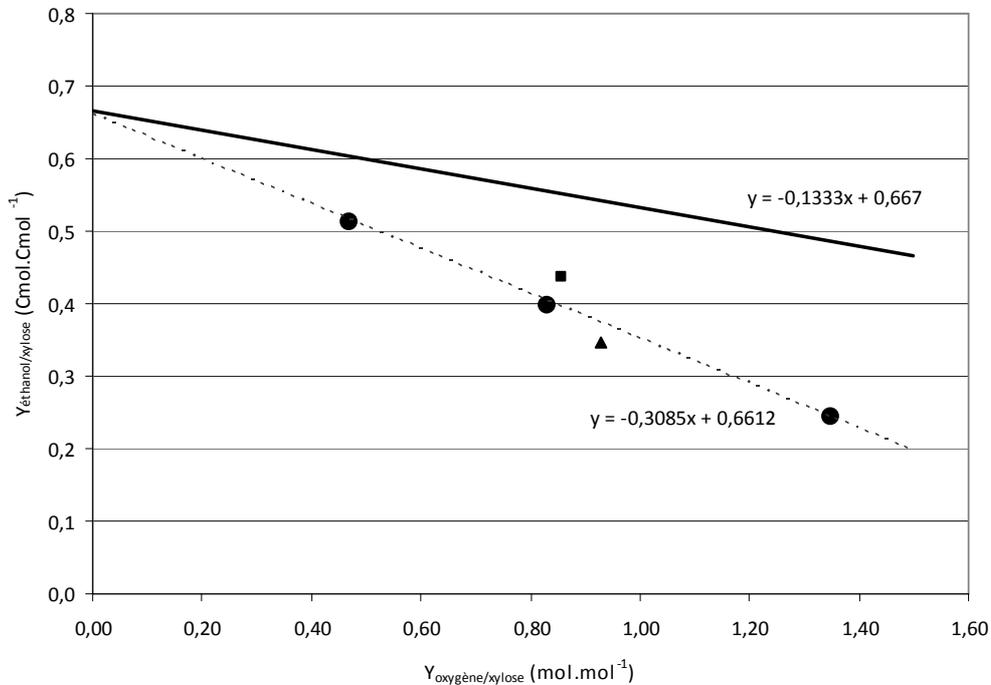
Le flux au niveau du Cycle de Krebs (r91) est multiplié par 7 et par 17 entre RP1 et RP2 et RP1 et RP3. Cette augmentation est liée à l'augmentation des besoins en NADPH cytosolique pour la synthèse de biomasse (r78) conduisant à une synthèse d' $\alpha$ -cétoglutarate mitochondrial supérieure et donc à une augmentation globale des flux du Cycle de Krebs.

Cette augmentation des flux dans le TCA conduit à une production accrue en NADH, qui est régénéré via la chaîne respiratoire, grâce à l'augmentation du flux de consommation d'oxygène. Ce flux normé (i.e. le rendement oxygène/xylose) augmente conduisant à une production de plus en plus élevée de CO<sub>2</sub> (décarboxylation via le Cycle de Krebs) et une diminution de la production d'éthanol. Le flux dans la navette éthanol – acétaldéhyde assurant le « transport » du NADH cytosolique vers la mitochondrie est d'autant plus important que le rendement oxygène/xylose augmente.

Cette analyse montre que la diminution du rapport de flux substrats oxygène/xylose permet d'orienter le flux de carbone vers la production d'éthanol. Le mode de culture ne permet pas de s'affranchir de la production de biomasse et le faible taux de croissance imposé entraîne des productivités en éthanol très faibles : 0.413, 0.321 et 0.418 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour les régimes permanents 1,2 et 3. Alexander *et al.*, (1987) avaient obtenu une productivité maximale de 1.75 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> lors de cultures de *C.shehatae* en mode continu.

Ainsi, les rendements éthanol/xylose peuvent être tracés en fonction du rendement oxygène/xylose en conditions théoriques limites et expérimentales (Figure 50).

Les rendements expérimentaux en éthanol sont inférieurs aux rendements théoriques limites calculés et ce, comme attendu du fait de la production non négligeable de biomasse. Néanmoins, l'écart entre les droites théorique et expérimentale se réduit à mesure que le rendement oxygène/xylose tend vers 0 c'est-à-dire l'anaérobie stricte (métabolisme réductif pur).



**Figure 50. Corrélation entre les rendements oxygène et éthanol sur xylose. Valeurs des rendements obtenus à qETHANOL max pour la culture « A » (▲), à qETHANOL max pour la culture « B » (■), valeurs moyennes lors des régimes permanents pour la culture « C » (●). Régression linéaire à partir des points expérimentaux ( $R^2=0.9808$ ) en traits discontinus et relation théorique en condition théorique limite de production d'éthanol issue de la modélisation en trait plein.**

Lors de la culture continue « C », les rendements éthanol, biomasse et CO<sub>2</sub>, qui représentent plus de 95% du carbone total, varient linéairement en fonction du rendement oxygène. Les relations sont les suivantes, avec Y<sub>P/S</sub> en Cmol.Cmol<sup>-1</sup> et Y<sub>oxygène/xylose</sub> en mol.mol<sup>-1</sup> :

- $Y_{\text{éthanol/xylose}} = -0.302 * Y_{\text{oxygène/xylose}} + 0.6518 - (R^2 = 0.9996)$
- $Y_{\text{CO}_2/\text{xylose}} = 0.0618 * Y_{\text{oxygène/xylose}} + 0.329 - (R^2 = 0.9994)$
- $Y_{\text{biomasse/xylose}} = 0.2154 * Y_{\text{oxygène/xylose}} - (R^2 = 0.9701)$

#### 4.2.5. Analyse des flux intracellulaires en condition anaérobie

La culture « A » a été réalisée en mode discontinu alimenté et une phase anaérobie sous flux d'azote a été conduite à partir de 30 heures de culture (cf. 4.1). Le modèle (navette éthanol-acétaldéhyde) a été utilisé pour calculer les flux intracellulaires pour 2 points de fonctionnement correspondants à des vitesses spécifiques maximales de production de xylitol (carte 16) et de succinate (carte 17) (Figure 51). Chronologiquement, la production de xylitol précède la production de succinate.

En condition aérobie, le succinate est produit par voie oxydative à travers le Cycle de Krebs et son excrétion correspond à un flux trop important dans cette voie. Le métabolisme entraînant la production de succinate en anaérobie est totalement différent. La branche du Cycle de Krebs est connue pour fonctionner dans le sens réducteur en condition anaérobie allant de l'oxaloacétate au succinate en passant par le malate et le fumarate (Atzpodien *et al.*, 1968; Chapman & Bartley, 1968). La Figure 51 montre bien un flux de l'oxaloacétate vers le succinate qui explique l'accumulation extracellulaire de succinate.

En revanche, la réaction de conversion de l' $\alpha$ -cétoglutarate vers le succinate (succinylCoA synthétase et succinate déshydrogénase (r91)) et la réaction de la pyruvate déshydrogénase (r88) sont connues pour être irréversibles. Si les flux obtenus dans la branche réductive du Cycle de Krebs semblent cohérents avec la condition imposée, les faibles flux négatifs (donc thermodynamiquement impossibles) calculés au niveau de la PDH (Figure 51) et de l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase sont probablement liés aux erreurs expérimentales ou à des erreurs dues au modèle construit pour des conditions en présence d'oxygène (pas de contraintes sur les flux lorsque la chaîne respiratoire ne fonctionne pas) (cf. publication au Chapitre 3). La chaîne respiratoire est normalement complètement inhibée en absence d'oxygène, mais le modèle n'est pas capable de gérer le flux de  $FAD^+$  produit par la branche réductive du TCA et le modèle renvoie un cycle futile autour de la chaîne respiratoire conduisant à un bilan nul en ce qui concerne l'oxygène. Ces réactions n'ont aucune réalité biologique et le modèle ne permet pas de décrire correctement ces phénomènes. Il devrait être implémenté en supprimant la chaîne respiratoire, en considérant le cycle de Krebs selon deux branches distinctes (suppression de la voie r93 du succinate au fumarate) et en

considérant une accumulation de  $FAD^+$  ou son utilisation dans d'autres réactions mitochondriales (Bideaux, 2000; Colombié, 2005; Pagliardini, 2010; Pagliardini *et al.*, 2013).

La branche réductive permet de fournir du  $NAD^+$  en absence d'oxygène et permet ainsi le fonctionnement de la navette éthanol-acétaldéhyde. Cette navette permet d'augmenter le flux via l'ADH (r10) fournissant une grande quantité de  $NAD^+$  cytosolique. La demande en NADH est diminuée par l'excrétion de xylitol dans un premier temps, mais ce levier n'est visiblement pas suffisant puisque la production de succinate est également enclenchée. Lors de culture de *S.cerevisiae* sur glucose, la régénération du  $NAD^+$  est supportée par la production de glycérol ; *C.shehatae* ne produit que très peu de glycérol à partir de xylose car le bilan énergétique est négatif lors de cette production (cf. 1.1) (Bruinenberg *et al.*, 1983a), la souche produit alors du xylitol.

Le fonctionnement en condition anaérobie entraîne un arrêt de la croissance. Une chute de la viabilité est possible en raison de la présence des acides organiques (succinique et acétique) et d'éthanol dans le milieu mais n'a pas été mesurée.

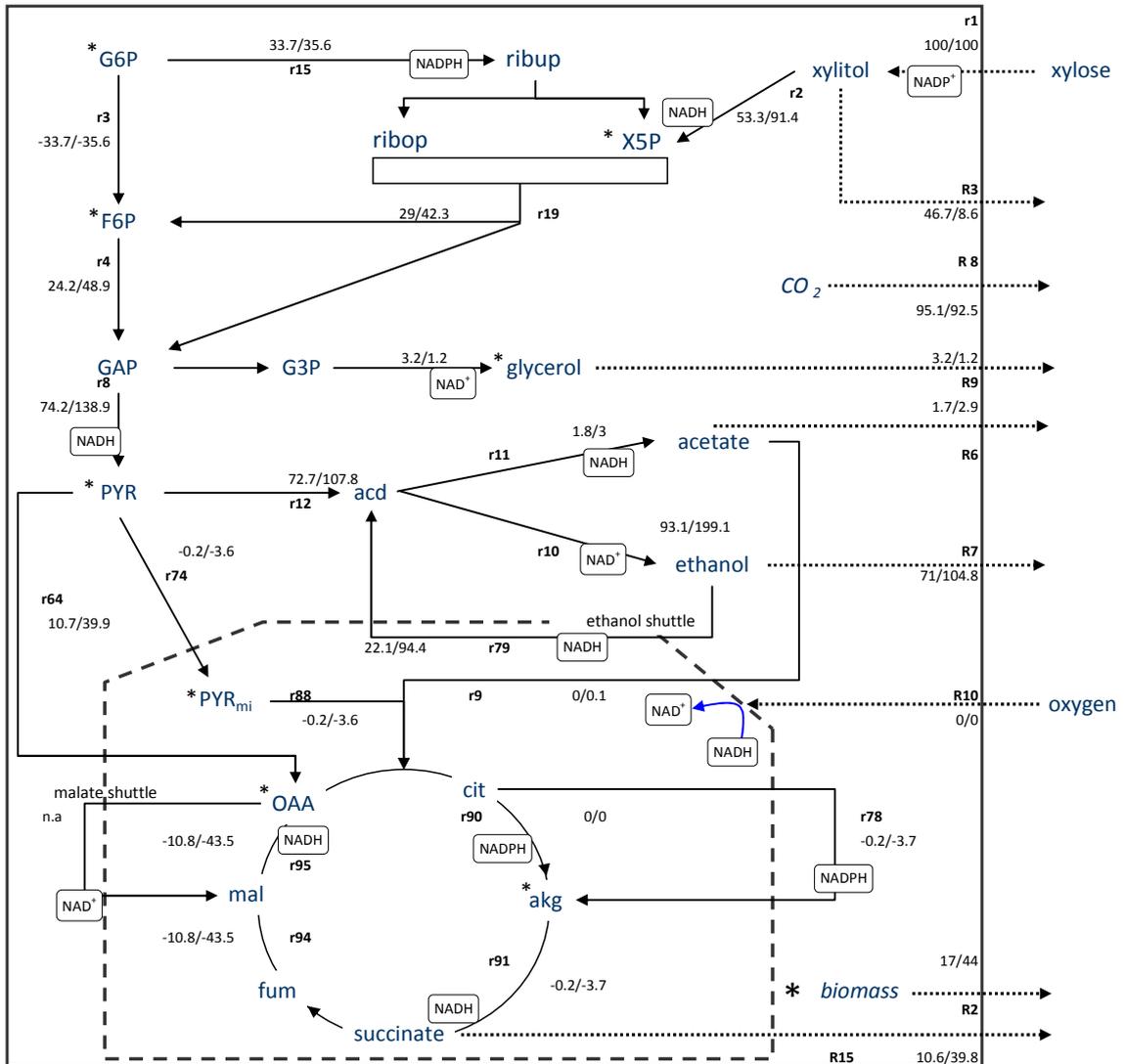


Figure 51. Carte des flux intracellulaires pour deux points de fonctionnement (16/15) : valeurs obtenues lors de la culture « A » à  $q_{\text{XYLITOL}_{\text{max}}}$  et  $q_{\text{SUCCINATE}_{\text{max}}}$ . Les flux sont normés par le xylose ( $100 \text{ mol}_{\text{xylose}} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Les valeurs sont obtenues avec le modèle possédant la navette éthanol. Les espèces encadrées sont celles produites au cours de la réaction. Les flux sont exprimés en  $\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$  excepté le flux de biomasse ( $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Plus de 94 % du NADH, du NADPH et de l'ATP sont représentés sur ces cartes le reste étant contenu au niveau des réactions minoritaires non indiquées sur les cartes.



---

# Discussion générale, Conclusions et Perspectives

---



## Discussion

---

Les travaux décrits dans ce document visent à améliorer les connaissances métaboliques de la levure *Candida shehatae*, levure capable de métaboliser les sucres C6 et C5 afin de proposer des modes de conduite pertinents pour la valorisation de la biomasse lignocellulosique en éthanol. Ces travaux sont structurés en deux parties majeures :

- la construction d'un modèle métabolique adapté à *Candida shehatae*, sa validation et son utilisation en simulation pour déterminer les performances maximales atteignables par cette souche.
- Le modèle a été ensuite utilisé pour obtenir des cartes de flux intracellulaires à partir de données expérimentales obtenues lors de cultures de la souche en conditions d'environnement rigoureusement quantifiées. L'analyse comparée des données extra et intracellulaires a permis d'accroître les connaissances sur le métabolisme de *Candida shehatae* et de proposer des modes de conduite visant à optimiser la conversion du xylose en produits d'intérêt. Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence et de quantifier le rôle majeur de l'oxygène vis-à-vis des cofacteurs et de l'énergétique cellulaire.

L'analyse bibliographique a permis d'identifier les avancées majeures dans la connaissance du métabolisme de la levure *Candida shehatae* naturellement capable de consommer le xylose, et les besoins d'approfondissement pour maîtriser son comportement. Ses spécificités sur xylose résident dans les couplages énergétiques et oxydo-réductifs des voies métaboliques, l'ensemble du système étant perturbé par une variation des cofacteurs enzymatiques. Il a été relevé que l'oxygène, en tant qu'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire joue un rôle sur la balance oxydo-réductive dans la cellule. La tolérance de la souche à l'éthanol est très nettement inférieure à celle de *S.cerevisiae* : les concentrations en éthanol critiques pour la croissance (30 g.L<sup>-1</sup>) et la production d'éthanol (37 g.L<sup>-1</sup>) sont inférieures pour *C.shehatae* à celles de *S.cerevisiae*. Les concentrations maximales en éthanol reportées dans la littérature restent inférieures ou égales à 50 g.L<sup>-1</sup>. De nombreuses questions scientifiques restent donc à élucider pour maîtriser le comportement dynamique et métabolique de *Candida shehatae* sur

xylose à savoir (i) comment se répartissent les flux de carbone intracellulaires, (ii) est-il possible alors d'orienter préférentiellement le carbone vers la production d'un métabolite d'intérêt par la conduite du réacteur et/ou en modifiant l'environnement du micro-organisme ? L'identification du rôle de l'oxygène et plus largement la connaissance de la répartition des équilibres d'oxydo-réduction entre le cytosol et la mitochondrie doivent permettre d'améliorer la compréhension du fonctionnement métabolique de la levure dont les systèmes de transition entre un mode oxydatif ou fermentaire. Aucun modèle basé sur l'analyse de flux métabolique (MFA) et pertinent pour aider à la compréhension des phénomènes n'est disponible pour la souche d'intérêt ; seuls des modèles stœchiométriques visant à décrire la croissance et la production d'éthanol à partir de substrats mixtes sont proposés.

Aussi, la première partie du travail a consisté en la construction d'un modèle stœchiométrique adapté au réseau métabolique de *C.shehatae*. Sur la base de modèles (compartimentés ou non) développés précédemment dans l'Equipe et des connaissances recensées dans la littérature, des modifications spécifiques ont été apportées pour décrire le métabolisme de la levure *C.shehatae*. Ces implémentations concernent (1) la voie d'entrée du xylose dans le métabolisme central, (2) la description des voies de biosynthèse de biomasse et (3) les réactions de transport liées à la compartimentation cellulaire (échange de cofacteurs entre le cytosol et la mitochondrie). Ce système de transport des cofacteurs a été décrit par deux navettes appelées navette éthanol-acétaldéhyde et navette malate-aspartate, localisées en deux lieux distincts du métabolisme (en aval du nœud pyruvate vers la production d'éthanol pour la première et au niveau du Cycle de Krebs pour la seconde). Cette particularité donne lieu à deux modèles distincts. Par ailleurs, un coefficient symbolique noté *coeffnadh* a été intégré aux modèles pour décrire la voie de réduction du xylose en xylulose via la xylose réductase qui, d'après la littérature, fonctionnent ou peut fonctionner avec les deux types de cofacteurs que sont le NADH et le NADPH. Les deux modèles métaboliques ainsi développés ont été validés par comparaison entre les vitesses extracellulaires calculées par ces modèles et celles obtenues expérimentalement lors de cultures dédiées de la souche.

L'utilisation d'un modèle métabolique couplée à des expérimentations en bioréacteur a permis ensuite de contribuer à formuler des réponses aux questions suivantes :

- Quels effets les flux de substrats xylose et oxygène ont-ils sur l'orientation du métabolisme et la distribution des flux de carbone ?
- Comment les cofacteurs de la xylose réductase influencent-ils l'organisation du métabolisme cellulaire ?
- Est-il possible d'améliorer le rendement de conversion du xylose en éthanol par la gestion des flux de substrats ?

Question 1 : Effet des flux de substrats (xylose et oxygène) sur l'orientation du métabolisme et la distribution des flux de carbone

L'étude seule des cinétiques de consommation d'oxygène et de xylose n'a pas permis de montrer qu'il existait des valeurs seuil permettant de passer d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme oxydo-réductif. Par contre, les résultats ont montré que la souche ne semblait pas capable de recouvrer un métabolisme oxydatif après une bascule vers un métabolisme oxydo-réductif.

Les études théoriques et expérimentales ont révélé l'importance du rapport des vitesses de consommation d'oxygène et de xylose et du quotient respiratoire pour orienter le métabolisme.

Lors de la transition respiro-fermentaire, les flux dans la glycolyse entre le F6P et le pyruvate (r4 et r8) augmentent à cause de la diminution de F6P vers la voie oxydative des PP (r3 et r15). Ce phénomène induit une augmentation de la production de NADH cytosolique dans la glycolyse en amont du pyruvate (r8) qui ne peut être re-consommé que par la voie de production d'éthanol r10. La production d'éthanol augmente donc et le métabolisme bascule d'un mode oxydatif au mode oxydo-réductif. Ces résultats sont corroborés par l'analyse des flux dans la PDC (r12) qui augmentent également lors de la transition respiro-fermentaire. De plus, l'analyse des flux montre également une réorientation du carbone de l'acétaldéhyde déshydrogénase vers l'alcool déshydrogénase.

Le flux de xylose conditionne la production ou non de coproduits autre que l'éthanol. Ainsi il a été possible en limitant le flux de xylose de réduire les rendements en acide acétique, glycérol et xylitol.

## Question 2 : Influence des cofacteurs de la xylose réductase sur le métabolisme

La première enzyme impliquée dans la dégradation du xylose en xylulose, la XR, présente une dualité sur la dépendance aux cofacteurs NADH et NADPH qui a été traduite dans le modèle par le coefficient symbolique *coeffnadph*.

Il ressort de ces travaux que :

- Les cofacteurs impliqués dans la réduction du xylose ont un rôle majeur sur les rendements en biomasse en condition strictement oxydative. En effet, les rendements théoriques limite admissibles thermodynamiquement sont de  $0.716 \text{ Cmol}_{\text{biomasse}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  pour une XR strictement NADH dépendante et de  $0.680 \text{ Cmol}_{\text{biomasse}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  pour une XR strictement NADPH dépendante.
- L'augmentation de la demande en NADPH est directement couplée à l'augmentation du flux dans la partie oxydative des PP, permettant de régénérer le  $\text{NADP}^+$ , mais entraîne une décarboxylation au niveau de la 6-phosphogluconate déshydrogénase ce qui favorise la production de  $\text{CO}_2$  au détriment de la biomasse. Dans un second temps, l'augmentation de la maintenance cellulaire pour des valeurs de *coeffnadph* supérieures à 0.67 accroît l'impact du *coeffnadph* sur le rendement en biomasse qui diminue d'autant plus que le *coeffnadph* tend vers 1.
- En condition oxydo-réductive, le rendement théorique limite en éthanol est uniquement lié à la demande en oxygène nécessaire à l'équilibre du NADH. Cet équilibre est fonction des cofacteurs de la XR. La diminution du NADH et l'augmentation du NADPH produits dans le cytosol au niveau de la XR conduisent à une augmentation de l'activité au niveau de la chaîne respiratoire. Donc, plus la xylose réductase n'est NADH dépendante, plus les capacités de conversion du xylose en éthanol de la souche augmentent. Les rendements théoriques limites en éthanol thermodynamiquement admissibles sont de  $0.667 \text{ Cmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  pour une XR strictement NADH dépendante et de  $0.600 \text{ Cmol}_{\text{éthanol}} \cdot \text{Cmol}_{\text{xylose}}^{-1}$  pour une XR strictement NADPH dépendante.
- L'analyse de la bascule respiro-fermentaire a montré que les cofacteurs NADH et NADPH sont également impliqués au travers des modulations des flux de carbone dans

le métabolisme, notamment au niveau de la voie oxydative des PP (r15), la voie en amont du pyruvate (r8), l'acétaldéhyde déshydrogénase (r11), la navette de régénération du NADH cytosolique vers la mitochondrie liée notamment au fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Question 3 : est-il possible d'améliorer la conversion du xylose en éthanol par la gestion des flux de substrat ?

Les résultats issus des calculs à partir du modèle développé en condition théorique limite a permis de :

- Calculer l'ensemble des rendements théoriques limite admissibles d'un point de vue thermodynamique pour les productions de biomasse et d'éthanol.
- Le contrôle de la transition respiro-fermentaire peut passer par un contrôle du quotient respiratoire entre 1.03 et 1.13 en métabolisme purement oxydatif et au-delà de 1.15 pour un métabolisme oxydo-réductif.
- La stratégie de culture doit associer le contrôle du QR au contrôle du rendement oxygène/xylose dans un souci d'optimisation du rendement en éthanol. Le rendement oxygène/xylose doit être le plus faible possible pour privilégier la production d'éthanol vis-à-vis de la croissance. Dans un premier temps, l'étude théorique a permis de dégager une valeur optimale du rendement oxygène/xylose de  $0,33 \text{ molO}_2 \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ . Cette valeur optimale a pu être approchée ( $0.47 \text{ molO}_2 \cdot \text{mol}_{\text{xylose}}^{-1}$ ) en culture continue conduisant à un rendement expérimental en éthanol de  $0.51 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$ , soit 85 % du rendement théorique limite prédit par le modèle ( $0.59 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$  à la même valeur de  $Y_{\text{oxygène}/\text{xylose}}$ ).

Tous ces résultats confirment la pertinence d'une stratégie couplant une approche de modélisation métabolique à la réalisation d'expérience en conditions maîtrisées dans une démarche déductive pour la maîtrise du comportement microbien et des performances des bioréacteurs.

## Perspectives

---

Ces travaux argumentent de nombreuses perspectives :

Les travaux de modélisation métabolique ont permis de calculer les rendements théoriques limite en condition de croissance et de production d'éthanol. Par ailleurs, il a été possible de calculer les flux intracellulaires supposés sans accumulation de métabolites intracellulaires à partir de vitesses spécifiques expérimentales. Le modèle a toutefois montré des limites notamment en métabolisme anaérobie et devrait être modifié pour une utilisation en ce sens (pour la synthèse d'acide succinique par exemple). En fonction du degré de liberté du système, des contraintes ou des données supplémentaires devraient être fournies au modèle pour pouvoir l'utiliser en simulation vraie (par exemple pour la prédiction de conditions opératoires à appliquer pour une conduite optimale). Le rôle des coproduits (acide acétique, succinique, glycérol, xylitol) pourrait être étudié de façon plus approfondie notamment vis-à-vis des besoins en cofacteurs.

Le modèle métabolique pourrait être amélioré, en tenant compte de la dualité des cofacteurs pour d'autres enzymes que la xylose réductase. Grâce à une étude approfondie des activités enzymatiques, il serait envisageable d'affiner la description des flux intracellulaires, avec comme perspective la construction de mutants pour la XR et pourrait constituer une démarche complémentaire à ces travaux.

La stratégie d'optimisation du rendement par le contrôle des flux de xylose et d'oxygène, développée au cours de cette étude, pourrait être couplée à une stratégie d'optimisation des productivités et des titres en éthanol. Pour cela, sur la base de travaux antérieurs réalisés dans l'équipe FAME, il serait possible d'utiliser un procédé d'intensification de la production d'éthanol grâce à un bioréacteur bi-étagé à membrane avec recyclage cellulaire (Ben Chaabane, 2006; Chaabane *et al.*, 2006). La configuration permet le découplage spatial de la croissance (dans le premier étage) en condition de non limitation par l'oxygène dissous et de la production d'éthanol (dans le second étage) en condition de rendement en oxygène sur xylose

maitrisé. Ce bioprocédé permettrait peut être d'atteindre le rendement maximal en éthanol dans le second étage en imposant la valeur optimale de rendement en oxygène issue de ces travaux.

Le modèle métabolique développé sur *C.shehatae* pourrait être couplé avec un modèle cinétique prenant en compte les phénomènes d'inhibition par les substrats et/ou les produits sur les vitesses de réaction. Ces modèles hybrides cinétiques pourraient être intégrés dans le modèle de bilans matières du bioprocédé pour simuler le fonctionnement de celui-ci. L'intensification de la production d'éthanol via le bioprocédé décrit précédemment nécessiterait alors d'étudier le comportement de *Candida shehatae* en condition de haute concentration cellulaire, notamment vis-à-vis des phénomènes de transfert d'oxygène, la vitesse spécifique de consommation d'oxygène étant un paramètre déterminant pour la distribution des flux comme ces travaux l'ont montré.

Dans le cadre de l'optimisation du procédé, un aspect important soulevé dans la bibliographie n'a pas été exploitée au cours des ces travaux : l'augmentation de la tolérance à l'éthanol avec la diminution de la température. Le découpage spatial de la croissance et de la production d'éthanol peut alors être exploité pour imposer des conditions de températures différentes à chaque étage permettant l'augmentation de la tolérance à l'éthanol de *C.shehatae*.



## Références bibliographiques

---

**Ahmad, I., Shim, W. & Kim, J.-H. (2012).** Enhancement of xylitol production in glycerol kinase disrupted *Candida tropicalis* by co-expression of three genes involved in glycerol metabolic pathway. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1 - 6.

**Aldiguier, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J. L., Guillouet, S. E. & Molina-Jouve, C. (2004).** Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **26**, 217-222.

**Alexander, M. A., Chapman, T. W. & Jeffries, T. W. (1987).** Continuous ethanol production from D-xylose by *Candida shehatae*. *Biotechnology and Bioengineering* **30**, 685 - 691.

**Alexander, M. A., Chapman, T. W. & Jeffries, T. W. (1988a).** Xylose metabolism by *Candida shehatae* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **28**, 478 - 486.

**Alexander, M. A., Chapman, T. W. & Jeffries, T. W. (1988b).** Continuous xylose fermentation by *Candida shehatae* in a two-stage reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **17**, 221-229.

**Alexander, M. A., Yang, V. W. & Jeffries, T. W. (1988c).** Levels of pentose phosphate pathway enzymes from *Candida shehatae* grown in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**, 282 - 288.

**Alexander, M. A., Chapman, T. W. & Jeffries, T. W. (1989).** Continuous-culture responses of *Candida shehatae* to shifts in temperature and aeration: implications for ethanol inhibition. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 2152 - 2154.

**Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S. E., Uribelarrea, J. L., Goma, G. & Benbadis, L. (2002).** Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 67 - 72.

**Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J. L., Goma, G., Molina-Jouve, C. & Guillouet, S. E. (2004).** Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**, 537 - 542.

**Atzpodien, W., Gancedo, J. M., Duntze, W. & Holzer, H. (1968).** Isoenzymes of malate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **7**, 58 - 62.

**Beaven, M. J., Charpentier, C. & Rose, A. H. (1982).** Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Journal of General Microbiology* **128**, 1447 - 1455.

**Ben Chaabane, M. F. (2006).** Intensification de la production d'éthanol biocarburant dans un bioréacteur bi-étagé avec recyclage cellulaire: modélisation et stratégie de conduite.

**Beney, L. & Gervais, P. (2001).** Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**, 34 - 42.

**Bideaux, C. (2000).** Modélisation stoechiométrique des productions microbiennes par descripteur métabolique au moyen du calcul formel. Validation sur le modèle *Kluyveromyces marxianus*, pp. 353. Toulouse: Institut national des sciences appliquées de Toulouse.

**Bideaux, C., Alfenore, S., Cameleyre, X., Molina-Jouve, C., Uribelarrea, J.-L. & Guillouet, S. E. (2006).** Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 2134 - 2140.

**Bideaux, C., Goma, G., Uribelarrea, J.-L., Dahhou, B. & Roux, G. (2008).** Stoichiometric modelling approach for microbial cultures monitoring. *International Journal of Modelling, Identification and Control* **3**, 413 - 426.

**Bruinenberg, P. M., Bot, P. H. M., Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1983a).** The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **18**, 287 - 292.

**Bruinenberg, P. M., Van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1983b).** An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *Journal of General Microbiology* **129**, 965 - 971.

**Bruinenberg, P. M., Van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1983c).** A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *Journal of General Microbiology* **129**, 953 - 964.

**Bruinenberg, P. M., Bot, P. H. M., Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1984).** NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **19**, 256 - 260.

**Camarasa, C., Grivet, J.-P. & Dequin, S. (2003).** Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* **149**, 2669 - 2678.

**Camarasa, C., Faucet, V. & Dequin, S. (2007).** Role in anaerobiosis of the isoenzymes for *Saccharomyces cerevisiae* fumarate reductase encoded by OSM1 and FRDS1. *Yeast* **24**, 391-401.

**Carvalho, W., Santos, J. C., Canilha, L., Silva, S. S., Perego, P. & Converti, A. (2005).** Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: Metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. *Biochemical Engineering Journal* **25**, 25 - 31.

**Càssio, F. & Leão, C. (1993).** A comparative study on the transport of L-malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: evidence for a general organic acid permease. *Yeast* **9**, 743 - 752.

**Chaabane, F. B., Aldiguier, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Blanc, P., Bideaux, C., Guillouet, S. E., Roux, G. & Molina-Jouve, C. (2006).** Very high ethanol productivity in an innovative continuous two-stage bioreactor with cell recycle. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **29**, 49 - 57.

**Chapman, C. & Bartley, W. (1968).** The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. *Biochemical Journal* **107**, 455 - 465.

**Ciani, M. & Ferraro, L. (1996).** Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 128 - 132.

**Colombié, V. (2005).** Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel., pp. 174. Toulouse: Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

**Delgenes, J. P., Moletta, R. & Navarro, J. M. (1988).** Fermentation of D-xylose, D-glucose and L-rabinose mixture by *Pichia stipitis* Y 7124: sugar tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**, 155 - 161.

**Du Preez, J. C., Kock, J. L. F., Monteiro, A. M. T. & Prior, B. A. (1985).** The vitamin requirements of *Candida shehatae* for xylose fermentation. *FEMS Microbiology Letters* **28**, 271 - 275.

**Du Preez, J. C., Bosch, M. & Prior, B. A. (1986).** The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **23**, 228-233.

**Du Preez, J. C., Bosch, M. & Prior, B. A. (1987).** Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **25**, 521-525.

**Du Preez, J. C., Driessel, B. & Prior, B. A. (1989).** Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* and *Candida tenuis* on D-xylose. *Archives of Microbiology* **152**, 143 - 147.

**Du Preez, J. C. (1994).** Process parameters and environmental factors affecting xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 944 - 956.

**DuPreez, J. C. & van der Walt, J. P. (1983).** Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. *Biotechnology Letters* **5**, 357 - 362.

**DuPreez, J. C., Kock, J. L. F., Monteiro, A. M. T. & Prior, B. A. (1985).** The vitamin requirements of *Candida shehatae* for xylose fermentation. *FEMS Microbiology Letters* **28**, 271 - 275.

**DuPreez, J. C., Bosch, M. & Prior, B. A. (1986a).** Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme and Microbial Technology* **8**, 360 - 364.

**DuPreez, J. C., Bosch, M. & Prior, B. A. (1986b).** The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **23**, 228 - 233.

**DuPreez, J. C., Bosch, M. & Prior, B. A. (1987).** Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **25**, 521- 525.

**DuPreez, J. C., Van Driessel, B. & Prior, B. A. (1988).** The relation between redox potential and D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters* **10**, 901 - 906.

**DuPreez, J. C., Driessel, B. & Prior, B. A. (1989a).** Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**, 53 - 58.

**DuPreez, J. C., Van Driessel, B. & Prior, B. A. (1989b).** D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnology Letters* **11**, 131 - 138.

**DuPreez, J. C., Van Driessel, B. & Prior, B. A. (1989c).** Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**, 53 - 58.

**DuPreez, J. C., Meyer, P. S. & Kilian, S. G. (1991).** The effect of mixtures of acetic acid and D-xylose on the growth rate of *Candida blankii*. *Biotechnology Letters* **13**, 827 - 832.

**DuPreez, J. C. (1994).** Process parameters and environmental factors affecting xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 944 - 956.

**Egli, T. & Fiechter, A. (1981).** Theoretical analysis of media used in the growth of yeasts on methanol. *Journal of General Microbiology* **123**, 365-369.

**Evans, C. & Ratledge, C. (1984).** Induction of xylulose-5-phosphate phosphoketolase in a variety of yeasts grown on D-xylose: the key to efficient xylose metabolism. *Archives of Microbiology* **139**, 48 - 52.

- Fonseca, C., Spencer-Martins, I. & Hahn-Hägerdal, B. (2007).** L-arabinose metabolism in *Candida arabinofermentans* PYCC 5603T and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**, 303 - 310.
- Freese, S., Vogts, T., Speer, F., Schäer, B., Passoth, V. & Klinner, U. (2011).** C- and N-catabolic utilization of tricarboxylic acid cycle-related amino acids by *Scheffersomyces stipitis* and other yeasts. *Yeast* **28**, 375 - 390.
- Fromanger, R., Guillouet, S. E., Uribelarrea, J. L., Molina-Jouve, C. & Cameleyre, X. (2010).** Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **37**, 437 - 445.
- Furlan, S. A., Bouilloud, P. & Decastro, H. F. (1994).** Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochemistry* **29**, 657-662.
- Gárdonyi, M., Österberg, M., Rodrigues, C., Spencer-Martins, I. & Hahn-Hägerdal, B. (2003).** High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. *FEMS Yeast Research* **3**, 45 - 52.
- Girio, F. M., Peito, M. A. & Amaral-Collaco, M. T. (1989).** Enzymatic and physiological study of D-xylose metabolism by *Candida shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**, 199 - 204.
- Gnansounou, E. (2010).** Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: current situation and perspectives. *Bioresource Technology* **101**, 4842 - 4850.
- Gong, C.-s., Ladisch, M. & Tsao, G. (1981a).** Production of ethanol from wood hemicellulose hydrolyzates by a xylose-fermenting yeast mutant, *Candida* sp. XF 217. *Biotechnology Letters* **3**, 657 - 662.
- Gong, C.-s., McCracken, L. & Tsao, G. (1981b).** Direct fermentation of D-xylose to ethanol by a xylose-fermenting yeast mutant, *Candida* sp XF 217. *Biotechnology Letters* **3**, 245 - 250.
- Granström, T., Aristidou, A. A. & Leisola, M. (2002).** Metabolic Flux Analysis of *Candida tropicalis* growing on xylose in an oxygen-limited chemostat. *Metabolic Engineering* **4**, 248 - 256.
- Granström, T. & Leisola, M. (2002).** Controlled transient changes reveal differences in metabolite production in two *Candida* yeasts. *Applied Microbiology And Biotechnology* **58**, 511 - 516.
- Granström, T. B., Aristidou, A. A., Jokela, J. & Leisola, M. (2000).** Growth characteristics and metabolic flux analysis of *Candida milleri*. *Biotechnology and Bioengineering* **70**, 197 - 207.
- Gray, W. D. & Sova, C. (1969).** Effect of alcohol on yeast hexokinase. *Mycopathologia and Mycologia Applicata* **37**, 70 - 76.

**Guerrin, F., Delgenes, J. P. & Moletta, R. (1994).** Modeling the alcoholic fermentation of xylose by *Pichia stipitis* using a qualitative reasoning approach. *Bioprocess Engineering* **10**, 115 - 122.

**Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skogg, K. & Prior, B. A. (1994).** Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 933 - 943.

**Hallsworth, J. E. (1998).** Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **85**, 125 - 137.

**Hinfray, C., Jouenne, T., Mignot, L. & Junter, G. A. (1995).** Influence of the oxygenation level on D-xylose fermentation by free and agar-entrapped cultures of *Candida shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **42**, 682-687.

**Jeffries, T. (1983).** Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. In *Pentoses and Lignin*, pp. 1: Springer Berlin / Heidelberg.

**Jeffries, T. W. & Alexander, M. A. (1990).** Production of ethanol from xylose by *Candida shehatae* grown under continuous or fed-batch conditions. In *Biotechnology in pulp and paper manufacture: applications and fundamental investigations: proceedings of the Fourth International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, pp. 311-321. Boston: Butterworth-Heinemann.

**Jeffries, T. W. & Kurtzman, C. P. (1994).** Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 922 - 932.

**Jeffries, T. W. & Jin, Y.-S. (2000).** Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Advances in Applied Microbiology* **47**, 221- 268.

**Jones, R. P. (1989).** Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* **11**, 130 - 153.

**Kastner, J. R., Ahmad, M., Jones, W. J. & Roberts, R. S. (1992).** Viability of *Candida shehatae* in D-xylose fermentations with added ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* **40**, 1282 - 1285.

**Kastner, J. R., Jones, W. J. & Roberts, R. S. (1999).** Oxygen starvation induces cell death in *Candida shehatae* fermentations of d -xylose, but not D-glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 780 - 785.

**Kilian, S., Preez, J. & Gericke, M. (1989).** The effects of ethanol on growth rate and passive proton diffusion in yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**, 90 - 94.

**Kilian, S. G., Prior, B. A. & Du Preez, J. C. (1993).** The kinetics and regulation of D-xylose transport in *Candida utilis*. *World journal of Microbiology & Biotechnology* **9**, 357 - 360.

**Kuyper, M., Winkler, A. A., Van Dijken, J. P. & Pronk, J. T. (2004).** Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Research* **4**, 655 - 664.

**Laplace, J. M., Delgenes, J. P., Moletta, R. & Navarro, J. M. (1991a).** Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains - Process considerations in relation to ethanol tolerance. *Biotechnology Letters* **13**, 445 - 450.

**Laplace, J. M., Delgenes, J. P., Moletta, R. & Navarro, J. M. (1991b).** Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*: oxygen requirement as a key factor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 158 - 162.

**Lee, J. (1997).** Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* **56**, 1 - 24.

**Lee, W. J., Kim, M. D., Ryu, Y. W., Bisson, L. F. & Seo, J. H. (2002).** Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 186 - 191.

**Lidén, A. G. & Niklasson, C. (1992).** Fluorescence measurements under aerobic and anaerobic conditions on *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* and *Candida utilis* grown on D-xylose. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **7**, 219 - 224.

**Lieberthal, S., Oldfield, M. & Shanley, B. C. (1980).** Effect of ethanol and acetaldehyde on membrane-bound enzymes in rat brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **132**, 797 - 805.

**Ligthelm, M. E., Prior, B. A. & Preez, J. C. (1988a).** The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **28**, 63 - 68.

**Ligthelm, M. E., Prior, B. A., Preez, J. C. & Brandt, V. (1988b).** An investigation of D-<sup>13</sup>C xylose metabolism in *Pichia stipitis* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **28**, 293 - 296.

**Llaneras, F. & Pici, J. (2008).** Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **105**, 1 - 11.

**Lohmeier-Vogel, E., Skoog, K., Vogel, H. & Hahn-Hägerdal, B. (1989).** <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance study of the effect of azide on xylose fermentation by *Candida tropicalis*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1974 - 1980.

**Lucas, C. & van Uden, N. (1986).** Transport of hemicellulose monomers in the xylose fermenting yeast *Candida shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **23**, 491.

- Maleszka, R. & Schneider, H. (1982).** Fermentation of D-xylose, xylitol, and D-xylulose by yeasts. *Canadian journal of microbiology* **28**, 360 - 363.
- Maleszka, R., Wang, P. Y. & Schneider, H. (1982).** Yeasts that ferment D-cellobiose as well as D-xylose. *Biotechnology Letters* **4**, 133 - 136.
- McKinlay, J., Vieille, C. & Zeikus, J. G. (2007).** Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**, 727 - 740.
- Meyrial, V., Delgenes, J. P., Romieu, C., Moletta, R. & Gounot, A. M. (1995).** Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or on D-glucose. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 535 - 540.
- Monthéard, J., Garcier, S., Lombard, E., Cameleyre, X., Guillouet, S., Molina-Jouve, C. & Alfenore, S. (2012).** Assessment of *Candida shehatae* viability by flow cytometry and fluorescent probes. *Journal of Microbiological Methods* **91**, 8-13.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. & Ladisch, M. (2005).** Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology* **96**, 673 - 686.
- Nakamura, Y., Sawada, T. & Inoue, E. (2001).** Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **76**, 586 - 592.
- Nakayama, S., Morita, T., Negishi, H., Ikegami, T., Sakaki, K. & Kitamoto, D. (2008).** *Candida krusei* produces ethanol without production of succinic acid; a potential advantage for ethanol recovery by pervaporation membrane separation. *FEMS Yeast Research* **8**, 706 - 714.
- Nigam, P. & Singh, D. (1995).** Processes of fermentative production of xylitol: a sugar substitute. *Process Biochemistry* **30**, 117 - 124.
- Novak, M., Strehaiano, P., Moreno, M. & Goma, G. (1981).** Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* **23**, 201 - 211.
- Pagliardini, J. (2010).** Optimisation du rendement de production de bioéthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* par minimisation de la synthèse du glycérol: Approche intégrée de génie métabolique et microbiologique, pp. 235. Toulouse: Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Pagliardini, J., Hubmann, G., Alfenore, S., Nevoigt, E., Bideaux, C. & Guillouet, S. E. (2013).** The metabolic costs of improving ethanol yield by reducing glycerol formation capacity under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial cell factories* **12**, 29.
- Palnitkar, S. & Lachke, A. (1992).** Effect of nitrogen sources on oxidoreductive enzymes and ethanol production during D-xylose fermentation by *Candida shehatae*. *Canadian Journal of Microbiology* **38**, 258 - 260.

**Passoth, V., Zimmermann, M. & Klinner, U. (1996).** Peculiarities of the regulation of fermentation and respiration in the crabtree-negative, xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57-8**, 201- 212.

**Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. & Schnurer, J. (2006).** Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research* **6**, 3 - 13.

**Pronk, J. T., Steensma, H. Y. & Van Dijken, J. P. (1996).** Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 1607 - 1633.

**Rivas, B., Torre, P., Domínguez, J. M. & Converti, A. (2009).** Maintenance and growth requirements in the metabolism of *Debaryomyces hansenii* performing xylose-to-xylitol bioconversion in corncob hemicellulose hydrolyzate. *Biotechnology and Bioengineering* **102**, 1062 - 1073.

**Rizzi, M., Klein, C., Schulze, C., Bui-Thanh, N.-A. & Dellweg, H. (1989).** Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modeling oxygen-limited growth and fermentation of yeast *Pichia stipitis* with xylose as carbon source. *Biotechnology and Bioengineering* **34**, 509 - 514.

**Roels, J. A. (1983).** *Energetics and kinetics in biotechnology*: Elsevier Biomedical Press Amsterdam.

**Sánchez, S., Bravo, V., Castro, E., Moya, A. J. & Camacho, F. (1997).** The influence of pH and aeration rate on the fermentation of xylose by *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology* **21**, 355 - 360.

**Santos, J. C., Carvalho, W., Silva, S. S. & Converti, A. (2003).** Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in fluidized bed reactor. Effect of air flowrate. *Biotechnology Progress* **19**, 1210 - 1215.

**Scheffers, W. A. (1966).** Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. *Nature* **210**, 533 - 534.

**Senac, T. & Hahn-Hägerdal, B. (1990).** Intermediary metabolite concentrations in xylulose- and glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 120 - 126.

**Silva, S. S. & Afschar, A. S. (1994).** Microbial production of xylitol from D-xylose using *Candida tropicalis*. *Bioprocess Engineering* **11**, 129 - 134.

**Singh, A. & Mishra, P. (1995).** *Microbial pentose utilization: current applications in biotechnology*: Elsevier Science.

**Skoog, K., Hahn-Hägerdal, B., Degn, H., Jacobsen, J. P. & Jacobsen, H. S. (1992).** Ethanol reassimilation and ethanol tolerance in *Pichia stipitis* CBS 6054 as studied by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2552 - 2558.

- Slininger, P., Dien, B., Gorsich, S. & Liu, Z. (2006).** Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 1285 - 1296.
- Slininger, P. J., Bothast, R. J., Okos, M. R. & Ladisch, M. R. (1985).** Comparative evaluation of ethanol production by xylose fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnology Letters* **7**, 431- 436.
- Slininger, P. J., Bolen, P. L. & Kurtzman, C. P. (1987).** *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from xylose. *Enzyme and Microbial Technology* **9**, 5 - 15.
- Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. & Nielsen, J. (1998).** *Metabolic engineering: principles and methodologies*: Academic Press.
- Stouthamer, A. H. & Verduyn, C. (1992).** Physiology of yeasts in relation to biomass yields. In *Quantitative Aspects of Growth and Metabolism of Microorganisms*, pp. 325 - 353: Springer Netherlands.
- Suihko, M. L. & Dražić, M. (1983).** Pentose fermentation by yeasts. *Biotechnology Letters* **5**, 107 - 112.
- Toivola, A., Yarrow, D., Van Den Bosch, E., Van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1984).** Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Applied Environmental Microbiology* **47**, 1221-1223.
- Tolnai, S. (1975).** A method for viable cell count. *TCA manual / Tissue Culture Association* **1**, 37-38.
- Tylicki, A., Ziolkowska, G., Bolkun, A., Siemieniuk, M., Czerniecki, J. & Nowakiewicz, A. (2008).** Comparative study of the activity and kinetic properties of malate dehydrogenase and pyruvate decarboxylase from *Candida albicans*, *Malassezia pachydermatis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology* **54**, 734 - 741.
- Unrean, P. & Nguyen, N. A. (2012).** Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**, 1387 - 1398.
- Valachovic, M., Hronska, L. & Hapala, I. (2001).** Anaerobiosis induces complex changes in sterol esterification pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **197**, 41 - 45.
- Van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1986).** Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **32**, 199 - 224.

- Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W. A. & Van Dijken, J. P. (1989a).** Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Journal of General Microbiology* **135**, 2399 - 2406.
- Van Urk, H., Schipper, D., Breedveld, G. J., Mak, P. R., Scheffers, W. A. & van Dijken, J. P. (1989b).** Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Biochimica and Biophysica Acta* **992**, 78 - 86.
- Van Urk, H., Voll, W. S. L., Scheffers, W. A. & Van Dijken, J. P. (1990).** Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 281 - 287.
- Vanrolleghem, P. A. & Heijnen, J. J. (1998).** A structured approach for selection among candidate metabolic network models and estimation of unknown stoichiometric coefficients. *Biotechnology and Bioengineering* **58**, 133 - 138.
- Varma, A. & Palsson, B. O. (1994a).** Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Biotechnology* **12**, 995 - 998.
- Varma, A. & Palsson, B. O. (1994b).** Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3724 - 3731.
- Verduyn, C., Van Kleef, R., Frank, J., Schreuder, H., Van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1985).** Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochemical Journal* **226**, 669 - 677.
- Verduyn, C., Stouthamer, A. H., Scheffers, W. A. & Van Dijken, J. P. (1991).** A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* **59**, 49 - 63.
- Weusthuis, R. A., Visser, W., Pronk, J. T., Scheffers, W. A. & van Dijken, J. P. (1994).** Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiology* **140**, 703 - 715.
- Xia, Y. K., Yu, X. Z. & Tsao, G. T. (1995).** Identification of required nutrient components of yeast nitrogen base for *Candida shehatae* ATTC 22984 fermenting xylose to ethanol. *Biotechnology Letters* **17**, 161-166.
- Yablochkova, E. N., Bolotnikova, O. I., Mikhailova, N. P., Nemova, N. N. & Ginak, A. I. (2003).** The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. *Microbiology* **72**, 414 - 417.
- Yablochkova, E. N., Bolotnikova, O. I., Mikhailova, N. P., Nemova, N. N. & Ginak, A. I. (2004).** The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the fermentation medium. *Microbiology* **73**, 129 - 133.



## Annexe

---

PO	1.33	coeffstepg	0.002905
n	0.0002	coeffpaltag	0.003
nb	0.000001	coeffstetag	0.0084
coeffala	0.0007607	coeffdpg	0.077957
coeffarg	0.0004412	coeffpa	0.104839
coeffasn	0.0003729	coeffpc	0.263441
coeffasp	0.0003729	coeffpe	0.209677
coeffcys	0.0000141	coeffpi	0.16129
coeffglum	0.0006272	coeffps	0.115591
coeffglut	0.0006272	coeffpg	0.067204
coeffgly	0.000566	coeffpl	0.532
coeffhis	0.0001413	coeffse	0.142
coeffileu	0.0003533	coefftag	0.326
coeffleu	0.0005605	coeffatp	0.0008
coefflys	0.0005448	coeffgtp	0.0008944
coeffmet	0.0000573	coeffutp	0.0007616
coeffphe	0.000252	coeffctp	0.0006833
coeffpro	0.0003124	coeffdatp	0.0009176
coeffser	0.0005189	coeffdgtp	0.0007011
coeffthr	0.0004592	coeffdctp	0.0007577
coefftry	0.0001083	coeffdttp	0.0009175
coefftyr	0.0001711	qttprotein	0.5308
coeffval	0.0004961	qttpolysacch	0.3461
coeffers	0.0014	qttlipids	0.0425
coeffsqs	0.000191	qtrna	0.0778
coefflas	0.000406	qttdna	0.0028
coeffobs	0.000433	coeffnadph	0.67
coeffchitin	0	coeffpalpe	0.000858
coeffglucan	0.41825	coeffpalpi	0.000815
coeffglycogen	0.1568	coeffpalps	0.000815
coeffmannan	0.41825	coeffpalpg	0.001209
coefftre	0.0074	coeffstedpg	0.00245
coeffpaldpg	0.00163	coeffstepa	0.00245
coeffpalpa	0.00163	coeffstepc	0.001768
coeffpalpc	0.002262	coeffstepe	0.003284
coeffsteps	0.001225	coeffstepi	0.001225

1 xylose + coeffnadph \* nadph + (1 - coeffnadph) \* nadh + h = xylitol + coeffnadph \* nadp + (1 - coeffnadph) \* nad  
2 xylitol + nad + atp = xylup + nadh + h + adp  
3 glcp = frup  
4 frup + atp = gap + dhap + adp  
5 dhap = gap  
6 gap + nad + adp + p = pg + atp + nadh + h  
7 pg = pep + eau  
8 pep + adp = pyr + atp  
9 2 \* atp + eau + acetat + coa = 2 \* adp + 2 \* p + accoa  
10 acd + nadh + h = etoh + nad  
11 acd + nad + eau = acetat + nadh + h  
12 pyr = acd + co  
13 dhap + nadh + h = g3p + nad  
14 g3p + eau = glyc + p  
15 glcp + 2 \* nadp + eau = ribup + 2 \* nadph + 2 \* h + co  
16 ribup = xylup  
17 ribup = ribop  
18 ribop + xylup = eryp + frup  
19 eryp + xylup = gap + frup  
20 akg + nh + nadph = glut + eau + nadp  
21 glut + atp + nh = glum + adp + p + h  
22 pyr + glut = ala + akg  
23 oac + glut = asp + akg  
24 asp + glum + 2 \* atp + 2 \* eau = asn + glut + 2 \* p + 2 \* adp  
25 ser + so + 3 \* atp + 4 \* nadph + 6 \* h + accoa = cys + eau + 3 \* adp + 3 \* p + 4 \* nadp + acetat + coa  
26 ser + nadp + nad + adp + p = gly + co + nadph + nadh + atp + 2 \* h  
27 thr + pyr + glut + nadph + 2 \* h = ileu + akg + co + eau + nh + nadp  
28 2 \* glut + accoa + 2 \* nad + 2 \* nadph = lys + akg + coa + co + 2 \* nadh + 2 \* nadp  
29 asp + accoa + so + co + 5 \* atp + 8 \* nadph + nadh + 11 \* h = met + acetat + coa + 2 \* eau + 5 \* adp + 5 \* p + 8 \* nadp + nad

30 cho + glut = phe + akg + co + eau  
31 pg + glut + eau + nad = ser + akg + p + nadh + h  
32 asp + eau + 2 \* atp + nadph + nadh + 2 \* h = thr + 2 \* adp + 2 \* p + nadp + nad  
33 cho + glut + nad = tyr + akg + co + nadh + h  
34 cho + glum + ser + prpp = try + pyr + glut + gap + co + 2 \* p + eau  
35 prpp + glum + co + nh + 3 \* eau + 3 \* atp + nad = his + akg + 3 \* adp + 6 \* p + nadh + 2 \* h  
36 ribop+ 2 \* atp = prpp + 2 \* adp  
37 eryp + 2 \* pep + nadph + atp + h = cho + nadp + adp + 4 \* p  
38 co + glum + 2 \* eau + 2 \* atp = carp + glut + 2 \* adp + p  
39 prpp + 2 \* glum + gly + asp + 3 \* co + 2 \* eau + 6 \* atp + 2 \* nadh + 2 \* h = imp + 2 \* glut + fum + 6 \*  
adp + 8 \* p + 2 \* nad  
40 imp + asp + gtp = fum + gdp + adp + eau  
41 imp + glum + 3 \* eau + 3 \* atp + nad = gdp + glut + 3 \* adp + 2 \* p + nadh + h  
42 atp + nadph + h = datp + eau + nadp  
43 gdp + atp + nadph + h = dgtp + adp + eau + nadp  
44 carp + asp + prpp + 1/2 \* o + atp = udp + co + eau + adp + 3 \* p  
45 utp + atp = utp + adp  
46 utp + atp + nh = ctp + adp + p + h  
47 ctp + nadph + h = dctp + eau + nadp  
48 udp + co + 4 \* atp + 3 \* nadph + nadh + 4 \* h = dttp + 4 \* adp + 3 \* p + 3 \* nadp + nad  
49 glcp + utp + eau = udpg + 2 \* p  
50 udpg + glcp + eau = tre + udp + p  
51 frup + gdp = gdpmannose + p  
52 frup + glum + accoa + eau + utp = udpacetylglucosamine + glut + coa + 2 \* p  
53 8 \* accoa + 14 \* nadph + 7 \* atp + eau + 14 \* h = palmitate + 8 \* coa + 14 \* nadp + 7 \* adp + 7 \* p  
54 9 \* accoa + 15 \* nadph + 8 \* atp + eau + 15 \* h = oleate + 9 \* coa + 15 \* nadp + 8 \* adp + 8 \* p  
55 18 \* accoa + 12 \* eau + 13 \* nadph + 18 \* atp + 13 \* h = squalene + 18 \* coa + 13 \* nadp + 18 \* adp + 18 \*  
p + 6 \* co  
56 squalene + nadph + h + o = lanosterol + nadp + eau  
57 squalene + nadph + h + o = obutusifoliol + nadp + eau  
58 lanosterol + 2 \* o + 3 \* nadp = ergosterol + 2 \* co + 3 \* nadph + 3 \* h

59 pextra + 3 \* hextra = p + 3 \* h  
60 nhextra + hextra = nh + h  
61 soextra + 2 \* hextra = so + 2 \* h  
62 h = hextra  
63 atp + eau = adp + p  
64 pyr + atp + co + eau = oac + adp + p  
65 glut = glutmi  
66 argmi = arg  
67 leumi = leu  
68 promi = pro  
69 valmi = val  
70 carp = carpmi  
71 asp = aspmi  
72 oac = oacmi  
73 akg = akgmi  
74 pyr = pyrmi  
75 sucmi = suc  
76 fum = fummi  
77 citmi = cit  
78 cit + nadp = akg + nadph + h + co  
79 etoh + nadmi = acd + nadhmi + hmi  
80 comi = co  
81 eaumi = eau  
82 atpmi = atp  
83 adpmi = adp  
84 pmi = p  
85 o = omi  
86 gtpmi = gtp  
87 gdp = gdpmi  
88 pyrmi + coami + nadmi = accoami + comi + nadhmi + hmi

89  $\text{accoami} + \text{oacmi} + \text{eaumi} = \text{citmi} + \text{coami}$   
90  $\text{citmi} + \text{nadpmi} = \text{akgmi} + \text{nadphmi} + \text{hmi} + \text{comi}$   
91  $\text{akgmi} + \text{coami} + \text{nadmi} = \text{succoami} + \text{comi} + \text{nadhmi} + \text{hmi}$   
92  $\text{succoami} + \text{gdpmi} + \text{pmi} = \text{sucmi} + \text{gtpmi} + \text{coami}$   
93  $\text{sucmi} + \text{fadmi} = \text{fummi} + \text{fadhmi}$   
94  $\text{fummi} + \text{eaumi} = \text{malmi}$   
95  $\text{malmi} + \text{nadmi} = \text{oacmi} + \text{nadhmi} + \text{hmi}$   
96  $\text{gdpmi} + \text{atpmi} = \text{gtpmi} + \text{adpmi}$   
97  $\text{nadhmi} + 1/2 * \text{omi} + \text{PO} * \text{adpmi} + \text{PO} * \text{pmi} + \text{hmi} = \text{PO} * \text{atpmi} + \text{nadmi} + (1+\text{PO}) * \text{eaumi}$   
98  $\text{fadhmi} + 1/2 * \text{omi} + \text{PO} * \text{adpmi} + \text{PO} * \text{pmi} = \text{PO} * \text{atpmi} + \text{fadmi} + (1+\text{PO}) * \text{eaumi}$   
99  $2 * \text{glutmi} + \text{carpmi} + \text{aspmi} + \text{eaumi} + 3 * \text{atpmi} + \text{nadphmi} + \text{hmi} = \text{argmi} + \text{fummi} + \text{akgmi} + 3 * \text{adpmi} + \text{nadpmi} + 4 * \text{pmi}$   
100  $2 * \text{pyrmi} + \text{glutmi} + \text{accoami} + \text{nadmi} + \text{nadphmi} = \text{leumi} + \text{akgmi} + \text{coami} + 2 * \text{comi} + \text{nadhmi} + \text{nadpmi}$   
101  $\text{glutmi} + \text{atpmi} + \text{nadhmi} + \text{nadphmi} + 2 * \text{hmi} = \text{promi} + \text{eaumi} + \text{adpmi} + \text{pmi} + \text{nadpmi} + \text{nadmi}$   
102  $2 * \text{pyrmi} + \text{glutmi} + \text{nadphmi} + \text{hmi} = \text{valmi} + \text{akgmi} + \text{comi} + \text{eaumi} + \text{nadpmi}$   
103  $\text{coeffglut} * \text{glut} + \text{coeffglum} * \text{glum} + \text{coeffpro} * \text{pro} + \text{coeffarg} * \text{arg} + \text{coefflys} * \text{lys} + \text{coeffser} * \text{ser} + \text{coeffgly} * \text{gly} + \text{coeffcys} * \text{cys} + \text{coeffasp} * \text{asp} + \text{coeffasn} * \text{asn} + \text{coeffthr} * \text{thr} + \text{coeffmet} * \text{met} + \text{coeffileu} * \text{ileu} + \text{coeffala} * \text{ala} + \text{coeffval} * \text{val} + \text{coeffleu} * \text{leu} + \text{coeffphe} * \text{phe} + \text{coefftyr} * \text{tyr} + \text{coefftry} * \text{try} + \text{coeffhis} * \text{his} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 2*n + 2*nb) * \text{atp} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 2*n + 2*nb) * \text{gtp} + (3*coeffglut + 3*coeffglum + 3*coeffpro + 3*coeffarg + 3*coefflys + 3*coeffser + 3*coeffgly + 3*coeffcys + 3*coeffasp + 3*coeffasn + 3*coeffthr + 3*coeffmet + 3*coeffileu + 3*coeffala + 3*coeffval + 3*coeffleu + 3*coeffphe + 3*coefftyr + 3*coefftry + 3*coeffhis + 3*n+4*nb) * \text{eau} = \text{protein} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 2*n + 2*nb) * \text{adp} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 2*n + 2*nb) * \text{gtp} + (3*coeffglut + 3*coeffglum + 3*coeffpro + 3*coeffarg + 3*coefflys + 3*coeffser + 3*coeffgly + 3*coeffcys + 3*coeffasp + 3*coeffasn + 3*coeffthr + 3*coeffmet + 3*coeffileu + 3*coeffala + 3*coeffval + 3*coeffleu + 3*coeffphe + 3*coefftyr + 3*coefftry + 3*coeffhis + 3*n+4*nb) * \text{eau}$

$(\text{coeffhis} + n + 2 * \text{nb}) * \text{gdp} + (4 * \text{coeffglut} + 4 * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} + 4 * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \text{coefftyr} + 4 * \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + 4 * n + 4 * \text{nb}) * \text{p}$

104  $\text{coeffatp} * \text{atp} + \text{coeffgtp} * \text{gtp} + \text{coeffutp} * \text{utp} + \text{coeffctp} * \text{ctp} + (\text{coeffatp} + \text{coeffgtp} + \text{coeffutp} + \text{coeffctp}) * \text{eau} = \text{rna} + (2 * \text{coeffatp} + 2 * \text{coeffgtp} + 2 * \text{coeffutp} + 2 * \text{coeffctp}) * \text{p}$

105  $\text{coeffdatp} * \text{datp} + \text{coeffdgtp} * \text{dgtp} + \text{coeffdctp} * \text{dctp} + \text{coeffdttp} * \text{dttp} + (\text{coeffdatp} + \text{coeffdgtp} + \text{coeffdctp} + \text{coeffdttp}) * \text{eau} = \text{dna} + (2 * \text{coeffdatp} + 2 * \text{coeffdgtp} + 2 * \text{coeffdctp} + 2 * \text{coeffdttp}) * \text{p}$

106  $(\text{coeffpalpa} / 2 + \text{coeffstepa} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpa} * \text{palmitate} + \text{coeffstepa} * \text{oleate} = \text{phosphatidate}$

107  $(\text{coeffpalpi} / 2 + \text{coeffstepi} / 2) * \text{glcp} + (\text{coeffpalpi} / 2 + \text{coeffstepi} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpi} * \text{palmitate} + \text{coeffstepi} * \text{oleate} + (\text{coeffpalpi} + \text{coeffstepi}) * \text{atp} = \text{phosphatidylinositol} + (\text{coeffpalpi} + \text{coeffstepi}) * \text{adp} + (\text{coeffpalpi} * 3/2 + \text{coeffstepi} * 3/2) * \text{p}$

108  $(\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalps} * \text{palmitate} + \text{coeffsteps} * \text{oleate} + (\text{coeffpalps} + \text{coeffsteps}) * \text{atp} = \text{phosphatidylserine} + (\text{coeffpalps} + \text{coeffsteps}) * \text{adp} + (\text{coeffpalps} + \text{coeffsteps}) * \text{p} + (\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{eau}$

109  $(\text{coeffpalpc} / 2 + \text{coeffstepc} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalpc} / 2 + \text{coeffstepc} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpc} * \text{palmitate} + \text{coeffstepc} * \text{oleate} + (\text{coeffpalpc} * 5/2 + \text{coeffstepc} * 5/2) * \text{atp} + (3 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 3) * \text{nadph} + (\text{coeffpalpc} * 3/2 + \text{coeffstepc} * 3/2) * \text{nadh} + (\text{coeffpalpc} * 9/2 + \text{coeffstepc} * 9/2) * \text{h} + (\text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc}) * \text{co} = \text{phosphatidylcholine} + (\text{coeffpalpc} * 5/2 + \text{coeffstepc} * 5/2) * \text{adp} + (\text{coeffpalpc} * 5/2 + \text{coeffstepc} * 5/2) * \text{p} + (3 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 3) * \text{nadp} + (\text{coeffpalpc} * 3/2 + \text{coeffstepc} * 3/2) * \text{nad} + (2 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 2) * \text{eau}$

110  $(\text{coeffpaldpg} * 3 / 4 + \text{coeffstedpg} * 3 / 4) * \text{glyc} + \text{coeffpaldpg} * \text{palmitate} + \text{coeffstedpg} * \text{oleate} + (\text{coeffpaldpg} * 11 / 4 + \text{coeffstedpg} * 11 / 4) * \text{atp} + (\text{coeffpaldpg} * 3 / 4 + \text{coeffstedpg} * 3 / 4) * \text{eau} = \text{diphosphatidylglycerol} + (\text{coeffpaldpg} * 11 / 4 + \text{coeffstedpg} * 11 / 4) * \text{adp} + (\text{coeffpaldpg} * 9 / 4 + \text{coeffstedpg} * 9 / 4) * \text{p} + (\text{coeffpaldpg} * 5 / 4 + \text{coeffstedpg} * 5 / 4) * \text{h}$

111  $(\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpe} * \text{palmitate} + \text{coeffstepe} * \text{oleate} + (\text{coeffpalpe} + \text{coeffstepe}) * \text{atp} = \text{phosphatidylethanolamine} + (\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{co} + (\text{coeffpalpe} + \text{coeffstepe}) * \text{adp} + (\text{coeffpalpe} + \text{coeffstepe}) * \text{p} + (\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{eau}$

112  $\text{coeffpa} * \text{phosphatidate} + \text{coeffpe} * \text{phosphatidylethanolamine} + \text{coeffps} * \text{phosphatidylserine} + \text{coeffpi} * \text{phosphatidylinositol} + \text{coeffdpg} * \text{diphosphatidylglycerol} + \text{coeffpc} * \text{phosphatidylcholine} = \text{phospholipids}$

113  $(\text{coeffpaltag} / 3 + \text{coeffstettag} / 3) * \text{g3p} + \text{coeffpaltag} * \text{palmitate} + \text{coeffstettag} * \text{oleate} = \text{tag} + (2 * \text{coeffpaltag} / 3 + 2 * \text{coeffstettag} / 3) * \text{eau} + (\text{coeffpaltag} / 3 + \text{coeffstettag} / 3) * \text{p}$

114  $\text{coeffflas} * \text{lanosterol} + \text{coeffobs} * \text{obutusifoliol} + \text{coeffers} * \text{ergosterol} + \text{coeffsqs} * \text{squalene} = \text{se}$

```
115 coefftag * tag + coeffpl * phospholipids + coeffse * se = lipids
116 (1 / 162) * udpg =(1/ 162) * udp + glycogen
117 (1 / 162) * udpg =(1/ 162) * udp + glucan
118 (1 / 203) * udpacetylglucosamine =(1/ 203) * udp + chitin
119 (1 / 162) * gdpmannose =(1/ 162) * gdp + mannan
120 coeffglycogen * glycogen + coeffchitin * chitin + coeffglucan * glucan + coeffmannan * mannan + (coefftre /
121 342) * tre = polysacch
121 qttlipids * lipids + qttpolysacch * polysacch + qttrna * rna + qttprotein * protein + qttdna * dna = bio
```

