



HAL
open science

Étude cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique : instabilité de la production de glutamate en procédé continu thermo-induit

Davin Uy

► **To cite this version:**

Davin Uy. Étude cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique : instabilité de la production de glutamate en procédé continu thermo-induit. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2003. Français. NNT : 2003INPL045N . tel-01749764

HAL Id: tel-01749764

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749764v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

M360351928

03INPLO45N

[CM] 2003 UY D.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique

Groupe Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

THESE

présentée à l'INPL par **Davin UY**

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Sujet :

**Etude cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* 2262
au cours de la fermentation glutamique : instabilité de la production
de glutamate en procédé continu thermo-induit**

Soutenue le 5 septembre 2003 devant la commission d'examen :

Rapporteurs : Gérard LEBLON, professeur à l'Université Paris-Sud
Jean-François CAVIN, professeur ENSBANA, DIJON

Examineur : Jean-Bernard GROS, professeur Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand
Jean-Marc ENGASSER, professeur ENSAIA, Nancy (co-directeur de thèse)
Pierre GERMAIN, professeur ENSAIA, Nancy (co-directeur de thèse)
Jean-Louis GOERGEN, professeur ENSAIA, Nancy (directeur de thèse)



REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur Hans-Günther LINTZ et Monsieur Michel SARDIN, Directeurs du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique et Monsieur Michel FICK, responsable du groupe Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires de m'avoir accueilli dans leurs locaux.

Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur Jean-Louis GOERGEN, professeur à l'ENSAIA, Monsieur Jean-Marc ENGASSER, professeur à l'ENSAIA et Monsieur Pierre GERMAIN, professeur à l'ENSAIA pour m'avoir suivi et encadré tout au long de ce travail.

J'exprime mes remerciements à Monsieur Gérard LEBLON, professeur à l'Université Paris-Sud et Monsieur Jean-François CAVIN, professeur à l'ENSBANA, DIJON d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs et Monsieur Jean-Bernard GROS, professeur à l'Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand, en tant que examinateur.

Je tiens à remercier Madame Mireille DONNER, Directrice de recherche à l'INSERM-CHU, Vandoeuvre et Monsieur Guy DUPORTAIL, Directeur de recherche à l'Université Louis Pasteur, Illkirch de m'avoir accueilli chaleureusement dans leurs locaux pour compléter ce travail.

Je remercie également Madame Annie MARC, Monsieur Ivan MARC, Monsieur Stéphane DELAUNAY, Madame Isabelle CHEVALOT, Monsieur Frantz FOURNIER, Monsieur Bernard PARISSET, Monsieur Fabrice BLANCHARD, Madame Evelyne-Ronat HEIT, Monsieur Emmanuel GUEDON, Monsieur Emmanuel RONDAGS, Madame Valérie GARCIA et Madame Sylvia L'HUILLIER pour leurs aides au cours de ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Dimitrios BOKAS et Monsieur Mohamed YOUNSI qui ont contribué à cette étude et en fin, je remercie chaleureusement leur aide et les discussions en tout genre : Ahmed HARIRI, Francois Le FLOCH, Véronique DEPARIS, Bérangère FARGES, Nadine KOCHANOWSKI ainsi que tous les amis du laboratoire pour leur soutien et l'ambiance chaleureuse qui a régné pendant ces années communes.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I.1. Fermentation glutamique	5
I.1.1. Historique et importance industrielle de la fermentation glutamique	5
I.1.1.1. Historique de la production de glutamate	5
I.1.1.2. Principaux producteurs de glutamate	5
I.1.1.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées pour la production de glutamate	5
I.1.1.4. Utilisations du glutamate	6
I.1.2. Procédés de production d'acide glutamique	6
I.1.2.1. Limitation en biotine.....	7
I.1.2.2. Ajout de pénicilline.....	8
I.1.2.3. Ajout de tensioactif.....	8
I.1.2.4. Choc de température	9
I.1.2.5. Limitation de la synthèse des acides gras ou phospholipides	9
I.1.2.6. Ajout d'anesthésique local.....	10
I.1.3. Paramètres importants de la fermentation glutamique	10
I.1.3.1. Température.....	10
I.1.3.2. pH.....	10
I.1.3.3. Oxygène	10
I.1.3.4. Composition du milieu	11
• Glycine bêtaïne	11
• Pression osmotique	11
• Chélateur de fer	11
I.1.4. Production de glutamate en fermentation continue	12

I.2. Métabolisme central des corynébactéries	13
I.2.1. Entrée des sucres	13
I.2.2. Glycolyse	14
I.2.3. Voies des pentoses phosphates	16
I.2.4. Voies anaplérotiques chez <i>C. glutamicum</i>	18
I.2.5. Complexe pyruvate déshydrogénase	22
I.2.6. Enzymes du cycle de Krebs	23
I.2.7. Voie de biosynthèse du glutamate	26
I.2.8. Respiration chez <i>C. glutamicum</i>	28
I.3. Modification de l'enveloppe cellulaire et excrétion de glutamate	30
I.3.1. Membrane de <i>C. glutamicum</i>	30
I.3.1.1. Structure de l'enveloppe cellulaire.....	30
• La couche des phospholipides.....	30
• La couche du peptidoglycane-arabinogalactane.....	30
• La couche des acides mycoliques.....	30
• La couche des polysaccharides.....	31
I.3.1.2. Synthèse de l'enveloppe cellulaire.....	32
• Acides gras.....	32
• Phospholipides.....	33
• Arabinogalactane-peptidoglycane.....	34
• Acides mycoliques.....	35
I.3.2. Excrétion des acides aminés chez <i>C. glutamicum</i>	36
I.3.2.1. Système d'export des acides aminés.....	36
• Excrétion de la lysine et des acides aminés basiques.....	37
• Excrétion d'isoleucine.....	38
• Excrétion de thréonine.....	38
• Excrétion d'acides aminés aromatiques.....	38
I.3.2.2. Excrétion de glutamate.....	39
• Effet de la concentration en glutamate intracellulaire sur l'excrétion de glutamate.....	39

• Effet de la force protomotrice sur l'excrétion de glutamate.....	39
• Energie cellulaire.....	41
• Composition de la membrane plasmique	41
• Réseau d'arabinogalactane-peptidoglycane	42
I.3.2.3. Fluidité membranaire	43
• Effet de l'environnement sur la fluidité membranaire et la régulation de la composition lipidique.....	43
• Rôle de la fluidité dans le transport des solutés	44
• Fluidité membranaire de <i>C. glutamicum</i>	45

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES 46

II.1. Caractéristiques de la souche *C. glutamicum* 2262 46

II.2. Conduite des fermentations..... 47

II.2.1. Milieu de culture 47

- Composition des milieux de culture..... 47
- Préparation du milieu de culture..... 48

II.2.2. Procédés de culture 48

- Conservation de la souche 48
- Précultures 48
- Culture en fermenteur..... 48

II.3. Mesure de la concentration en biomasse et en métabolites extracellulaires 49

II.3.1. Biomasse..... 49

II.3.2. Glutamate..... 50

II.3.3. Glucose et vitesse spécifique de consommation de glucose..... 50

II.3.4. Acides organiques extracellulaires et tréhalose..... 51

II.4. Mesure de la contenant en glutamate intracellulaire.....	51
• Dérivatisation	52
• Colonne	52
• Phases mobiles	52
• Détection	52
II.5. Dosage d'activités enzymatiques.....	53
II.5.1. Préparation des extraits bruts.....	53
II.5.2. Préparation des extraits dessalés	53
II.5.3. Dosage l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC)	54
II.5.4. Dosage l'activité de l'isocitrate déshydrogénase (ICDH)	55
II.5.5. Dosage l'activité de la glutamate déshydrogénase (GDH).....	55
II.5.6. Dosage de l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH).....	56
II.5.7. Dosage de l'activité de l'α-cétoglutarate déshydrogénase (ODHC).....	56
II.5.8. Dosage des protéines	57
II.6. Estimation de la capacité de respiration cellulaire par oxygraphie	57
II.7. Mesure de la taille cellulaire et du potentiel membranaire.....	58
II.7.1. Caractéristiques et fonctionnement de l'appareil	58
• Source lumineuse.....	58
• Bloc filtre.....	58
• Acquisition des signaux	59
• Liquide de gaine	59
• Débit de l'échantillon	59
• Calibration	59
II.7.2. Mesure de la taille cellulaire et de l'autofluorescence	59
II.7.3. Mesure du potentiel membranaire	59
II.8. Mesure de la fluidité membranaire	60

CHAPITRE III : ETUDE CINÉTIQUE DE *CORYNEBACTERIUM*

<i>GLUTAMICUM</i> 2262 EN CULTURE CONTINUE	63
III.1. Etude cinétique de <i>C. glutamicum</i> en procédé continu à 33°C	65
• Croissance cellulaire	65
• Consommation de glucose.....	65
• Excrétion de métabolites	69
• Accumulation du glutamate intracellulaire.....	69
• Potentiel membranaire.....	69
• Taille des cellules	69
III.2. Etude cinétique de <i>C. glutamicum</i> en procédé continu à 37°C	69
• Croissance cellulaire	73
• Consommation de glucose.....	73
• Excrétion de métabolites	73
• Accumulation du glutamate intracellulaire.....	73
• Potentiel membranaire.....	73
• Taille des cellules	74
III.3. Etude cinétique de <i>C. glutamicum</i> en procédé continu à 39°C	74
III.3.1. Etude cinétique de la culture continue de <i>C. glutamicum</i> à 39°C et un taux de dilution de 0,05 h⁻¹	74
• Croissance cellulaire.....	77
• Consommation de glucose.....	77
• Excrétion de glutamate	77
• Excrétion de lactate	78
• Excrétion de tréhalose.....	78
• Glutamate intracellulaire	78
• Potentiel membranaire	78

• Taille cellulaire	79
III.3.2. Interprétations des cinétiques de cultures continues de <i>C. glutamicum</i> à 39°C et à D = 0,05 h⁻¹	80
• Comportement dynamique de la concentration cellulaire	80
• Dynamique du comportement excréteur de glutamate à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h ⁻¹	81
III.3.3. Culture en discontinu des cellules sélectionnées en fin de la culture continue à 39°C	83
III.3.4. Culture en continu aux températures de 39°C et 41°C à D = 0,05 h⁻¹ des cellules sélectionnées en fin de la culture continue à 39°C à D = 0,05 h⁻¹	85
• Croissance cellulaire	85
• Consommation de glucose	85
• Excrétion de glutamate, du lactate et du tréhalose	87
• Glutamate intracellulaire	88
III.4. Comparaison des cinétiques de <i>C. glutamicum</i> productrices de glutamate en cultures continue et semi-continue à 39°C	88
• Croissance cellulaire	89
• Consommation de glucose	89
• Excrétion de glutamate	89
• Excrétion de lactate	92
• Excrétion du tréhalose	93
• Glutamate intracellulaire	93
• Potentiel membranaire	93
III.5. Conclusion sur l'apport des cultures continues à la connaissance des caractéristiques cinétiques de <i>C. glutamicum</i> 2262 thermo-inductible	94
• Croissance cellulaire	94
• Consommation de glucose	95

• Effet de l'oléate sur la croissance et la production de glutamate à 39°C.....	135
• Effet du palmitate sur la croissance et la production de glutamate à 33°C.....	136
• Effet du palmitate sur la croissance et la production de glutamate à 39°C.....	137
IV.1.2. En culture semi-continue : comparaison du procédé de production de glutamate en présence et absence de palmitate	138
• Croissance.....	138
• Consommation de glucose.....	138
• Production de glutamate.....	139
V.1.3. Discussion.....	141
• Effet de l'oléate et du palmitate sur la croissance de <i>C. glutamicum</i> 2262.....	141
• Effet de l'oléate et du palmitate sur la production de glutamate par <i>C. glutamicum</i> 2262	143
V.2. Etude de la fluidité de l'enveloppe de <i>C. glutamicum</i> 2262 producteur de glutamate.....	145
Article : étude de la fluidité de l'enveloppe cellulaire de <i>C. glutamicum</i> 2262 au cours de la fermentation glutamique	146
V.3. Discussion.....	161
CONCLUSION GENERALE.....	164
PERSPECTIVES.....	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	172
ANNEXES.....	191
• Annexe I : Cinétique de fermentation continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h ⁻¹	191

- Annexe II : Etude de la production de glutamate par *C. glutamicum* 2262 en fermentation continue..... 195
- Annexe III : Etude de l'activité α -cétoglutarate déshydrogénase de *C. glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique 211

• Excrétion de glutamate.....	96
• Excrétion de lactate.....	97
• Excrétion de tréhalose.....	99
• Glutamate intracellulaire.....	99
• Potentiel membranaire.....	101
• Taille cellulaire.....	102

CHAPITRE IV : CARACTERISATION METABOLIQUE DE

CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM 2262 EN CULTURE A DIFFERENTES

TEMPERATURES.....	104
-------------------	-----

IV.1. Mise au point de dosages d'activités enzymatiques.....	105
--	-----

IV.1.1. Activité α -cétoglutarate déshydrogénase (ODHC).....	105
---	-----

IV.1.2. Activité pyruvate déshydrogénase (PDH).....	107
---	-----

IV.2. Caractérisation métabolique de <i>C. glutamicum 2262</i> en culture continue à différentes températures.....	110
--	-----

IV.2.1. Culture continue à 33°C de <i>C. glutamicum 2262</i>	110
--	-----

• Activité PEPC.....	110
----------------------	-----

• Activité PDH.....	112
---------------------	-----

• Activités ICDH et GDH.....	112
------------------------------	-----

• Activité ODHC.....	112
----------------------	-----

IV.2.2. Culture continue de <i>C. glutamicum 2262</i> à 39°C.....	112
---	-----

• Activité PEPC.....	112
----------------------	-----

• Activité PDH.....	113
---------------------	-----

• Activité ICDH et GDH.....	113
-----------------------------	-----

• Activité ODHC.....	113
----------------------	-----

• Vitesse spécifique de respiration.....	115
--	-----

IV.2.3. Culture continue à 39 et 41°C des cellules sélectionnées.....	115
---	-----

• Activité PEPC.....	115
----------------------	-----

• Activité PDH	115
• Activité ICDH et GDH	117
• Activité ODHC	117
IV.2.4. Discussion	117
• Modification du continu enzymatique de <i>C. glutamicum</i> 2262	117
• Relation entre le niveau des enzymes et le métabolisme de <i>C. glutamicum</i> 2262	119
IV.3. Relation entre le contenu en glutamate intracellulaire et l'expressions de la PEPC, de la PDH et de la ODHC de <i>C. glutamicum</i> 2262	121
IV.3.1. Culture discontinue de <i>C. glutamicum</i> 2262 à 39°C sur glucose	122
• Principales cinétiques	122
• Activité PEPC	122
• Activité PDH	122
• Activités ICDH et GDH	123
• Activité ODHC	125
IV.3.2. Culture discontinue à 33°C sur glutamate	125
IV.3.3. Discussion	126
• Activité PEPC	127
• Activité PDH	127
• Activité ODHC	128
IV.4. Discussion	130

CHAPITRE V : ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA PAROI DE *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* 2262 PENDANT LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE GLUTAMATE..... 133

V.1. Etude de l'effet des acides gras sur la croissance et la production de glutamate	134
V.1.1. En culture discontinue	134
• Effet de l'oléate sur la croissance et la production de glutamate à 33°C	134

ABREVIATIONS

Molécules

AMP, ADP, ATP	: adénine monophosphate, adénine diphosphate, adénine triphosphate
APADH	: 3-acétylpyridine adénine dinucléotide (forme réduite)
CoA	: coenzyme A
DPH	: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
DTT	: dithiothreitol
FADH	: flavine adénine dinucléotide (forme oxydée)
F-1,6-BP	: fructose-1,6-biphosphate
GDP-GTP	: guanosine diphosphate-guanosine triphosphate
Glu	: glutamate
IDP-ITP	: inosine diphosphate-inosine diphosphate
INT-formazan	: iodonitrotetrazolium-formazan
NAD(P)H	: nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (forme réduite)
PEP	: phosphoénol pyruvate
Pi	: phosphate inorganique
PYR	: pyruvate
TMA-DPH	: 1-(4-(triméthylammonium)-phenyl)-6-phenylhexa-1,3,5-triene
TPP	: thiamine pyrophosphate

Enzymes

EM	: enzyme malique
FAS	: fatty acid synthase
GDH	: glutamate déshydrogénase
ICDH	: isocitrate déshydrogénase
MDH	: malate déshydrogénase
ODHC	: α -cétoglutarate déshydrogénase
PC	: pyruvate carboxylase
PDH	: pyruvate déshydrogénase
PEPC	: phosphoénolpyruvate carboxylase

PYRC : pyruvate carboxylase

Cytométrie en flux

ΔP : force protomotrice

$\Delta\psi$: potentiel membranaire

UF : unité de fluorescence

UA : unité arbitraire

Autres

alr : gène codant pour la D-alanine racémase

ATCC : American Type Culture Collection

BSA : bovine serum albumin

D : taux de dilution

DO : densité optique

Ki : constante d'inhibition

Km : constante de Monod

MCGC : milieu minimal de *Corynebacterium glutamicum* enrichi en citrate

PS : poids sec

r_0 : anisotropie fondamentale

r : anisotropie

R : constante des gaz parfaits

ρ : temps de vie de la fluorescence

RI : réfraction indique

τ : temps de mouvement Brownien

UV : ultraviolet

X : biomasse

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le glutamate est utilisé depuis longtemps par les Asiatiques pour renforcer le goût des aliments. Depuis la découverte des Corynébactéries capables de produire du glutamate par Kinoshita et al. (1957), la production mondiale de glutamate a fortement augmenté pour atteindre aujourd'hui une production annuelle d'environ un million de tonnes. Cette production est réalisée par des sociétés asiatiques telles que Ajinomoto, Kyowa Hakko Kogyo et Cheil Sugar, en Europe par Orsan-Amylum et aux Etats Unis par Stauffer. Le glutamate est essentiellement utilisé dans le domaine alimentaire.

Pour produire efficacement du glutamate, il est nécessaire d'améliorer le procédé de production et/ou la souche productrice. Au cours des vingt dernières années les recherches menées ont permis d'améliorer la production pour arriver à ce jour à des titres en glutamate d'environ 100 g/l. Ces recherches, qui ont porté sur la génération de souches génétiquement modifiées par mutagenèse aléatoire, ont permis d'obtenir des souches adaptées au procédé utilisé et à l'utilisation de matières premières de faible coût telles que les mélasses de canne et de betterave. Plus récemment, une approche de type génie métabolique a été employée afin d'améliorer le rendement de conversion de substrat carboné en glutamate et la productivité des cellules. Cependant, cette approche nécessite l'identification des cibles potentiellement limitantes pour la production. D'où l'intérêt de caractériser la cinétique, la physiologie et le métabolisme des souches productrices de glutamate.

Une étude précédente (Lapujade, 2000) a été réalisée au Laboratoire sur la souche *Corynebacterium glutamicum* 2262 chez laquelle l'excrétion de glutamate est induite par une augmentation de la température du milieu de culture. Ce procédé présente des potentialités très intéressantes puisque des mélasses peu coûteuses peuvent être utilisées comme matière première, contrairement au procédé d'excrétion induit par une limitation en biotine. Par ailleurs, avec ce procédé la purification du produit final est plus simple que celle des procédés utilisant des tensioactifs ou des antibiotiques pour provoquer l'excrétion du glutamate. Les études cinétiques et physiologiques menées sur cette souche en cultures discontinues et semi-continues ont permis de caractériser les phases successives de croissance cellulaire et d'excrétion de glutamate.

L'objectif général de notre étude est de mieux comprendre le comportement cinétique, la physiologie et le métabolisme de *Corynebacterium glutamicum* 2262 pendant la croissance et la production de glutamate, en particulier pendant la transition entre les phases de croissance et d'excrétion. Nous tenterons également de comprendre les mécanismes physiologiques de la déviation de la production de glutamate vers la synthèse d'autres métabolites tels que le lactate et le tréhalose.

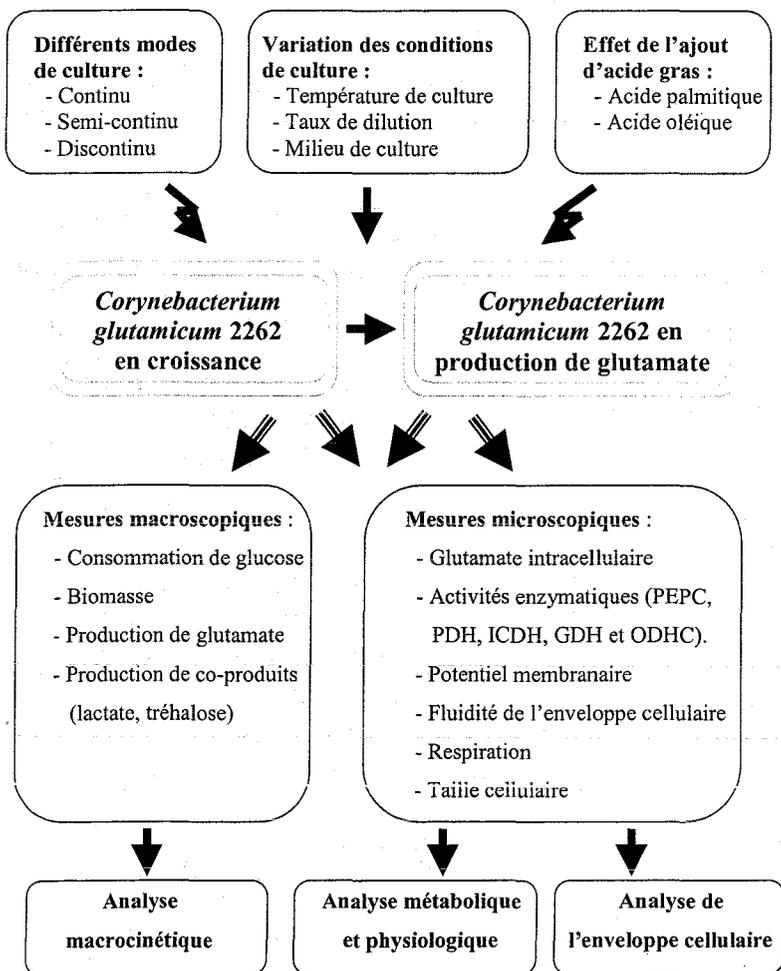


Figure 1 : démarche expérimentale suivie au cours de ce travail.

Lors de ce travail dont la démarche générale est schématisée dans la figure 1, nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les nouvelles informations cinétiques apportées par des cultures de la souche en mode continu ?
- Quelles sont les modifications métaboliques et physiologiques induites par l'élévation de température ?
- Quels sont les effets de la température sur la paroi cellulaire de *C. glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique ?

Le premier chapitre du manuscrit regroupe les données bibliographiques concernant les procédés utilisés pour la production de glutamate, les voies de biosynthèse de glutamate et l'enveloppe cellulaire de *C. glutamicum*.

La deuxième chapitre décrit les "matériels et méthodes" utilisés au cours de cette étude : les méthodes de dosage des métabolites extracellulaires et intracellulaire, et des activités enzymatiques, la méthode de caractérisation des bactéries par cytométrie en flux et la méthode de mesure de la fluidité de l'enveloppe cellulaire.

Le troisième chapitre présente l'étude cinétique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture continue à différentes températures. Le comportement cinétique et physiologique de cette bactérie en culture continue est comparé avec celui identifié en culture semi-continue.

Dans le chapitre IV, nous caractériserons le métabolisme de cette bactérie pendant les phases de croissance et de production de glutamate. L'effet du choc de température sera mesuré sur le niveau d'enzymes telle que la phosphoénolpyruvate carboxylase, la pyruvate carboxylase et le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase ; un lien entre le niveau de ces enzymes et le contenu intracellulaire de glutamate, ainsi qu'avec la production des autres métabolites majoritaires sera établi.

Le dernier chapitre est consacré à l'étude de l'effet des acides gras sur le comportement macro-cinétique de cette bactérie pendant la croissance et la production de glutamate afin d'évaluer l'effet de la température sur le métabolisme des acides gras. L'étude de l'évolution de la fluidité de la paroi cellulaire sera aussi décrite.

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Fermentation glutamique

I.1.1. Historique et importance industrielle de la fermentation glutamique

I.1.1.1. Historique de la production de glutamate

Depuis la découverte de la propriété de renforcement du goût UMAMI par le glutamate, le besoin de glutamate dans le domaine agroalimentaire a rapidement augmenté. La production de glutamate par hydrolyse de protéines végétales, a débuté en 1909 vint ensuite, la découverte de la production de glutamate par fermentation en utilisant du sucre et des sels d'ammonium (Kinoshita et al., 1957). Depuis lors, de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des performances de la fermentation glutamique par modification génétique de la souche bactérienne ou du procédé de fermentation.

I.1.1.2. Principaux producteurs de glutamate

Les principales sociétés productrices de glutamate sont les sociétés japonaises Ajinomoto, Kyowa Hakko Kogyo, Asahi Chemical, Takeda et Tanabe Seiyaku, la société coréenne Cheiljedang, la société américaine Stauffer Chemical et la société franco-belge ORSAN-Amylum (Burkovski et Krämer, 2002 ; Crueger et Crueger, 1984 ; Eggeling et Sahn, 1999). La société ORSAN-Amylum représente environ 10 % de la production mondiale annuelle d'environ un million de tonnes. La croissance du marché de glutamate arrive à maturité avec un taux de croissance annuel de 4 à 5 %.

I.1.1.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées pour la production de glutamate

Les Corynébactéries sont classées dans l'ordre des Actinomycétales. Les souches de Corynébactéries utilisées industriellement ont généralement été isolées du sol et sont auxotrophes pour la biotine. Ce sont des souches aérobies, mésophiles puisque la température maximale de croissance se situe vers 35 °C. Ces souches sont capables d'utiliser de nombreux substrats carbonés

dont le lactate, l'acétate, le méthanol, l'éthanol, le glucose, le fructose et le saccharose. Les souches industrielles présentent une faible activité α -cétoglutarate déshydrogénase mais présentent une activité glutamate déshydrogénase importante (Kinoshita et Nakayama, 1978). Les souches industrielles utilisées sont les suivantes : *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* et *Brevibacterium divaricatum*. Les différences entre les génomes de ces bactéries pouvant être considérées comme minimales, il a été proposé par certains auteurs de les réunir dans une seule et même espèce *C. glutamicum* (Liebl et al., 1991). La membrane externe de *C. glutamicum* contient des acides mycoliques qui servent de barrière contre des agents externes aux cellules (Collins et al., 1982 ; Marienfeld et al, 1997 ; Eggeling et Sahn, 2001).

I.1.1.4. Utilisations du glutamate

L'acide glutamique est un acide aminé non essentiel utilisé principalement comme additif alimentaire sous forme mono-sodique glutamate (MSG, E621). Il est employé comme exhausteur de goût et est considéré par les Japonais comme étant à l'origine d'un 5^{ème} goût : le goût UMAMI. En Europe, la dose journalière admissible est de 0 – 120 mg / kg de poids corporel, alors que cette molécule est considérée comme additif non toxique au Japon, son utilisation industrielle n'est pas donc régulée au Japon. L'acide glutamique est également utilisé, en beaucoup plus faible quantité, par les industries pharmaceutiques et cosmétiques.

I.1.2. Procédés de production d'acide glutamique

Actuellement, la production de glutamate se fait industriellement par fermentation de type semi-continue. La quantité importante de sucre nécessaire à la synthèse de l'acide glutamique ne peut pas être ajoutée en début de culture car elle provoquerait à la fois une inhibition de la production par excès de substrat, et une production de tréhalose. Le procédé semi-continu permet donc de maintenir une concentration faible et non-limitante de glucose dans le réacteur.

Dans un premier temps, la source carbonée est utilisée pour la synthèse de la biomasse. Puis, et parce que l'acide glutamique n'est pas produit spontanément par les cellules, une contrainte est appliquée aux cellules de façon à leur faire excréter du glutamate (figure I-1).

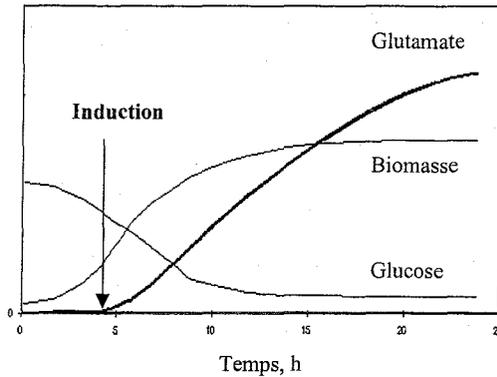


Figure I-1 : schéma global de la fermentation glutamique.

Les contraintes capables d'induire une production de glutamate par différents corynébactéries sont les suivantes :

I.1.2.1. Limitation en biotine

Chez *C. glutamicum* la biotine intervient dans la synthèse des enzymes acétyl-CoA carboxylase et pyruvate carboxylase (Jäger et al., 1996). La limitation en biotine pendant la fermentation glutamique provoque une réduction de la synthèse des phospholipides et une augmentation du rapport acides gras saturés / insaturés. Cette modification métabolique a donc été proposée pour permettre un basculement de la croissance vers la production de glutamate (Clément et al., 1984 ; Clément et Lanéelle, 1986 ; Demain et Birnbaum, 1968 ; Shibukawa et Ohsawa, 1966). La limitation en biotine provoque également une inhibition de l'activité pyruvate carboxylase enzyme anapérotrique principale chez *C. glutamicum* (Peters-Wendisch et al., 1997 ; Delaunay et al., 1999b). La concentration optimale de biotine pour produire du glutamate par ce procédé se situe entre 2 et 5 $\mu\text{g/l}$ (Tanaka et al., 1960). En utilisant le glucose comme source de carbone, la concentration de glutamate en fin de fermentation par ce procédé est entre 10 et 70 g/l (Bona et Moser, 1997 ; Das et al., 1995 ; Kanzaki et al., 1967 ; Hoischen et al., 1989 ; Tanaka et al., 1960 ; Takinami et al., 1966). Ce procédé est limité par les matières premières contenant une concentration élevée en biotine

comme les mélasses de canne ou de betterave. Pour réduire la teneur en biotine du milieu de culture, le mélange de ces mélasses avec des hydrolysats de maïs peut être réalisé.

I.1.2.2. Ajout de pénicilline

L'ajout de pénicilline ne modifie ni la teneur en acides gras ni la teneur en phospholipides membranaires, mais permet de produire du glutamate (Shibukawa et al., 1968). L'agrandissement de la taille cellulaire a été observé pendant la production de glutamate par ce procédé (Shibukawa et al., 1968). La pénicilline modifie l'enveloppe de *C. glutamicum* en empêchant la synthèse du peptidoglycane qui détermine la forme de la bactérie (Wijayarathna et al., 2001). Ce procédé a été proposé pour produire du glutamate tout en utilisant des matières premières riches en biotine (Sommerson et Philips, 1962). Des titres de glutamate en fin de fermentation de 20 à 40 g/l ont été obtenus par *C. glutamicum* et *B. lactofermentum* (Kawahara et al., 1997 ; Nunheimer et al., 1970). En utilisant une souche productrice de lysine, *B. lactofermentum*, une concentration de 57 g/l de glutamate et de 75 g/l de lysine ont pu être produits simultanément en fermentation semi-continue (Shiratsuchi et al., 1995).

I.1.2.3. Ajout de tensioactif

Dans un milieu riche en biotine, l'ajout de tensioactifs comme des acides gras saturés et des dérivés d'acides gras saturés permet d'excréter du glutamate (Duperray et al., 1992 ; Takinami et al., 1965 ; Takinami et al., 1968). Une diminution des phospholipides cellulaires d'environ 50 % et l'augmentation du rapport acides gras saturés / insaturés ont été observées suivant l'ajout du tensioactif (Huchenq et al., 1984). Récemment, il a été montré que l'ajout de tensioactif réprime l'expression d'un gène *dsrR* codant pour une protéine qui peut être une sous-unité du complexe participant à la synthèse des acides gras, ce qui provoque par la suite la modification de la synthèse de phospholipides (Kimura et al., 1996). Utilisant la mélasse de betterave dans le milieu de culture, l'ajout de la polyéthylène glycol stéarate, polyéthylène glycol palmitate, ou laurylamine permet d'obtenir un titre de glutamate entre 80 et 100 g/l en fin de fermentation (Marquet et al., 1986). Une production de 80 g/l de glutamate a également été atteinte en utilisant du polyoxyéthylènesorbitane mono palmitate comme tensioactif et en augmentant la température de culture de 34 à 38°C (Goergen et al., 1997).

I.1.2.4. Choc de température

Un choc de température entraîne une modification de la composition de la membrane chez *C. glutamicum* par activation de la biosynthèse des acides gras saturés et inactivation de la biosynthèse des acides gras insaturés (Gourdon, 1999 ; Kawaguchi et al., 1979 ; Stuible et al., 1996 ; Stuible et al., 1997). Récemment, un mutant sensible à la température a été obtenu par l'inactivation du gène *ltsA*, dont le rôle reste encore inconnu (Hirasawa et al., 2000 ; Hirasawa et al., 2001). L'agrandissement de la taille cellulaire de ce mutant a été observé lors de ce choc de température (Hirasawa et al., 2001). Ceci suggère que la température affecte le réseau d'arabinogalactane-peptidoglycane qui détermine la morphologie cellulaire. Chez *E. coli*, l'augmentation de la température entraîne une augmentation de la fluidité membranaire (Mejia et al., 1999), mais aucune donnée n'est disponible concernant la modification de la fluidité chez *C. glutamicum* après le choc de température. Un titre de 20 à 85 g/l de glutamate a été produit par l'utilisation de ce procédé et d'un milieu riche en biotine (Delaunay et al., 1999a ; Momose et al., 1978 ; Sun et al., 1989).

I.1.2.5. Limitation de la synthèse des acides gras ou phospholipides

Le glutamate peut être produit en utilisant un mutant auxotrophe pour l'acide oléique dans un milieu riche en biotine quand l'acide oléique dans le milieu devient limitant (Kanzaki et al., 1967 ; Kitano et al., 1972). Une concentration de 100 g/l a été atteinte avec du glucose comme source carbonée (Miescher et al., 1975). L'ajout de cérulenine permet de produire du glutamate car la cérulenine inhibe l'activité de l'enzyme de condensation nécessaire pour la synthèse d'acides gras (Funabashi et al., 1989 ; Hoischen et Krämer, 1990). Récemment, il a été montré que l'inhibition totale de l'expression du gène *dtsR*, codant probablement une sous-unité du complexe responsable de la synthèse des acides gras, permettait de produire du glutamate (Kimura et al., 1999). Basé sur ce concept, Nampoothiri et al. (2002) ont modifié des voies de biosynthèse des phospholipides de *C. glutamicum* : les mutants obtenus montrent des sensibilités différentes vis-à-vis des agents inducteurs de la production de glutamate comparé à la souche parentale.

I.1.2.6. Ajout d'anesthésique local

L'excrétion d'acide glutamique peut également être obtenue par l'ajout d'anesthésique local (tétracaïne) dans un milieu de culture riche en biotine. Aucun effet n'a été mis en évidence sur la modification en phospholipides membranaires des cellules (Lambert et al., 1995).

I.1.3. Paramètres importants de la fermentation glutamique

I.1.3.1. Température

La température optimale de culture se situe entre 28 et 38°C pour la phase de croissance et la phase d'excrétion pour la plupart des souches productrices de glutamate (Crueger et Crueger, 1984 ; Kinoshita et Nakayama, 1978). Cependant, l'augmentation de la température à 40°C pendant la phase de production de glutamate permet d'avoir un meilleur blocage de la croissance et de maintenir l'excrétion d'acide glutamique (Delaunay et al., 2002 ; Goergen et al., 1997).

I.1.3.2. pH

La valeur optimale du pH du milieu de culture lors de la croissance et la phase de production de glutamate se situe entre 7 et 8 (Kinoshita et Nakayama, 1978). L'ajout d'ammoniaque ou d'urée permet de corriger le pH et supplémente la culture en source d'azote pendant la phase de production de glutamate.

I.1.3.3. Oxygène

L'oxygène représente un élément essentiel lors des procédés aérobies. La limitation en oxygène pendant la croissance provoque l'accumulation de lactate, de succinate et d'acétate (Dominguez et al., 1993). Pendant la phase de production de glutamate, la limitation en oxygène chez *C. glutamicum* provoque une perte du rendement de conversion de glucose en glutamate en produisant du lactate et succinate (Crueger et Crueger, 1984 ; Kinoshita et Nakayama, 1978). Par contre, trop d'oxygène provoque également une perte de ce rendement en produisant de l' α -cétoglutarate

(Crueger et Crueger, 1984 ; Kinoshita et Nakayama, 1978) : l'intervalle optimum pour la production de glutamate se situe entre 0,007 et 7 mg/l (Hirose et Okada, 1979).

I.1.3.4. Composition du milieu

• Glycine bétaine

La glycine bétaine est un composé présent en grande quantité dans la mélasse de betterave utilisée pour la production industrielle de glutamate. Elle joue un rôle osmoprotecteur pour les bactéries cultivées sur des milieux à forte pression osmotique. En effet, en présence de pressions osmotiques élevées, les cellules accumulent cet osmoprotecteur (Kawahara et al., 1990).

• Pression osmotique

Les mélasses de betterave utilisées pour la production du glutamate par *C. glutamicum* présentent une forte concentration en sels. Lors de la fermentation, l'alimentation en mélasse, la synthèse du glutamate et l'accumulation des ions ammonium utilisés pour régler le pH contribuent à l'augmentation de la pression osmotique. Il a été montré que la pression osmotique avait un impact négatif sur la production de glutamate (Lapujade, 2000). Cependant, une valeur de pression osmotique de 1,2 osmol/kg au début de la phase de production de glutamate est nécessaire pour atteindre la production optimale de glutamate (Debay, 1997 ; Goergen et al., 1997).

• Chélateur de fer

Les corynebactéries nécessitent un chélateur de fer afin de transporter à l'intérieur des cellules les ions ferriques nécessaires à la croissance. Ce composant peut être remplacé par le produit dégradé du glucose par autoclavage (Nakayama et al., 1964), l'ajout de citrate (Von der Osten et al., 1989b) ou par l'ajout de certains hydroxyphénols comme le catéchol et le protocatéchuate (Liebl et al., 1989).

I.1.4. Production de glutamate en fermentation continue

Depuis la découverte de bactéries capables d'excréter l'acide glutamique, le procédé de production de glutamate par voie fermentaire a été fortement étudié. Comparé avec la fermentation discontinue ou semi-continue, la fermentation continue présente l'avantage de stabiliser l'environnement cellulaire, d'éviter l'effet inhibition par substrat et de choisir la vitesse de croissance optimale pour la production. C'est un outil de choix pour étudier la physiologie cellulaire car elle permet de dissocier les paramètres environnementaux. A l'échelle industrielle, la fermentation continue est limitée par la faible concentration cellulaire et donc le faible titre en produit ainsi que par le problème de contamination lors de cultures de longue durée.

De nombreuses publications ont contribué à la compréhension du métabolisme de *C. glutamicum* pendant la croissance et la production de lysine et phénylalanine (Büchs et al., 1988 ; Choi et Tribe, 1982 ; Cocaign-Bousquet et al., 1996 ; Coello et al., 2001 ; Coello et al., 1992a ; Coello et al., 1992b ; Guillouet et Engasser, 1996 ; Hirao et al., 1989 ; Kelle et al., 1996 ; Kiss et Stephanopoulos, 1992a ; Kiss et Stephanopoulos, 1992b ; Oh et Sernetz, 1993 ; Zhao et Lin, 2001 ; Zhao et Lin, 2002). Ces études ont permis de déterminer des valeurs du taux de croissance pour lesquels une production maximale en acide aminé a été mesurée.

Toutefois, en raison des difficultés à contrôler la croissance cellulaire en même temps que la production de glutamate, la production de glutamate en fermentation continue a très peu été réalisée. Cependant, Ueda (1972) a mis au point la production de glutamate en fermentation continue multi-étagée. La croissance cellulaire a été réalisée dans un premier réacteur et l'excrétion de glutamate a été induite dans les fermenteurs suivants par une limitation de biotine ou l'ajout de pénicilline. Ce procédé permet de maintenir les bactéries productrices de glutamate pendant 90 h avec le taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$ sur milieu limité en biotine et moins de 30 h sur milieu riche en biotine en présence de pénicilline.

Récemment, la production de glutamate par ajout du surfactant (tween 40) en fermentation continue utilisant un seul réacteur a été proposée. En alimentant le fermenteur en milieu riche permettant de maintenir une croissance pendant la phase de production, une productivité de 5 à 8,3 g/l.h avec une

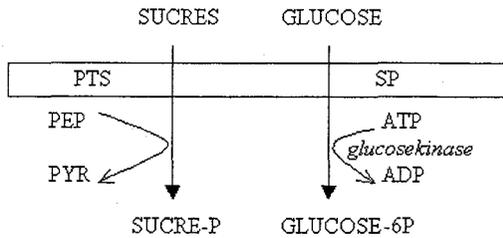
concentration de glutamate de 95 à 175 g/l et un rendement de conversion de glucose en glutamate de 55% ont été obtenus après 100 h de culture (Yoshioka et al., 1999). Mais aucun état stationnaire n'a été obtenu pendant ces expériences.

Par ailleurs, lorsque la croissance cellulaire est arrêtée pendant la phase de production de glutamate, la production continue de glutamate peut être réalisée par recyclage cellulaire ou cellules immobilisées (Amin et al., 1993 ; Ishizaki et al., 1993 ; Nampoothiri et Pandey, 1998). Une productivité de 6,2 g/l.h, une concentration de glutamate de 58,5 g/l et un rendement de conversion de 74,6 % ont été obtenus en fermentation continue avec cellules immobilisée (Amin et al., 1993).

I.2. Métabolisme central des corynébactéries

I.2.1. Entrée des sucres

Deux moyens d'entrée des sucres ont été mis en évidence chez *B. flavum* et *C. glutamicum* : entrée par le système phosphotransférase (PTS) et entrée par le système perméase (SP) (Mori et Shiiro, 1987) (figure I-2). Plusieurs PTS permettent d'assimiler différents sucres en consommant une molécule de phosphoénolpyruvate ; cette réaction génère du sucre-phosphate et du pyruvate. Certains SP telles que la glucose perméase et la maltose perméase sont présents, alors que la fructose perméase est absente (Mori et Shiiro, 1987, Sugimoto et Shiiro, 1989a). Le SP peut représenter 15 % du flux total d'entrée des sucres en croissance rapide, mais en faible croissance le PTS seul peut suffisamment maintenir l'entrée de glucose (Cocaign et al., 1996). Le mutant SP-négatif se multiplie plus lentement par rapport à la souche parentale. Par contre, le mutant SP-amplifié ne montre aucune différence de croissance de souche sauvage car la souche sauvage présente une activité suffisante de la SP (Park et al., 2000). Ceci signifie que l'activité SP est nécessaire pour une croissance rapide des bactéries.

Figure I-2 : entrées des sucres chez *C. glutamicum*.

L'entrée de sucre n'est donc pas limitante pendant la croissance. Une production de tréhalose en fin de production de glutamate a été mise en évidence en procédé semi-continu (Delaunay et al. 1999). Ceci est dû principalement à l'accumulation intracellulaire du glucose-6-phosphate qui signifie que la rentrée de glucose ne semble pas limitante pendant la phase de production.

1.2.2. Glycolyse

Les enzymes de la glycolyse ont été mises en évidence chez *B. flavum* et *C. glutamicum* (Shiio et al., 1959 ; Dominguez et al., 1998). Elles sont responsables de la synthèse de précurseurs à des voies d'anabolisme des acides aminés, d'ATP et de NADH. Les enzymes de ces voies sont présentées dans la figure I-3.

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer la répartition du flux carboné entre la voie de la glycolyse et la voie des hexoses monophosphates pendant la croissance et la production de glutamate. Pendant la croissance des corynébactéries, le flux de glucose-6-phosphate vers la glycolyse est d'environ 50 %, le reste passant par la glycolyse (Dominguez et al., 1998 ; Gourdon, 1999 ; Kollin et al., 1995 ; Sonntag et al., 1995 ; Wendisch, et al., 2000). Cependant, le flux de glucose-6-phosphate vers la glycolyse augmente rapidement lorsque les cellules sont en conditions de production de glutamate (Gourdon, 1999 ; Sonntag et al., 1995). Cette modification peut être expliquée par la diminution du besoin en NADPH, érythrose-4-phosphate et ribose-5-phosphate nécessaire pour la synthèse des acides aminés aromatiques et des nucléotides, conséquence d'une croissance ralentie pendant la phase de production de glutamate. En revanche, une proportion élevée

du flux carboné est dirigée vers la voie de l'hexose monophosphate pendant la production de lysine, car la synthèse de la lysine nécessite également une quantité importante de NADPH.

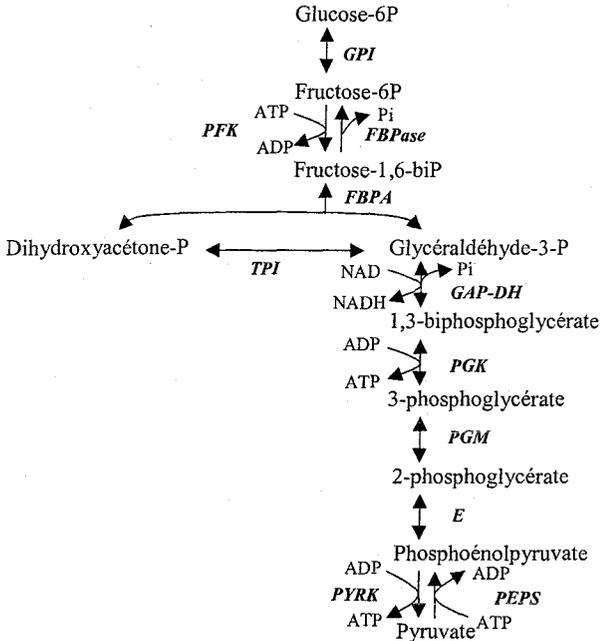


Figure I-3 : voies de glycolyse chez *C. glutamicum* : glucose-6-phosphate isomérase (*GPI*), fructose biphosphatase (*FBPase*), 6- phosphofructokinase (*PFK*), fructose-1,6-biphosphate aldolase (*FBPA*), triose phosphate isomérase (*TPI*), glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAP-DH*), 3-phosphoglycérate kinase (*PGK*), phosphoglycérate mutase (*PGM*), énalase (*E*), pyruvate kinase (*PYRK*) et PEP synthétase (*PEPS*).

La glucose-6-phosphate isomérase (*GPI*), qui catalyse de façon réversible la transformation du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate, a été partiellement purifiée et caractérisée chez *B. flavum* (Sugimoto et Shiio, 1989b). Elle présente un K_m de 1,4 mM pour le glucose-6-phosphate et de 0,54 mM pour le fructose-6-phosphate. Elle est inhibée par l'erythrose-4-phosphate. La 6-

phosphofructose kinase (PFK), qui catalyse de façon irréversible la transformation du fructose-1,6-biphosphate à partir de fructose-6-phosphate, possède un K_m de 2,4 mM et de 0,15 mM pour respectivement le fructose-6-phosphate et l'ATP chez *B. flavum*. Elle est inhibée par l'ADP ($K_i = 0,45$ mM) (Sugimoto et Shiio, 1989a). La fructose biphosphatase (FBPase) qui catalyse la réaction irréversible inverse de la PFK, a été partiellement purifiée (Shiio et al., 1990 ; Sugimoto et Shiio, 1989b). Elle est inhibée par l'AMP. Le gène de la fructose-1,6-biphosphate aldolase (FBPA) de *C. glutamicum* a été séquencé (Von der Osten et al., 1989a), il présente une forte homologie avec la FBPA d'*E. coli*.

La triose phosphate isomérase (TPI), 3-phosphoglycérate kinase (PGK) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAP-DH) sont regroupées dans le même cluster de gènes que la phosphoénolpyruvate carboxylase (Eikmanns, 1992). Aucune étude approfondie n'a été réalisée pour évaluer le niveau nécessaire pendant la production de glutamate. La GAP-DH est très sensible au rapport du NADH/NAD ou la concentration de NADH (Dominguez et al., 1998). A partir d'une concentration de 0,5 mM de NADH et 1 mM de NAD l'activité de la GAP-DH est totalement inhibée. Il est possible que cette enzyme joue un rôle clé en régulant les voies de la glycolyse chez *C. glutamicum*. Aucune étude sur la phosphoglycérate mutase (PGM) ou l'énolase n'a été effectuée. Le gène de la pyruvate kinase (PYRK) a été cloné et caractérisé chez *C. glutamicum*. Cette enzyme possède un K_m de 0,07 mM et 1,2 mM pour l'ADP et le PEP respectivement (Gubler et al., 1994a ; Jetten et al., 1994a). Elle peut également utiliser le GDP ou l'IDP comme accepteur de phosphate, avec un K_m de 0,25 mM et 0,12 mM respectivement. Elle est activée par l'AMP et le PEP, mais elle est inhibée par l'ATP et le P_i . La PEP synthétase (PEPS) permet de synthétiser du PEP à partir de pyruvate. Elle présente un K_m de 0,4 mM pour l'ATP (Jetten et al., 1994b). Elle est inhibée par le PEP avec un K_i de 3 mM. Une forte augmentation de la synthèse de cette enzyme est observée lorsque le lactate est utilisé comme source de carbone.

1.2.3. Voies des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates a été mise en évidence chez *B. flavum* (Shiio et al., 1960) (figure I-4). Cette voie permet de synthétiser des précurseurs (NADPH, ribose-5-phosphate, erythrose-4-

phosphate, fructose-6-phosphate, glycéraldéhyde-3-phosphate et CO₂) nécessaires à la synthèse de l'histidine, des lipides, des acides nucléiques et acides aminés aromatiques.

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (GPDH) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (PGDH) ont été caractérisées chez *B. flavum* (Sugimoto et Shiio, 1987a et 1987b). La GPDH possède un Km de 0,14 mM pour le glucose-6-phosphate et de 0,024 mM pour le NADP. Pour la PGDH, les Km sont de 0,045 mM et de 0,036 mM pour le 6-phosphogluconate et le NADP respectivement. La GPDH est inhibée par le NADPH, l'oxaloacétate et le F-1,6-BP, tandis que la PGDH est inhibée par le NADPH, l'erythrose-4-phosphate, le ribose-5-phosphate, le glycéraldéhyde-3-phosphate, l'oxaloacétate, le F-1,6-BP et l'ATP. L'inhibition de ces enzymes par le NADPH peut être très importante car le Ki est de 0,025 mM (Moritz et al., 2000). Cette inhibition indique que la voie des pentoses phosphates est contrôlée par le métabolisme carboné central.

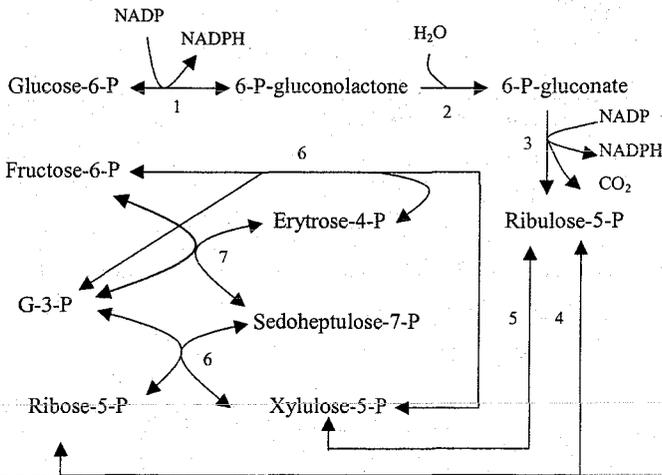


Figure I-4 : voies des pentoses phosphates chez *C. glutamicum*. Glucose-6P déshydrogénase (1), lactonase (2), 6-phosphogluconate déshydrogénase (3), ribose-5P isomérase (4), ribose-5P épimérase (5), transacétolase (6) et transadolase (7).

L'activité de la transcétolase a été étudiée par Sugimoto et Shiio, (1989a). Aucun inhibiteur de cette activité enzymatique n'a été mis en évidence. Le mutant déficient de cette enzyme a besoin d'acides aminés aromatiques et de vitamines pour croître sur un milieu avec glucose, ce qui semble indiquer qu'il y a une seule transcétolase chez *C. glutamicum* (Ikeda et Okamoto, 1998 ; Ikeda et al., 1999).

Pendant la production de glutamate, la croissance est fortement inhibée. Ceci suggère que la consommation du NADPH chute également si bien que l'accumulation probable de NADPH va inhiber la GPDH et la PGDH, car la constante d'inhibition est très faible ($K_i = 0,025$ mM) (Moritz et al., 2000). Cette hypothèse est confirmée par le résultat de Gourdon, (1999) qui a observé une augmentation du flux carboné vers la glycolyse et une diminution du flux carboné dans la voie des pentoses phosphates au cours de la phase de production de glutamate par *C. glutamicum* 2262. Au contraire, lors de la fermentation de lysine, le NADPH fortement consommé pour la synthèse de la lysine, est synthétisé par la voie des pentoses phosphates pour maintenir le niveau intracellulaire en NADPH (Sonntag et al., 1995).

I.2.4. Voies anaplérotiques chez *C. glutamicum*

Les voies anaplérotiques sont très nombreuses chez les corynébactéries : la phosphoénolpyruvate carboxylase, la pyruvate carboxylase, l'enzyme malique, la phosphoénolpyruvate carboxykinase, l'oxaloacétate décarboxylase et le shunt glyoxylique. Les voies anaplérotiques permettent soit d'alimenter le cycle de Krebs avec l'oxaloacétate, soit d'apporter le pyruvate ou le phosphoénolpyruvate pendant la néoglucogenèse (figure I-5).

La PEPC est une enzyme qui catalyse la conversion irréversible du phosphoénolpyruvate en oxaloacétate avec fixation d'un CO_2 et libération d'un P_i . Son rôle est de fournir de l'oxaloacétate au cycle de Krebs. Les caractéristiques cinétiques de cette enzyme ont été caractérisées pour plusieurs souches (tableau I-1).

Chez *C. glutamicum* cette enzyme est activée par l'acétyl-CoA, le fructose 1,6-biphosphate et les ions divalents Mn^{2+} et Mg^{2+} . Le pH optimum de cette enzyme est entre 7,2 et 8 (Mori et Shiio, 1985a et 1985b). L'acétyl-CoA et le fructose 1,6-biphosphate activent la PEPC en diminuant le K_m

pour le PEP (Jetten et al., 1994b). Elle est inhibée par des intermédiaires du cycle de Krebs tel que le citrate, l'isocitrate, le succinate le fumarate et le malate (Ozaki et Shiiio, 1969). La valeur de la constante d'inhibition par l'aspartate est entre 0,044 et 1,5 mM selon le degré de la purification, et de 4,7 mM pour l' α -cétoglutarate (Jetten et al., 1994a ; Mori et Shiiio, 1985a, Mori et Shiiio, 1985b). Ces deux derniers effecteurs exercent une inhibition synergique sur la PEPC (Mori et Shiiio, 1985b). L'aspartate et le glutamate répriment la PEPC (Shiiio et Ujigawa, 1978). Chez *C. glutamicum*, l'élimination de la PEPC n'affecte pas la production de la lysine (Peters-Wendisch et al., 1993), et son amplification n'augmente pas la production de glutamate (Delaunay, 1999). Ceci suggère donc que cette enzyme présente un rôle mineur pour approvisionner le cycle de Krebs (Delaunay, 1999).

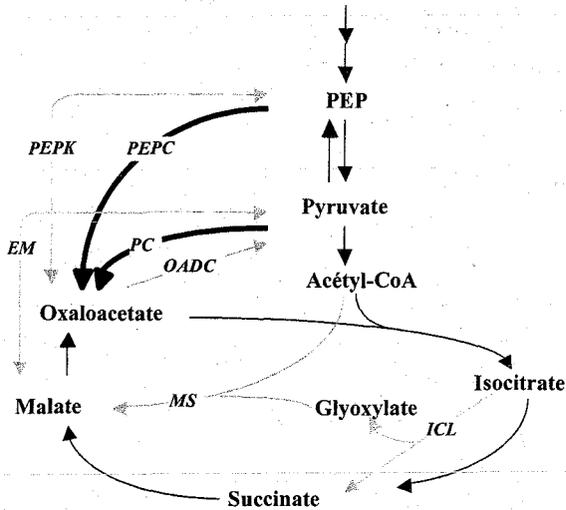


Figure I-5 : voies anapérotyques chez *C. glutamicum* : (—▶) milieu de glucose et (---▶) milieu de lactate ou d'acétate. **PEPC** : phosphoénolpyruvate carboxylase, **PEPK** : phosphoénolpyruvate carboxykinase, **PC** : pyruvate carboxylase, **EM** : enzyme malique, **OADC** : oxaloacétate décarboxylase, **ICL** : isocitrate lyase, **MS** : malate synthase.

La phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPK) catalyse la conversion réversible du PEP en oxaloacétate. Elle possède des Km de 0,7 mM, 0,4 mM, 12 mM, 1 mM, 0,5 mM pour le PEP, l'IDP, le KHCO₃, l'oxaloacétate et l'ITP respectivement (Jetten et Sinskey, 1993 ; Jetten et Sinskey, 1994b). L'étude cinétique de la PEPK purifiée chez *C. glutamicum* montre que son activité présente un pH optimum de 6,6 et qu'elle n'utilise pas de l'ADP comme co-substrat. Elle est dépendante de la présence en Mg²⁺. Cette enzyme est fortement inhibée par l'ATP (60 % d'inhibition avec 1 mM d'ATP) (Jetten et Sinskey, 1993 ; Jetten et al., 1994b). Un mutant amplifié pour la PEPK produit moins de glutamate lors du procédé utilisant du tensioactif, tandis que le mutant déficient pour cette activité produit plus de glutamate comparé avec la souche parentale (Riedel et al., 2001). Ces résultats permettent d'identifier le rôle de la PEPK comme une enzyme de la néoglucogenèse.

PEPC chez	<i>C. glutamicum</i> AS 019	<i>C. glutamicum</i> 2262	<i>B. flavum</i> ATCC 14067	<i>B. lactofermentum</i> ATCC 13869
Vmax (U/mg de protéine)	0,28	0,137	0,54	0,62
Km (PEP) (mM)	3	29	3,2	3,3
Km (PEP) (mM)	0,7 *	9 **	1 *	0,6 *
Ki (aspartate) (mM)	1 *	1,4 **	1,5 *	0,7 *

Tableau I-1 : paramètres cinétiques de la PEPC (Jetten et al., 1994b ; Adam, 1997).

* en présence 0,2 mM de l'acétyl-CoA.

** en présence 0,1 mM de l'acétyl-CoA.

La PC est une enzyme catalysant la conversion irréversible du pyruvate en oxaloacétate avec fixation d'un CO₂ et libération d'un Pi. La biotine est nécessaire pour que la pyruvate carboxylase fonctionne. La réaction commence par une fixation du CO₂ sur la biotine qui est liée de façon covalente à la pyruvate carboxylase en utilisant un ATP, le CO₂ est ensuite transféré au pyruvate pour former l'oxaloacétate (Attwood, 1995). Cette enzyme a été mise en évidence pendant la production de lysine et de glutamate chez *B. lactofermentum* et *C. glutamicum* (Tosaka et al., 1979 ; Peters-Wendisch et al., 1997 ; Peters-Wendisch et al., 2001 ; Uy et al., 1999). Elle possède des Km de 1,3 mM et de 0,2 mM pour le pyruvate et l'ATP. Le pH optimum de la PC est de 7,3. L'activité

de cette enzyme est dépendante des ions Mg^{2+} . Cette enzyme est inhibée par l'ADP, l'AMP, l'ITP et l'acétyl-CoA avec des constantes d'inhibition de 2,6 mM, 0,75 mM, 15 mM et 0,11 mM respectivement (Peters-Wendisch et al., 1997). Chez *C. glutamicum*, l'inactivation de la PC et de la PEPC élimine la croissance sur un milieu avec du glucose comme seule source carbonée (Peters-Wendisch et al, 1998). Ceci montre que la PEPC et la PC sont les seules enzymes anaérobies fonctionnelles pour approvisionner le cycle de Krebs pendant la croissance sur ce milieu. Un mutant amplifié pour la PC présente la même capacité de production du glutamate (Guillouet et al., 1998). Par contre, en absence de cette enzyme la production de glutamate diminue (Delaunay et al, 1999b). Ceci suggère que la PC est l'enzyme anaérobie majoritaire chez *C. glutamicum*. En effet, la PEPC ne joue un rôle important que pendant les premières heures de la phase de production de glutamate (Delaunay, 1999).

L'EM catalyse la décarboxylation réversible du malate en pyruvate avec une libération d'un coenzyme réduit NADP. Le gène de l'EM a été cloné et caractérisé chez *C. glutamicum* (Gourdon, 1999). Cette enzyme présente des K_m de 3,2 mM, 0,08 mM, 14 mM et 0,06 mM pour le malate, le NADP, le pyruvate et le NADPH respectivement. Elle est activée par des ions K^+ et NH_4^+ . Le pH optimum de cette enzyme est de 7,8. L'EM est une enzyme fonctionnelle dans le sens de la néoglucogenèse, elle permet d'apporter aux cellules du NADPH. Pendant la production de glutamate, l'activité de cette enzyme chute avec la diminution de la voie des pentoses phosphates (Gourdon, 1999 ; Delaunay, 1999).

L'OADC est responsable de la décarboxylation irréversible de l'oxaloacétate en pyruvate. L'activité de l'OADC chez *C. glutamicum* est activée par la présence d'IDP et de Mg^{2+} ou de Mn^{2+} (Jetten et al., 1994b). Elle possède un K_m de 2 mM pour l'oxaloacétate. Elle est inhibée par l'ADP et le CoA avec un K_i de 2 mM et de 1 mM respectivement. L'implication de l'ODHC dans le métabolisme de *C. glutamicum* reste inconnue.

Le shunt glyoxylique permet de remplir le cycle du Krebs avec des molécules à 4 atomes de carbone à partir d'acétyl-CoA grâce à l'isocitrate lyase (ICL) et la malate synthase (MS) (figure I-5). L'ICL est dépendante de la présence d'ions divalents Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} . Chez *B. flavum*, elle est fortement inhibée par de nombreux intermédiaires du cycle de Krebs dont le glyoxylate,

l'oxaloacétate, le malate, l' α -cétoglutarate, le succinate, le PEP, le F-1,6-bi-phosphate, le 3-phosphoglycérate et le 6-phosphogluconate (Ozaki et Shiiro, 1968 ; Reinscheid et al., 1994). Sur milieu contenant de l'acétate, les activités ICL et MS sont fortement exprimées. Elles sont régulées au niveau de leur synthèse par l'acétyl-CoA ou ses dérivés (Wendisch et al., 1997). L'isocitrate lyase est complètement réprimée lors de cultures de *C. glutamicum* ou *B. lactofermentum* contenant du glucose (Gubler et al., 1994b).

I.2.5. Complexe pyruvate déshydrogénase

La pyruvate déshydrogénase (PDH), catalysant la production d'acétyl-CoA à partir du pyruvate, est un complexe de trois enzymes : la pyruvate déshydrogénase (E1), la dihydrolipoamide acétyl transférase (E2) et la dihydrolipoamide déshydrogénase (E3) (figure I-6). Une séquence du gène présente des fortes homologues avec la séquence du gène de la dihydrolipoamide acétyl transférase (E2) d'autres microorganismes ; elle a été clonée chez *B. lactofermentum* (Usuda et al., 1996).

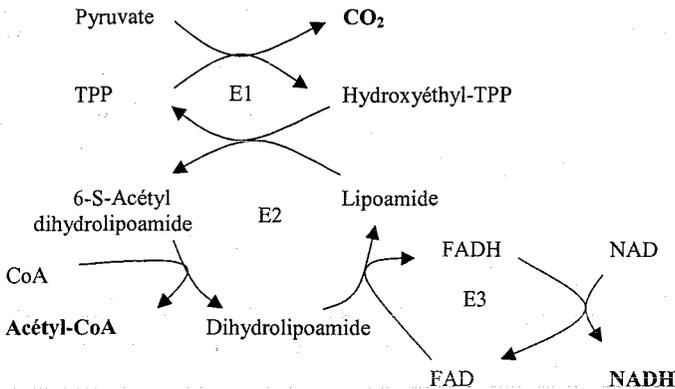


Figure I-6 : complexe de pyruvate déshydrogénase : pyruvate déshydrogénase (E1), dihydrolipoamide acétyl transférase (E2) et lipoamide déshydrogénase (E3).

Ce gène comporte également des fortes homologues avec la séquence du gène de l' α -cétoglutarate déshydrogénase et la dihydrolipoamide-succinyl transférase d'autres microorganismes. Ce gène pourrait donc coder une protéine qui présente plusieurs activités catalytiques. La dihydrolipoamide

déshydrogénase est une enzyme participant à la formation du complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase et pourrait intervenir dans le transfert des électrons du NADH, dans la chaîne respiratoire chez *C. glutamicum* (Schwinde et al., 2001). L'activité de la PDH est activée par la présence d'une faible concentration de $MgCl_2$, elle est inhibée de façon compétitive par le pyruvate et par le β -fluoropyruvate (Ozaki et Shii, 1983 ; Tosaka et al., 1978 ; Vallino et Stephanopoulos, 1994). Chez *Enterococcus faecalis*, la PDH est inhibée par le rapport NADH/NAD (Snoep et al., 1990). Ceci suggère qu'elle présente un rôle régulateur du niveau de NADH. La PDH chez *C. glutamicum* est postulée comme enzyme limitante pour la croissance sur lactate et sur glucose pendant la croissance rapide de *C. glutamicum* (Cocaign-Bousquet et al., 1993 ; Cocaign-Bousquet et Lindley, 1995 ; Cocaign-Bousquet et al., 1996). Pendant la phase de production, l'amplification de l'activité de cette enzyme chez *C. glutamicum* permet d'améliorer le rendement de conversion de glucose en glutamate (Kanno et al., 2000).

1.2.6. Enzymes du cycle de Krebs

Les enzymes du cycle de Krebs catalysent la formation de précurseurs du glutamate comme l'oxaloacétate et l' α -cétoglutarate, facteur énergétique (l'ATP) et cofacteurs (le NADH, le FADH et NADPH) et de CO_2 . Les enzymes du cycle de Krebs de *C. glutamicum* sont présentées dans la figure I-7.

La citrate synthase catalyse la condensation de l'oxaloacétate et de l'acétyl-CoA en citrate. Elle a été purifiée chez *B. flavum* (Shii et al., 1977). Elle possède des K_m de 3,9 μM et 54 μM pour l'oxaloacétate et l'acétyl-CoA respectivement. Elle est inhibée par l'ATP, le cis-aconitate, le citrate et l'isocitrate. Cette enzyme est également réprimée par le glutamate (Shii et Ujigawa, 1978).

L'aconitate hydratase catalyse la réaction réversible du citrate en isocitrate. Cette enzyme n'est pas réprimée par le glutamate chez *B. flavum* (Shii et Ujigawa, 1978). Elle est proposée comme enzyme clé du cycle de Krebs car une faible activité a été mesurée chez *B. flavum* (Ruklish et al., 1987).

L'isocitrate déshydrogénase catalyse irréversiblement la décarboxylation de l'isocitrate en formant de l' α -cétoglutarate, du CO_2 et du NADPH. Elle possède des K_m de 23 μM et 24 μM pour l'isocitrate et le NADP. Le gène de cette enzyme a été cloné et séquencé chez *C. glutamicum* (Eikmanns et al., 1995) et l'enzyme a été purifiée chez *C. glutamicum* (Bai et al., 1999). Cette enzyme est légèrement inhibée par l'oxaloacétate, l' α -cétoglutarate et le citrate. Elle est également inhibée de façon concertée par l' α -cétoglutarate et le glyoxylate (Shiio et Ozaki, 1968). L'activité de cette enzyme augmente progressivement pendant la phase de production de glutamate en fermentation semi-continue (Gourdon et Lindley, 1999).

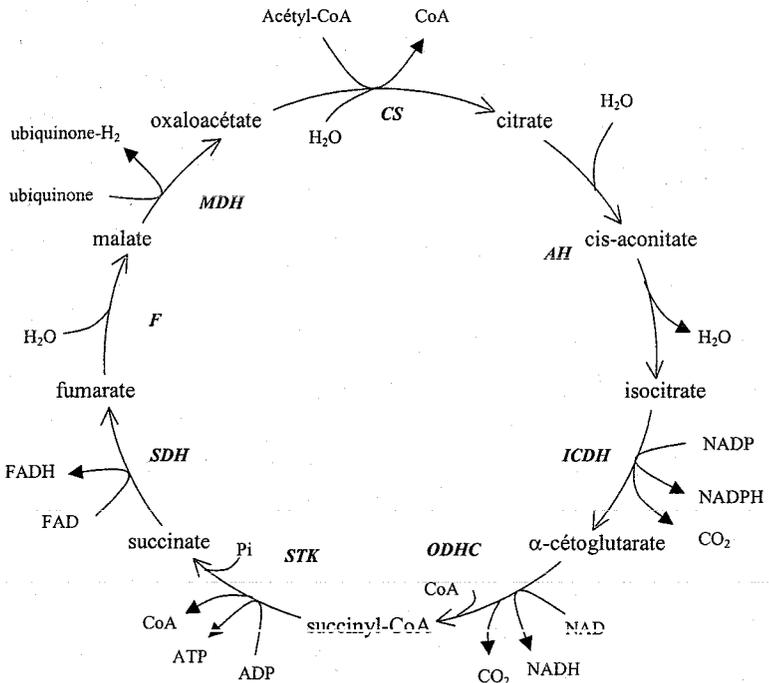


Figure I-7 : cycle de Krebs. *CS* : citrate synthase, *AH* : aconitate hydratase, *ICDH* : isocitrate déshydrogénase, *ODHC* : α -cétoglutarate déshydrogénase, *STK* : succinate thiokinase, *SDH* : succinate déshydrogénase, *F* : fumarase, *MDH* : malate déshydrogénase.

L' α -cétoglutarate déshydrogénase (ODHC) catalyse la décarboxylation irréversible de l' α -cétoglutarate en succinyl-CoA avec libération d'une molécule de NADH. Cette enzyme, purifiée chez *B. flavum* (Shiio et Ujigawa, 1980), se compose d'un complexe de trois enzymes : l' α -cétoglutarate déshydrogénase (E1), la dihydrolipoamide-succinyl transférase (E2) et la dihydrolipoamide déshydrogénase (E3) (figure I-8).

Chez *B. lactofermentum*, un gène possédant de fortes homologies de séquence avec des gènes codant pour l'activité α -cétoglutarate déshydrogénase E1 a été cloné (Usuda et al., 1996). Du côté 5' de ce gène, des séquences de forte homologie avec la dihydrolipoamide-succinyl transférase (E2) et la dihydrolipoamide-acétyl transférase de la pyruvate déshydrogénase ont été observées. Ceci suggère donc que ce gène code pour une protéine bi-fonctionnelle E1 et E2. Or la dihydrolipoamide déshydrogénase E3 transfère des électrons du NADH vers la chaîne respiratoire (Schwinde et al., 2001). Elle nécessite du glycérol pour être active. Le pH optimum de cette enzyme se situe entre 7,7 et 7,8. Elle possède des K_m de 80 μ M, 86 μ M et 61 μ M pour l' α -cétoglutarate, le NAD et le CoA respectivement. Elle est activée par l'acétyl-CoA et fortement inhibée par le cis-aconitate, le succinyl-CoA, le NADPH, le NADH, le pyruvate et l'oxaloacétate. La synthèse de cette enzyme est activée par la présence de glutamate dans le milieu de culture.

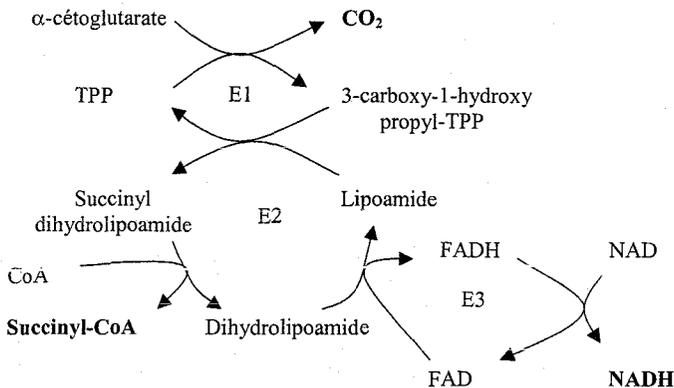


Figure I-8 : complexe d' α -cétoglutarate déshydrogénase (ODHC) : α -cétoglutarate déshydrogénase (E1), dihydrolipoamide succinyl transférase (E2) et lipoamide déshydrogénase (E3).

Le gène de l' α -cétoglutarate déshydrogénase a été cloné et séquencé chez *C. glutamicum* (Asakura et al., 1999). L'ODHC est considérée comme enzyme clé pour la production de glutamate car les mutants ayant une activité ODHC très faible ou absente, produisent plus de glutamate comparé aux souches parentales (Asakura et al., 1999 ; Nakazawa et al., 1996). Au contraire, un mutant dont l'activité ODHC est absente, montre la même productivité de glutamate (Shiio et al., 1982). Récemment, une forte diminution de l'activité ODHC a été observée pendant la phase de production de glutamate utilisant le procédé de limitation biotine, avec ajout de tensioactif ou de pénicilline ou lors de l'utilisation d'un mutant *dtsR* négatif (Kawahara et al., 1997 ; Kimura et al., 1998 ; Kimura et al., 1999). Comme la production de glutamate est liée à la modification de la membrane, cette enzyme est donc supposée régulée par des métabolites lipidiques (Kimura et al., 1998 ; Kimura et al., 1999).

La malate déshydrogénase chez *C. glutamicum* est une enzyme membranaire, elle n'utilise pas le NAD comme accepteur d'électron, pour la formation d'oxaloacétate à partir de malate. Elle oxyde le malate en donnant des électrons à l'ubiquinone ou à d'autres accepteurs artificiels (Molenaar et al., 1998).

1.2.7. Voie de biosynthèse du glutamate

Pour la plupart des bactéries, le glutamate est synthétisé par deux voies métaboliques différentes : soit par la glutamate déshydrogénase (GDH), soit la glutamine synthétase (GS) couplée avec la glutamate synthase (glutamine amide α -cétoglutarate amino transférase GOGAT). Ces trois enzymes ont été mises en évidence et partiellement caractérisées chez *C. glutamicum*, *B. flavum* et *C. callunae* (Ertan, 1992 ; Oshima et al., 1964 ; Shiio et Ujigawa 1978 ; Sung et al. 1984 ; Vandecasteele et al., 1975) (figure I-9).

La glutamate déshydrogénase (GDH) catalyse la réaction réversible de la synthèse de glutamate, de NADP et d'eau à partir d' α -cétoglutarate, de NADPH et d'ammonium. Le glutamate réprime et inhibe la glutamate déshydrogénase dans la réaction de la formation de glutamate, or le NADP inhibe légèrement l'enzyme (Ertan, 1992 ; Shiio et Ozaki, 1970 ; Shiio et Ujigawa, 1978). L' α -cétoglutarate et l'ammonium inhibent la réaction inverse de la glutamate déshydrogénase (Ertan,

1992 ; Shiio et Ozaki, 1970). Aucune modification du niveau de GDH n'a été observée, lors des cultures de *C. glutamicum* sur des milieux avec concentrations des différentes en ammonium (Tesch et al., 1998).

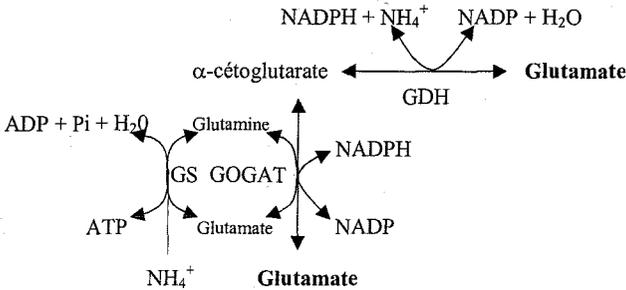


Figure I-9 : voies de biosynthèse du glutamate. GDH : glutamate déshydrogénase, GS : glutamine synthétase, GOGAT : glutamine amide α -cétoglutarate amino transférase.

La glutamine synthétase et la glutamate synthase (GS/GOGAT) catalysent également la réaction de formation du glutamate. La glutamate synthétase (GS) catalyse la synthèse réversible de glutamine à partir de glutamate, d'ammonium et d'ATP. La GS est inhibée par la glycine, l'alanine, la sérine, l'aspartate, l'ADP et l'AMP (Sung et al., 1984). La glutamate synthase (GOGAT) catalyse la synthèse de deux molécules de glutamate à partir d'une molécule de glutamine, d'une molécule d' α -cétoglutarate et d'une molécule de NADPH. La GOGAT n'est pas inhibée par le glutamate, mais elle est légèrement inhibée par le NADP (Ertan, 1992). Une diminution de la synthèse de la GS/GOGAT a été mise en évidence chez *C. glutamicum* lorsque la concentration d'ammonium augmente dans le milieu de culture (Schulz et al., 2001 ; Tesch et al., 1998). En conséquence, en fermentation glutamique en présence de forte concentration en ions NH_4^+ , l'activité GDH est l'activité majoritairement responsable de la synthèse de glutamate.

Deux mutants de la GDH ont été construits à partir de *C. glutamicum*. Un mutant de *C. glutamicum* amplifié pour la GDH et un mutant sans GDH ont été cultivés sur milieu avec glucose. Le niveau de glutamate intracellulaire a fortement augmenté chez le mutant GDH amplifié et diminué chez le mutant sans GDH pendant les phases de croissance et de production de glutamate. Aucune

modification significative de la croissance et de la production de glutamate n'a été observée chez ces mutants sur le milieu avec peu d'ions NH_4^+ (Börmann-el Kholy et al., 1993 ; Lapujade, 2000). Ces résultats suggèrent que la GS/GOGAT seule puisse restaurer le niveau de glutamate intracellulaire suffisant pour la croissance et la production de glutamate en absence de la GDH. En revanche, la croissance du mutant sans GDH est fortement réduite lorsque la culture est réalisée dans un milieu ayant une forte concentration en sel d'ammonium, car la GS/GOGAT est réprimée par ce sel (Tesch et al., 1998). Récemment, l'étude des flux carbonés par RNM montre que 72 % du glutamate est synthétisé à l'aide de la GDH et 28 % avec la GS/GOGAT chez *C. glutamicum* ATCC-13032 (Tesch et al., 1999). Or le mutant de *C. glutamicum* dont la GS/GOGAT a été inactivée, produit la même quantité de glutamate que la souche parentale (Becker et al., 2001).

En conclusion, l'écoulement du flux carboné à partir du glucose-6-phosphate vers la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates est très régulé par les besoins en NADPH. La production de lysine nécessite une grande quantité de NADPH, c'est pourquoi les cellules utilisent de façon importante la voie des pentoses phosphates tout au long de la fermentation. En revanche, cette voie diminue fortement pendant la phase de production de glutamate. Or la surproduction de NADH par la glycolyse et par le cycle de Krebs est contrôlée par l'inhibition de la glyceraldéhyde-3P-déshydrogénase. L'accumulation de métabolites intracellulaires de la glycolyse pendant la phase de production est probablement causée par la limitation des enzymes permettant le passage de la glycolyse vers le cycle de Krebs. Les voies anaplerotiques sont considérées actuellement non-limitantes car l'amplification des principales enzymes de ces voies ne permet pas une amélioration de la production de glutamate. Le passage du pyruvate vers l'acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase semble limitant pendant la production de glutamate, mais aucun niveau de cette enzyme n'est disponible pendant la fermentation glutamique. Au niveau du cycle de Krebs, l' α -cétoglutarate déshydrogénase semble être fortement régulée lors de la fermentation glutamique puisque son niveau chute très fortement pendant la phase de production.

1.2.8. Respiration chez *C. glutamicum*

Les corynébactéries sont classées dans le groupe des bactéries anaérobies facultatives qui sont capables d'effectuer des oxydations terminales indifféremment en aérobiose ou anaérobiose. La

chaîne respiratoire permet de transférer des électrons des éléments oxydables à l'accepteur final tel que l'oxygène et de synthétiser de l'énergie sous forme d'ATP dans la membrane cytoplasmique (figure I-10). Les éléments combustibles chez *C. glutamicum* sont le NADH, le NADPH, le lactate, le succinate et le malate (Molenaar et al., 1998 ; Niebisch et Bott, 2001). Lorsque l'oxygène est limitant chez *C. glutamicum* des électrons sont éliminés en anaérobiose en accumulant du lactate, du succinate et de l'acétate (Dominguez et al., 1993).

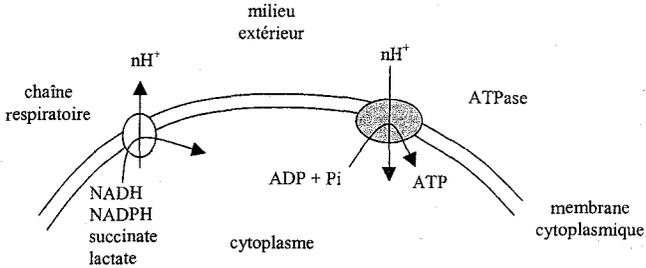


Figure I-10 : Schéma simplifié du couplage entre transfert d'électron et formation d'ATP.

La chaîne respiratoire de *C. glutamicum* consiste en des activités déshydrogénases, la ménaquinone et des cytochromes avec des spectres qui correspondent aux cytochromes a, b, c, et d (Hertz, 1998 ; Shvinka et al., 1979 ; Trutko et al., 1982).

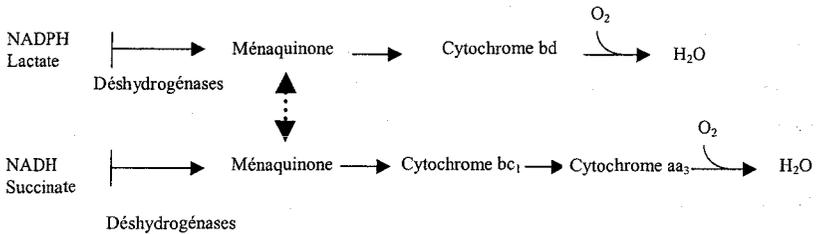


Figure I-11 : chaîne respiratoire chez *C. glutamicum* (Matsushita et al., 1998).

Deux chaînes alternatives existent chez *C. glutamicum* : la première chaîne dont le cytochrome aa est en position terminale est sensible au cyanide, tandis que la seconde dont le cytochrome bd se trouve en fin de chaîne est résistante au cyanide (Matsushita et al., 1998) (figure I-11).

I.3. Modification de l'enveloppe cellulaire et excrétion de glutamate

I.3.1. Membrane de *C. glutamicum*

I.3.1.1. Structure de l'enveloppe cellulaire

L'analyse par microscope électronique de l'enveloppe cellulaire de *C. glutamicum* (Kinoshita, 1985 ; Marienfeld et al., 1997 ; Puech et al., 2001 ; Richter et al., 1985) montre 4 couches principales, de l'intérieur à l'extérieur : la couche de phospholipides, la couche de peptidoglycane-arabinogalactane, la couche des acides mycoliques et la couche de polysaccharides (figure I-12) (Eggeling et Sahn, 2001).

• La couche des phospholipides

Cette couche membranaire cytoplasmique permet aux bactéries de faire fonctionner des activités enzymatiques en milieu d'hydrophobe ainsi que de transporteur des solutés de l'extérieur vers l'intérieur ou de l'intérieur vers l'intérieur (Chami et al., 1997 ; Hermann et al., 2000 ; Marienfeld et al., 1997 ; Puech et al., 2001).

• La couche du peptidoglycane-arabinogalactane

Cette couche permet aux bactéries de renforcer la structure de la membrane et d'avoir une morphologie cellulaire particulière (Kijima et al., 1998 ; Wijayarathna et al., 2001). Cette couche est attachée avec la membrane cytoplasmique de façon covalente par l'intermédiaire de lipoarabinogalactanes et glycérophospholipides (Parish et al., 1997).

• La couche des acides mycoliques

Cette couche est une particularité du genre Mycobactéries et Corynébactéries (Kinoshita, 1985 ; Minikin et al., 1978). La résistance aux antibiotiques de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* et

M. bovis, due à l'imperméabilité de la couche d'acides mycoliques, cause de gros problèmes de santé publique (Liu et al., 1996 ; Minnikin et al., 2002).

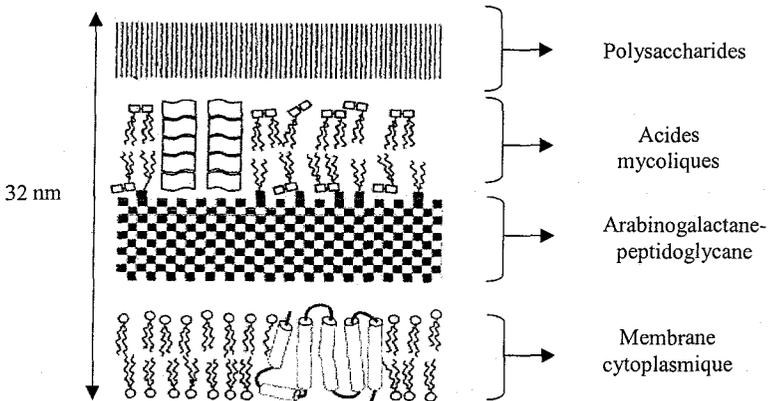


Figure I-12 : enveloppe cellulaire de *C. glutamicum*.

Cette couche permet également aux bactéries de résister au traitement du lysozyme, à la sonication relativement puissante et aux chocs mécaniques comme un vortex (Kinoshita, 1985). 10 % des acides mycoliques sont attachées par une liaison covalente avec l'arabinogalactane-peptidoglycane en formant des structures mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (Eggeling et Sahn, 2001 ; Puech et al., 2001 ; Shimakata et Minatogawa, 2000).

• La couche des polysaccharides

Cette couche contient des polysaccharides neutres qui présentent 10 – 20% d'arabinose, 20 – 25 % de mannose et 50 – 70% de glucose (Puech et al., 2001).

I.3.1.2. Synthèse de l'enveloppe cellulaire

• Acides gras

Les acides gras synthétisés à partir de l'acétyl-CoA sont utilisés pour la synthèse des phospholipides et des acides mycoliques (figure I-13).

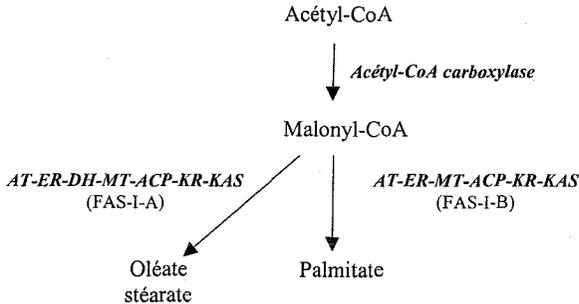


Figure I-13 : acétyl transacylase (*AT*), enol réductase (*ER*), déshydratase (*DH*), protéine de porteur acyl (acyl carrier protein *ACP*), malonyl transacylase (*MT*), cétocoacyl synthase (*KAS*) et cétocoacyl réductase (*KR*).

La première enzyme, acétyl-CoA carboxylase, est une protéine biotinillée (Jäger et al., 1996). Or Une gène, *dtsR*, présente de fortes homologies avec la propionyl-CoA carboxylase qui participe à la synthèse des acides gras, a été clonée chez *B. flavum* (Kimura et al., 1996 ; Kimura et al., 1998 ; Kimura et al., 1999). Les acides gras constituant les phospholipides sont principalement l'acide palmitique et l'acide oléique (90% des acides gras totaux) tandis que les acides gras mineurs sont l'acide stéarique, l'acide myristique, l'acide octodécanoïque et l'acide octodécadiénoïque (Gourdon, 1999 ; Minikin et al., 1978 ; Otsuka et Shiio, 1968).

Deux complexes d'acide gras synthase (FAS-I et FAS-II) ont été identifiés chez les corynébactéries. Le système FAS-I, synthétisant des acides gras saturés et insaturés, contient 2 protéines FAS-I-A et FAS-I-B chez *B. ammoniagenes* (Stuible et al., 1996 ; Stuible et al., 1997), tandis que le système FAS-II (*AT*, *ER*, *ACP*, *KR* et *KAS*) catalyse la synthèse des acides mycoliques à partir des acides gras (Barry III et al., 1998 ; Eggeling et Sahm, 2001). Le système FAS-I-A, catalyse la synthèse de

l'oléate et du stéarate, tandis que FAS-I-B catalyse la synthèse du palmitate uniquement. *In vitro*, le mélange de ces enzymes synthétise plus d'oléate et moins de palmitate à basse température, alors que la synthèse de palmitate est augmentée à température élevée (Kawaguchi et al., 1979). Ceci suggère une régulation du système FAS-I-A et FAS-I-B en réponse au choc thermique.

• **Phospholipides**

Les phospholipides sont synthétisés à partir du glycérol et des acides gras (figure I-14).

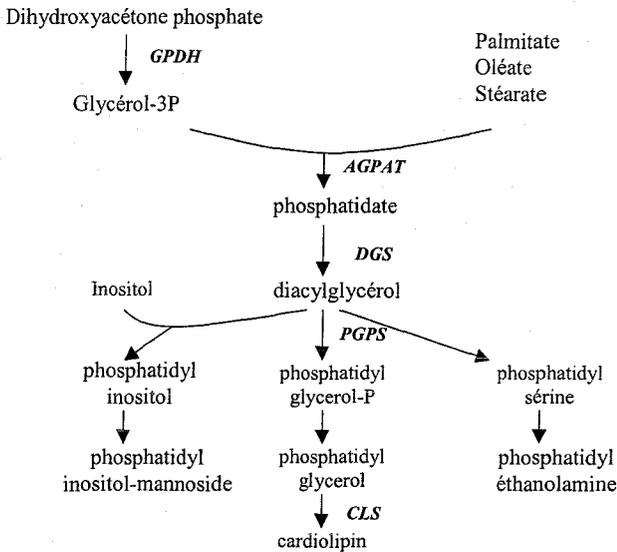


Figure I-14 : voies de biosynthèse des phospholipides. *GLPDH* : glycérol-3P déshydrogénase, *AGPAT* : acylglycérol-3P-acyltransférase, *DGS* : diacylglycérol synthase, *PGPS* : phosphatidyl glycérophosphate synthase, *CLS* : cardiolipin synthase.

Les phospholipides des Corynébactéries sont l'acide phosphatidyl, le phosphatidylglycérol, le diphosphatidylglycérol, le phosphatidyinositol et le phosphatidyl inositol mannoside (Hoischen et Krämer, 1990 ; Minikin et al., 1978).

Le phosphatidylglycérol représente 70 – 80% des phospholipides (Shibukawa et al., 1970). Le phosphatidyl inositol, précurseur du phosphatidylinositol mannoside, représente environ 5% des lipides totaux (Hoischen et Krämer, 1990). Le phosphatidyinositol mannoside est attaché de façon covalente avec l'arabinomannane et le lipoarabinomannane chez *M. tuberculosis* (Hunter et al., 1986 ; Hunter et al., 1990).

Ceci permet de mieux renforcer la membrane de ces bactéries. Certaines voies de biosynthèse des phospholipides chez *C. glutamicum* sont étudiées, alors que la modification de l'expression des gènes *GPDH*, *AGPAT*, *DGS*, *PGPS* ou *CLS* provoque des modifications de la synthèse des phospholipides qui provoque ensuite la modification de la sensibilité vis à vis de la température et du surfactant dans une optique de production de glutamate (Nampoothiri et al., 2002).

• Arabinogalactane-peptidoglycane

Chez *C. glutamicum*, l'arabinogalactane-peptidoglycane est une grande macromolécule qui se compose d'arabinogalactane, peptidoglycane, lipomannane et lipoarabinomannane. Elle se forme comme squelette de *C. glutamicum* lorsque les autres substances cellulaires ont été séparées par une extraction avec le solvant organique. La structure de l'arabinogalactane-peptidoglycane a été étudiée chez *M. tuberculosis* (Eggeling et Sahm, 2001 ; Lederer et al., 1975). Le peptidoglycane consiste en peptides de L-alanyl-D-isoglutaminyl-meso-dipinopimelyl-D-alanine qui forme la liaison amide avec le groupe carboxyle du meso-diaminopimélate. Chez *C. glutamicum*, quand la synthèse de diaminopimélate est réduite, le réseau de peptidoglycane est affaibli. En conséquence, les cellules s'allongent de 2 à 6 µm (Wehrmann et al., 1998). L'arabinogalactane, où les acides mycoliques sont estérifiés, est formé par l'arabinose et le galactane. Le lipomannane et le lipoarabinomannane sont dispersés dans la chaîne mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane et sont partiellement liés avec le mannoside phosphatidyinositol (Nikaido et al., 1993).

La biosynthèse complète d'arabinogalactane-peptidoglycane reste encore à étudier. Récemment, certains gènes impliqués dans la biosynthèse d'arabinogalactane-peptidoglycane ont été identifiés, clonés et caractérisés. Le gène du *murI* (D-glutamate racémase) permet de synthétiser le D-glutamate à partir du L-glutamate (Malathi et al., 1999). Le gène du *murL* (UDP-N-

acétylmuramate:L-alanine ligase) implique dans la synthèse du peptidoglycane (Wachi et al., 1999). L'*alr* (D-alanine racémase) permet de synthétiser de la D-alanine à partir de L-alanine. Le mutant de *C. glutamicum alr* négatif peut excréter du glutamate lorsque les cellules sont cultivées dans le milieu avec glucose en limitation de D-alanine (Eggeling et al., 2001). Le gène *murE* (UDP-N-acétylmuranoyl-l-alanine-D-glutamate:meso-diaminopimélate ligase) est également impliqué dans la synthèse d'arabinogalactane-peptidoglycane (Wijayarathna et al., 2001). Le gène *ftsI* (septum peptidoglycane synthétase) code pour une protéine contenant des séquences qui peuvent fixer la pénicilline (Wijayarathna et al., 2001); l'ajout de pénicilline inactive probablement l'activité enzymatique, permet d'excréter le glutamate et fait gonfler les cellules (Shibukawa et al., 1968).

• Acides mycoliques

Les acides mycoliques sont synthétisés à partir des acides gras. La chaîne s'allonge sur les acides gras avec la condensation du malonyl-CoA (Barry III et al., 1998).

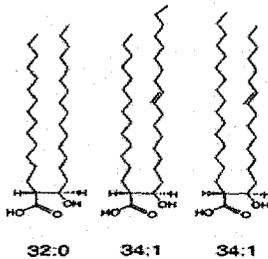


Figure I-15 : acides mycoliques présents chez *C. glutamicum* : chaîne de 32 et 34 carbones.

Chez *M. tuberculosis*, la longueur de la chaîne carbonée peut atteindre 90 carbones. Les chaînes plus courtes (22 à 38 unités) ont été identifiées chez *C. glutamicum* et la plupart ont une chaîne carbonée de 34 et 36 unités (figure I-15) (Jang et al., 1997).

Le système de la synthèse d'acides mycoliques est FAS-II. Ce système est composé de 5 enzymes principales : ER (énol réductase), AT (acétyltransacylase), KR (cétoacyl réductase), KAS (cétoacyl synthase) et ACP (protéine de porteur acyl) (Barry III et al., 1998). Parmi les acides mycoliques synthétisés, certains sont estérifiés avec du tréhalose phosphate pour former de l' α,α' tréhalose monomycolate et de l' α,α' tréhalodimycolate (Shimakata et Minatogawa, 2000 ; Eggeling et Sahn, 2001).

I.3.2. Excrétion des acides aminés chez *C. glutamicum*

I.3.2.1. Système d'export des acides aminés

Le système d'export et d'import des acides aminés est différent chez les différentes cellules étudiées. Nous allons donc aborder ici uniquement l'excrétion des acides aminés par *C. glutamicum*. De nombreux systèmes d'excrétion d'acides aminés ont été identifiés ces dernières années (figure I-16) (Krämer, 1994).

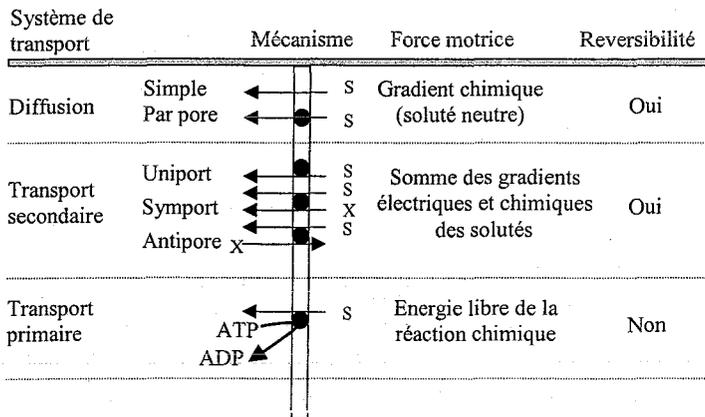


Figure I-16 : mécanisme de transport des acides aminés.

Les acides aminés sont excrétés par la diffusion simple ou/et par un transporteur spécifique (Brøer et Krämer, 1991a ; Demain et Birnbaum 1968; Krämer, 1994). L'activation de l'excrétion par diffusion est dépendante du gradient de la concentration entre les compartiments intérieur et extérieur de la

cellule, les propriétés physico-chimiques du soluté telles que la taille, l'hydrophobicité et la charge aussi que des propriétés de la membrane (la composition et la fluidité). Dans le cas de transport actif, une source d'énergie (ATP, force motrice) est nécessaire et ce d'autant plus que le soluté est chargé.

Afin d'activer l'excrétion d'une molécule, il peut être préalablement nécessaire d'augmenter sa concentration à l'intérieur des cellules. Ceci peut être réalisé par génie métabolique, par augmentation des voies de biosynthèse, par l'altération du système de régulation et par l'arrêt ou l'atténuation des voies de dégradation de la molécule. Une autre possibilité consiste à limiter la croissance cellulaire de façon à favoriser l'utilisation de la source carbonée pour la synthèse de la molécule et non pour la croissance.

Il est, des fois, nécessaire de modifier la propriété de la membrane pour que le soluté puisse la traverser. Cette modification peut concerner les propriétés physico-chimiques de la membrane, la force motrice au travers de cette membrane et le transporteur s'il existe.

Certains acides aminés sont excrétés par un transporteur qui nécessite de l'énergie. Ceci permet aux cellules d'excréter cet acide aminé contre le gradient de concentration. Dans ces conditions, il est nécessaire d'augmenter la capacité de biosynthèse de l'énergie.

• Excrétion de la lysine et des acides aminés basiques

L'existence d'un système de transport spécifique de la lysine a été mise en évidence pour la première fois chez *C. glutamicum* par l'équipe de Krämer (Bröer et Krämer, 1991a ; Bröer et Krämer, 1991b). Depuis lors, le transporteur de la lysine a été caractérisé (Vrljic et al., 1996) : la protéine du transporteur, *lysE*, a une taille de 25 kDa ; la transcription de ce gène est régulée par un gène régulateur, *lysG*, qui se situe à côté de la séquence de gène *lysE*. Lorsque la concentration intracellulaire en lysine est supérieure à 40 mM, le système de transport est alors activé. Comme l'arginine, la lysine est un acide aminé qui n'est pas dégradé après sa synthèse. Il a été démontré que l'expression du gène *lysE* permet également d'exporter d'autres acides aminés basiques tels que l'histidine, l'arginine et la citrulline (Vrljic et al., 1996). Lors de la caractérisation biochimique du

transporteur de lysine, il a été démontré que l'activité d'export de la lysine dépend de la force protomotrice (Bröer et Krämer, 1991a).

• **Excrétion d'isoleucine**

L'excrétion de l'isoleucine a été étudiée chez *C. glutamicum*. (Zittrich et Krämer, 1994). Cette étude a montré que l'isoleucine est excrétée par diffusion grâce aux propriétés hydrophobes de la molécule ; de plus, un transporteur d'isoleucine existe, dépendant de la force protomotrice. Lorsque la concentration intracellulaire en isoleucine est supérieure à 7 mM, ce système de transport est activé (Ebbighausen et al., 1989 ; Hermann et Krämer, 1996).

• **Excrétion de thréonine**

En conditions de culture favorables, en présence de peptides riches en thréonine, la thréonine est excrétée. L'activation du système de transport de thréonine a été observée lorsque la concentration intracellulaire en thréonine est supérieure à 170 mM (Simic et al., 2001). Dans ces conditions, il apparaît que l'excrétion par le système de transport représente 59% du flux de thréonine, alors que 21% est excrété par la diffusion et le reste (19%) par un mécanisme inconnu (Palmieri et al., 1996 ; Simic et al., 2001).

• **Excrétion d'acides aminés aromatiques**

L'excrétion des acides aminés aromatiques reste peu étudiée. Il a été montré que la phénylalanine et la tyrosine sont excrétées par diffusion simple (Burkovski et Krämer, 2002). Par ailleurs, la diminution de l'activité d'import du tryptophane de 50% permet d'augmenter la production d'environ 20% (Ikeda et al., 1994 ; Ikeda et Katsumata, 1995). Ce phénomène montre qu'il y a un lien entre le système d'import et d'export de tryptophane chez *C. glutamicum*.

I.3.2.2. Excrétion de glutamate

Le glutamate est un acide aminé à chaîne courte, il est chargé négativement lorsqu'il se trouve dans le milieu intracellulaire de *C. glutamicum*. Sa chaîne montre une faible hydrophobicité, ce qui ne lui permet pas de diffuser facilement dans un milieu lipidique comme les membranes. Des études récentes ont montré que l'étape d'excrétion du glutamate est limitante dans le processus de production du glutamate (Lapujade et al., 1999).

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des facteurs déclenchant et modulant l'excrétion de glutamate. Afin de comprendre le mécanisme de l'excrétion de glutamate, les paramètres ci-dessous ont été étudiés pendant la croissance et la production de glutamate induite par une limitation en biotine, un ajout de tensioactif ou de pénicilline ou un choc de température.

• Effet de la concentration en glutamate intracellulaire sur l'excrétion de glutamate

La concentration de glutamate intracellulaire diminue pendant la phase de production de glutamate et l'excrétion de glutamate a lieu, bien que la concentration de glutamate intracellulaire soit inférieure à celle du milieu de culture (Hoischen et Krämer, 1989 ; Lapujade et al., 1999). Ce résultat exclut donc l'hypothèse de Demain et Birnbaum (1968) qui suggérait que l'excrétion de glutamate soit réalisée par diffusion.

• Effet de la force protomotrice sur l'excrétion de glutamate

Lorsque l'excrétion de glutamate est faite contre son gradient, il est donc nécessaire de déterminer la force protomotrice ou force électrochimique. La force protomotrice (ΔP) dépend du potentiel membranaire et du gradient de pH et est calculée par la formule suivante :

$$\Delta P = \Delta \Psi - (2,3.R.T / F).\Delta pH$$

Où $\Delta \Psi$ est le potentiel membranaire, $\Delta pH = pH_{in} - pH_{ex}$ gradient du pH entre le compartiment intracellulaire et le milieu de culture, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue (°K) et F la constante de Faraday.

Cependant, le ΔpH ne semblent pas des facteurs importants pour l'excrétion de glutamate (Daran-Lapujade et al., 2003 ; Debay, 1996 ; Duperray et al., 1992). Le potentiel membranaire est le gradient du potentiel électrique entre le milieu intérieur et extérieur des cellules. Il dépend principalement du gradient de concentration des ions Na^+ , K^+ et Cl^- . Ce gradient est dépendant des pompes ioniques membranaires mises en route par l'activité métabolique. La mesure du potentiel membranaire peut être réalisée à l'aide du partage de part et d'autre de la membrane de molécules chargées. A partir des concentrations extracellulaire et intracellulaire de cette molécule chargée, le potentiel membranaire peut être calculé par l'équation de Nernst :

$$C_{int} / C_{ext} = e^{-n \cdot \Delta\Psi / R \cdot T}$$

Où $\Delta\Psi$ est le potentiel membranaire, F la constante de Faraday, C_{int} la concentration intracellulaire de la molécule, R la constante des gaz parfaits, C_{ext} la concentration extracellulaire de la molécule et T la température absolue ($^{\circ}K$).

Les molécules chargées utilisées pour mesurer le potentiel membranaire peuvent être des ions organiques synthétiques lipophiles, radioactifs. La mesure du potentiel membranaire est réalisée par la détermination de la concentration intracellulaire de la sonde. Plus récemment, des sondes fluorescentes également lipophiles cationiques (rhodamine 123 ou cyanines) et anioniques (oxonols) ont été utilisées pour une mesure par cytométrie en flux du potentiel membranaire.

Lors de mesures pendant la croissance et la production de glutamate, le potentiel membranaire atteint sa valeur maximale lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance et diminue fortement pendant la phase de production du glutamate (Debay, 1997 ; Duperray et al., 1992 ; Lapujade, 1999). Lorsque la production de glutamate est induite par la température, le potentiel membranaire diminue avec l'augmentation de la température de culture comprise entre 33 et 41 $^{\circ}C$, alors que la vitesse spécifique de la production de glutamate augmente avec l'augmentation de la température (Lapujade, 1999). Ceci favorise l'hypothèse que la chute du potentiel membranaire est impliquée dans la production de glutamate. Toutefois, quand le potentiel membranaire des cellules productrices est artificiellement modifié, la production de glutamate n'est pas affectée (Duperray et al., 1992 ; Gutmann et al., 1992). Ceci signifie que le potentiel membranaire n'est pas un paramètre

important lors de l'excrétion de glutamate, sa modification au cours de la phase de production ne serait due qu'à une détérioration de l'état physiologie cellulaire.

• **Energie cellulaire**

L'importance de l'énergie cellulaire a été étudiée pendant la phase de production de glutamate par *C. glutamicum*. Il est apparu que l'exporteur de glutamate requiert de l'ATP puisque lorsque le pool d'ATP diminue, l'excrétion de glutamate est arrêtée (Gutmann et al., 1992 ; Sekine et al., 2001).

• **Composition de la membrane plasmique**

Des études anciennes ont proposé que l'excrétion de glutamate, lors du procédé de production de glutamate induite par une limitation en biotine, soit due à la modification de la composition en acides gras des phospholipides (augmentation du rapport acides gras saturés / acides gras insaturés) (Demain et Birnbaum, 1968 ; Kanzaki et al., 1967 ; Takinami et al., 1966). Plus récemment, il a été observé qu'une baisse de la teneur en phospholipides de la membrane intervient lors de la phase de production de glutamate au cours du procédé limité par la biotine ou avec ajout des surfactants (Clément et al., 1984 ; Clément et Lanéelle, 1986 ; Huchench et al., 1984).

Cependant, la production de glutamate par ajout de pénicilline n'est pas liée à la modification de la composition de la membrane cytoplasmique (Shibukawa et al., 1968). De plus, le suivi de la composition en acides gras et phospholipides des cellules excrétrices de glutamate au début de la phase de la production (Hoischen et Krämer, 1990), a montré que l'excrétion de glutamate intervient alors que la teneur en phospholipides et la composition en acide gras ne sont pas encore modifiés lors du procédé "biotine".

Enfin, Nampoothiri et al. (2002) ont montré que des mutants des voies de biosynthèse des phospholipides présentent des productivités de glutamate plus élevées. Toutefois, ces mutants requièrent encore un stress pour excréter le glutamate.

A la lumière de ces données, il apparaît que la composition de la membrane semble influencer l'excrétion de glutamate mais que ce paramètre n'est pas suffisant pour déclencher l'excrétion de glutamate.

• Réseau d'arabinogalactane-peptidoglycane

Au cours du procédé de production de glutamate par ajout de pénicilline, un gonflement des cellules apparaît pendant la phase de production (Shibukawa et al., 1968). Ce phénomène est due à un affaiblissement du réseau d'arabinogalactane-peptidoglycane (Kijima et al., 1998), probablement par une inhibition de l'activité septum-peptidoglycane synthase (Wijayarathna et al., 2001). Cependant, le même phénomène de modification de taille cellulaire a été observé au cours de la production de glutamate par la limitation de biotine (Kinoshita, 1985) et par le choc de température (Hirasawa et al., 2000). Bien que, la corrélation entre la limitation de biotine ou le choc de température et la modification du réseau d'arabinogalactane-peptidoglycane ne soit pas encore identifiée, un mutant *alr* négative (gène codant pour D-alanine racémase qui synthétise la D-alanine pour la synthèse de l'arabinogalactane-peptidoglycane) excrète du glutamate en absence de D-alanine (Eggeling et al., 2001 ; Tauch et al., 2002).

En bref, nous pouvons conclure que l'excrétion de glutamate est un phénomène actif très probablement catalysé par un transporteur. Ce transporteur nécessite de l'énergie cellulaire (ATP) et semble indépendant de la force protomotrice. Il semblerait l'exporteur de glutamate soit différent de l'importeur puisque un mutant amplifié pour le gène codant pour la protéine de l'import de glutamate ne change en rien la productivité de glutamate (Eggeling et al., 1996). L'activation de l'exporteur de glutamate n'est pas due à l'accumulation du glutamate intracellulaire mais serait plutôt due à la modification de l'enveloppe cellulaire. Alors que la modification de la membrane plasmique semble ne pas être prépondérante pour l'activation de l'exporteur de glutamate, la couche d'arabinogalactane-peptidoglycane semble jouer un rôle important.

I.3.2.3. Fluidité membranaire

La fluidité membranaire, micro-viscosité de membrane, peut être mesurée à l'aide des sondes fluorescentes (DPH ou TMA-DPH) qui font du mouvement à l'état excité dans le milieu lipidique (voir en détail dans Matériels et Méthodes). Ce mouvement va dépendre de la viscosité du milieu environnant, c'est à dire de la viscosité de la membrane.

• Effet de l'environnement sur la fluidité membranaire et la régulation de la composition lipidique

Les facteurs déterminant la fluidité membranaire sont la nature des lipides, qui la composent, leurs arrangements et des paramètres physico-chimiques tel que la température. Cependant, la fluidité membranaire du milieu lipidique qui est composé des acides gras augmente lorsque la chaîne latérale est plus courte, présente plusieurs liaisons insaturées ou / et insaturé avec la forme *cis* (Cronan, 2002).

L'enveloppe cellulaire est une barrière très variable en terme de structure / composition, capable de s'adapter à de nombreuses conditions environnementales : que le milieu soit froid, chaud, acide ou basique, le micro-organisme s'adapte en modifiant des protéines fonctionnelles. Ces modifications peuvent par exemple permettre de maintenir les cellules en croissance.

Lorsque la température augmente, la synthèse des acides gras saturés réalisée par l'enzyme FAS-I-B est activée, alors que la synthèse des acides gras insaturés réalisée par l'enzyme FAS-I-A est diminuée chez corynébactéries (Kawaguchi et al., 1979 ; Stuible et al., 1996 ; Stuible et al., 1997). Chez *Pseudomonas putida*, l'augmentation de la température de culture entraîne une isomérisation de la chaîne des acides gras insaturés de la forme *cis* à la forme *trans* (Leffeld et Keweloh, 1996). En revanche, à température faible *P. putida* augmente la proportion d'acides gras insaturés (forme *cis*) par rapport aux acides gras saturés, afin d'augmenter la fluidité membranaire (Vigh et al., 1998). Cette augmentation est effectuée par l'accroissement de la synthèse de la protéine désaturase (Russel, 1990 ; Russel, 1992). Chez *E. coli*, l'augmentation du rapport acides gras saturés / insaturés due à l'augmentation de la température permet de revenir à la fluidité membranaire initiale (Mejia et

al., 1999). L'allongement de la chaîne des acides mycoliques permet également de diminuer la fluidité de la paroi cellulaire chez les Mycobactéries (Liu et al., 1996).

• Rôle de la fluidité dans le transport des solutés

L'état de la barrière lipidique détermine l'affinité du transporteur de substrat qui affecte ensuite la croissance cellulaire (Nedwell, 1999). En augmentant la température de la culture, la couche lipidique cellulaire passe successivement de l'état "gel cristallin (A)" à l'état "liquide cristallin (B)", puis à une structure "hexagonale (C et D)" (figure I-17) (Vigh et al., 1998) ; la structure "hexagonale forme D" présente une forte fluidité. Ces modifications structurelles peuvent altérer les protéines membranaires dont les transporteurs.

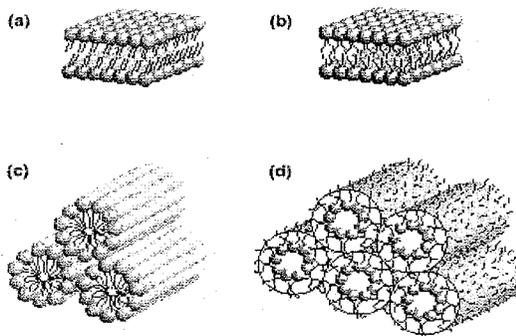


Figure I-17 : effet de la température sur la structure de la bicouche lipidique (a) : gel cristallin, (b) : liquide cristallin, (c), (d) : hexagonales.

Il est généralement considéré que la perméabilité de la membrane est élevée lorsque la fluidité membranaire augmente (Magin et al., 1990). Une augmentation artificielle de la fluidité de 13 % augmente d'environ 50 % le flux de transport de glucose (Jourdhail et Meddings, 2001 ; Pilch et al., 1980).

• Fluidité membranaire de *C. glutamicum*

Chez *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae*, l'ajout de tensioactifs comme l'alcool éthoxylate, l'amine éthoxylate ou l'oxyde d'amine provoque une augmentation de la fluidité de la membrane cytoplasmique (Glover et al., 1999).

La fluidité de la membrane cytoplasmique mesurée pendant la production de glutamate induite par un anesthésique local (tétracaïne) n'est pas significativement modifiée (Lambert et al., 1995). Ce résultat est en accord avec ceux de Hoischen et al. (1990), qui ont observé que l'excrétion de glutamate en limitation de biotine a lieu malgré une composition de la membrane cytoplasmique inchangée. Par ailleurs, la mesure de la fluidité de cellules entières par anisotropie pendant la production de glutamate induite par la limitation en biotine, n'a pas donné de résultats concluants (Neubeck et al., 1993).

Chez les Mycobactéries, la couche d'acide mycolique joue un rôle important dans la fluidité de la paroi cellulaire (Liu et al., 1996). Une corrélation entre le type d'acides mycoliques présents et la fluidité de paroi a été démontrée (Liu et al., 1996).

Néanmoins, les micro-organismes évoluent et s'adaptent à ces conditions de culture contraignantes. Par exemple, chez *Oenococcus oeni*, l'augmentation instantanée de la température de culture de 30 à 42°C provoque une augmentation de 25% de la fluidité membranaire ; cependant, lorsque le choc thermique est maintenu sur une période prolongée, la fluidité membranaire revient à la valeur initiale (Tourdot-Maréchat et al., 2000).

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1. Caractéristiques de la souche *C. glutamicum* 2262

Le micro-organisme utilisé, *Corynebacterium glutamicum* 2262, chez lequel la production de glutamate est thermo-inductible, a été fourni par la société ORSAN-Amylum. Les caractéristiques générales de l'espèce bactérienne *C. glutamicum* sont présentées dans le tableau 1 (Pons et al., 1993). La composition élémentaire générale de *C. glutamicum* est $C_4,5H_8O_{2,2}N$ avec 9% de cendre (Cocaign, 1992).

Caractères principaux	Substrats utilisés	Autres caractères
. Bactérie à Gram positif.	. Glucose +	. Uréase +
. Bacille court, droit ou légèrement incurvé souvent par paire.	. Fructose +	. Hydrolyse gélatine -
. Dimension : 0,7 à 1 µm x 1 à 3 µm.	. Saccharose +	. Hydrolyse caséine -
. Aspect sur gélose : colonies jaune pâle à jaune, régulières et lisses.	. Maltose +	. Réduction de nitrate en nitrite +
. Non-sporulant, non-mobile.	. Tréhalose +	. Esculine -
. Aérobie facultative.	. Mannose +	. Hippurate +
. Auxotrophe pour la biotine.	. Rhamnose -	
. Production d'acide glutamique.	. Galactose -	
. Température optimale de croissance 25 à 37°C.	. Raffinose -	
. pH optimal de croissance : 7,3 à 7,4.	. Arabinose -	
. ADN : C + G = 55 à 57,7 %	. Lactose -	
. Paroi : présence d'acide méso diaminopimélique et d'arabinogalactane.	. Xylose -	
	. Dextrine -	
	. Salicine -	
	. Amidon -	

Tableau II-1 : caractéristiques générales de *C. glutamicum*.

II.2. Conduite des fermentations

II.2.1. Milieu de culture

• Composition des milieux de culture

La composition des milieux de culture est basée sur le milieu MCGC (Von der Osten et al., 1989b). Les milieux sont supplémentés en déféroxamine pour faciliter l'assimilation des ions ferriques. La composition des différents milieux utilisés pour les cultures en fioles d'Erlenmeyer, en bioréacteur en mode discontinu, semi-continu ou continu est présentée dans le tableau 2.

Substances	Culture en fiole d'Erlenmeyer	Culture en discontinu ou semi-continu	Solutions ajoutées lors des cultures en continu	
			A : 50% (v/v)	B : 50% (v/v)
Glucose	34 g/l	15 ou 60 g/l	15 g/l	15 g/l
Na ₂ HPO ₄	15 g/l	3 g/l	6 g/l	
KH ₂ PO ₄	3 g/l	6 g/l	12 g/l	
NaCl	1 g/l	2 g/l	4 g/l	
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 g/l	8 g/l	16 g/l	
MgSO ₄ .7H ₂ O	400 mg/l	400 mg/l		800 mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	40 mg/l	40 mg/l		80 mg/l
FeCl ₃	4 mg/l	4 mg/l		8 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 mg/l	1 mg/l		2 mg/l
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,4 mg/l	0,4 mg/l		0,8 mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	4 mg/l	4 mg/l		8 mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,2 mg/l	0,2 mg/l		0,4 mg/l
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,4 mg/l	0,4 mg/l		0,8 mg/l
CaCl ₂	84 mg/l	84 mg/l		168 mg/l
Biotine	2 mg/l	2 mg/l	4 mg/l	
Thiamine	20 mg/l	20 mg/l	40 mg/l	
Déféroxamine	3 mg/l	3 mg/l	6 mg/l	
Bétaine	0	2 g/l	4 g/l	
Urée	4 g/l			

Tableau II-2 : composition des milieux de culture.

• Préparation du milieu de culture

Les sels et le glucose sont stérilisés séparément à 121°C pendant 20 minutes. Les vitamines, la bétaine et le calcium sont stérilisés par filtration sur membrane de porosité 0,2 µm. Les solutions A et B pour les culture en mode continu sont préparées et ajoutées séparément dans le bioréacteur. Lors de culture en milieu contenant de glutamate comme source de carbone, le glucose est remplacé par 20 g/l de glutamate de potassium.

II.2.2. Procédés de culture

• Conservation de la souche

La conservation de la souche, à moyen terme, est réalisée par congélation à -20°C, en présence de glycérol (glycérol stock). Une culture de la souche est effectuée en fiole d'Erlenmeyer. Les bactéries sont prélevées en phase exponentielle de croissance et un volume de glycérol (20 % minimum) est ajouté à la suspension cellulaire. Cette suspension bactérienne est ensuite répartie dans des tubes de 1 ml puis congelée à - 20 °C.

• Précultures

Les précultures sont réalisées en fiole d'Erlenmeyer chicanée. Les cultures sont effectuées à une température de 33 °C avec une agitation de 220 tours/min. Lorsque les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance, la culture peut être utilisée pour inoculer le réacteur.

• Culture en fermenteur

Les cultures en réacteur en mode discontinu, semi-continu et continu sont réalisées avec les différents milieux présentés dans le tableau 2. La culture en mode semi-continu a été réalisée dans un réacteur Biolaflite (France) avec un volume initial de 0,75 litres ; le volume final après 24 h de culture était 1,1 litres. Pour les cultures discontinues et continues, un réacteur Applikon (Hollande) a été utilisé avec un volume utile de 1,5 litres. La calibration de la sonde de mesure du pH est faite avant la stérilisation du réacteur (121°C pendant 20 min.). La calibration de la sonde oxygène (100 % avec de l'air et 0 % avec de l'azote) est réalisée juste avant l'inoculation.

Le volume de l'inoculum (DO d'environ 20-25) est de 1,5% (v/v) pour la culture diluée et 10% (v/v) pour les autres cultures. Les cultures sont débutées en mode discontinu à 33°C afin d'atteindre la phase d'exponentielle de croissance (d'environ 4 h) et est changée à la température désirable. La concentration de glucose est limitée à 15 g/l pour éviter la limitation en oxygène dans le milieu de culture pendant les cultures continues. En effet, des concentrations plus élevées en glucose synonymes de densités cellulaires plus importants auraient augmenté une limitation de la culture par l'oxygène.

Pour les cultures continues, le changement de la température est réalisé lors de l'apparition de la limitation en glucose. L'alimentation en milieu neuf (mélange de 50% solution A et 50% de solution B) est réalisée en même moment. Un soutirage au même débit que l'alimentation est effectué pour maintenir le volume constant pendant la culture.

Pour la culture en mode semi-continu, l'alimentation avec une solution de glucose à 500 g/l se fait par paliers lorsque la concentration de glucose devient faible afin de maintenir la concentration en glucose à environ 10 à 20 g/l.

Le pH est régulé à 7,6 pour la souche étudiée pendant toute la fermentation par ajout d'une solution d'ammoniaque 12 N. Pour la culture avec le glutamate comme source de carbone, le pH est contrôlé par un ajout de H₂SO₄ 2 N.

L'oxygène dissous est contrôlé par la variation d'agitation et le débit d'air. Un débit de 60 à 100 l/h est utilisé pendant la culture. L'agitation varie entre 800 à 1500 tours par minute pour les cultures en mode discontinu et semi-continu, mais est fixée à 1200 tours par minute pour les cultures en mode continu. Pendant la production de glutamate, de la mousse apparaît. Son développement est limité par l'ajout de polypropylène glycol.

II.3. Mesure de la concentration en biomasse et en métabolites extracellulaires

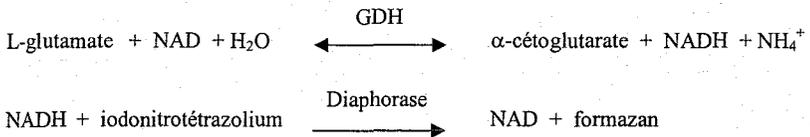
Les échantillons prélevés au cours des fermentations sont rapidement utilisés pour mesurer la biomasse puis sont centrifugés afin d'éliminer celle-ci et de déterminer la concentration des solutés dans le milieu extracellulaire.

II.3.1. Biomasse

L'évolution de la biomasse au cours de la fermentation est suivie par la mesure de la densité optique à 570 nm avec un spectrophotomètre Novaspec II LKB. L'eau distillée est utilisée comme référence. Le coefficient de conversion de DO en concentration de biomasse (g/l) est de 0,4 (Pignot, 1996).

II.3.2. Glutamate

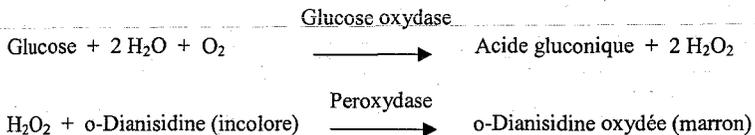
Le glutamate est dosé par un kit enzymatique (r-Biopharm, Roche). Le principe de la réaction colorimétrique est le suivant :



L'apparition du formazan est détectée à 492 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Multiskan MCC/340 Titertek. L'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en glutamate. Une courbe étalon dont la gamme s'étend de 0 à 0,07 g/l de glutamate permet de déterminer la concentration en glutamate des échantillons.

II.3.3. Glucose et vitesse spécifique de consommation de glucose théorique

La concentration du glucose est dosée à l'aide d'un kit enzymatique Sigma (réf. 510). Le dosage a été adapté pour être réalisé en plaque de 96 puits. Le procédé de dosage est basé sur les réactions enzymatiques suivantes :



L'intensité de la couleur marron est mesurée à 450 nm avec un spectrophotomètre Multiskan MCC/340 Titertek. Cette coloration est proportionnelle à la concentration de glucose. Une gamme étalon est effectuée de 0 à 0,4 g/l de glucose.

Les vitesses spécifiques de la consommation de glucose théorique pour la synthèse de la biomasse ou des métabolites extracellulaires (le glutamate, le lactate ou le tréhalose) sont calculées à partir de la vitesse spécifique de croissance ou les vitesses spécifiques de la production de ces métabolites, respectivement, en prenant compte le renouvellement des précurseurs nécessaires (Kuehm, 1996).

La composition de *C. glutamicum* a été analysée (Vallino et Stephanopoulos, 1993). La vitesse de consommation de glucose théorique s'exprime donc :

$$V_{\text{théorique}} = \frac{\mu}{Y_{X/\text{glc}}} + \frac{\pi_{\text{glu}}}{Y_{\text{glu}/\text{glc}}} + \frac{\pi_{\text{lac}}}{Y_{\text{lac}/\text{glc}}} + \frac{\pi_{\text{tré}}}{Y_{\text{tré}/\text{glc}}}$$

Où $V_{\text{théorique}}$ est la consommation théorique totale de glucose. μ , π_{glu} , π_{lac} et $\pi_{\text{tré}}$ sont les vitesses spécifique de croissance et de production de glutamate, de lactate ou de tréhalose respectivement. $Y_{X/\text{glc}}$ (0,597 g/g), $Y_{\text{glu}/\text{glc}}$ (0,816 g/g), $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ (1 g/g) et $Y_{\text{tré}/\text{glc}}$ (0,95 g/g) sont les rendements théoriques de conversion de glucose en biomasse, glutamate, lactate et tréhalose, respectivement.

II.3.4. Acides organiques extracellulaires et tréhalose

Le dosage est réalisé sur une chaîne CLHP Millipore Waters 712. L'utilisation de deux détecteurs permet la détection d'un plus grand nombre de composés retenus par la colonne. Les acides organiques sont détectés par un détecteur UV. Le tréhalose est détecté par un réfractomètre RI.

II.4. Mesure de la contenant en glutamate intracellulaire

Afin de ne pas mélanger le glutamate intracellulaire et le glutamate extracellulaire, les cellules d'un échantillon de 500 μl de milieu de culture sont séparées du milieu extracellulaire par une centrifugation (64.000g, 4°C pendant 5 min) sur 500 μl d'un mélange d'huile (1-bromo-hexadécane et 1-bromo-heptane, densité 1,07 g/ml). Les cellules de densité plus lourde, traversent la couche de l'huile et sont inactivées dans 250 μl d'acide perchlorique 21% (Ishizaki et al., 1995). Après l'élimination du milieu extracellulaire, le glutamate intracellulaire est extrait

des cellules par 3 cycles successifs de congélation à - 20°C et décongélation à 4°C. L'acide perchlorique est neutralisé par ajout de KOH, 5M à 4°C. La neutralisation permet de précipiter le potassium perchlorate. Le glutamate solubilisé est séparé par une centrifugation à 32.000g, à 4°C.

La concentration en glutamate est mesurée par CLHP (Packard 1090). Cette technique nécessite une dérivation de cet acide aminé par l'orthophtaldialdéhyde (OPA) et le 3-mercaptopropionate (Godel et al., 1995).

• Dérivation : à 20°C pendant 1 minute

- 3 µl de tampon borate 0,4 N, pH = 10.
- 1 µl de réactif d'OPA : mélange de 10 mg d'OPA et 10 mg 3-mercaptopropionate dans 1 ml de tampon borate 0,4 N, pH = 10.
- 1 µl d'échantillon contenant du glutamate.

• Colonne : thermostaté à 40°C

- Pré-colonne Hewlett Packard ODS-Hypersil C18 (5 µm, 20 x 2,1 mm).
- Colonne Hewlett Packard ODS-Hypersil (C18, 5 µm, 200 x 2,1 mm).

• Phases mobiles

- A : sodium acétate 20 mM, triéthylamine 0,024% v/v, 0,5% v/v tétrahydroforane, pH = 7,2.
- B : sodium acétate 20 mM, acétonitrile 40% v/v, méthanol 40% v/v, pH = 7,2.
- Gradient des phases mobiles (tableau 3).

Temps, min	% A	% B	Débit ml/min
0	100	0	0,45
17	40	60	0,45
18	0	100	0,45
24	0	100	0,45
25	100	0	0,45

Tableau II-3 : gradient des phases mobiles

- Détection : Les molécules d'acides aminés dérivatisés sortant de la colonne sont détectées à 338 nm. Une gamme de glutamate (0 à 2,5 mM) est utilisée pour déterminer la concentration en glutamate des échantillons analysés.

II.5. Dosage d'activités enzymatiques

La phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC), l'isocitrate déshydrogénase (ICDH) et la glutamate déshydrogénase (GDH) sont dosées avec un spectrophotomètre Beckman DU 290 à partir d'extraits bruts. Ces dosages sont effectués par la mesure soit de l'apparition soit de la disparition à 340 nm du NADH ou NADPH à 30°C. Le coefficient d'absorption du NADH ou du NADPH est $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La pyruvate déshydrogénase (PDH) et l' α -cétoglutarate déshydrogénase (ODHC) sont mesurées à partir d'extraits dessalés. Le coefficient d'absorption de l'APADH à 365 nm (dosage de l'ODHC) et l'INT-formazan (dosage de la PDH) à 500 nm à 30°C sont respectivement $9,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et $12,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.5.1. Préparation des extraits bruts

Les échantillons prélevés au cours de la fermentation sont tout de suite centrifugés à 3.620g pendant 15 min, à 4 °C. Le culot est récupéré et lavé deux fois avec une solution de 2 g/l de KCl. Le culot est alors suspendu dans la solution tampon de tris/acide tricarballique, 15 mM, pH = 7,8, contenant 5 mM de MgCl_2 et 20% de glycérol. Cette suspension est en suite répartie dans des tubes, puis congelées à - 80 °C jusqu'à l'utilisation (au maximum 24 h plus tard). Pour obtenir l'extrait brut, une sonication (40 KHz) est effectuée dans la glace (8 cycles de 30 secondes de sonication avec un intervalle de 1 min qui permet le refroidissement de l'extrait). Après la sonication, l'échantillon est centrifugé à 10.000g, à 4 °C. Le surnageant est utilisé comme extrait brut pour doser l'activité de la PEPC, l'ICDH et la GDH.

II.5.2. Préparation des extraits dessalés

Les extraits pour le dosage de la PDH et l'ODHC sont préparés selon la même méthode que précédemment. Mais, le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon N-Tris (hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoethane sulfonate (TES/NaOH), 100 mM, pH = 7,7, contenant 30 % de glycérol. Les extraits bruts dans ce tampon sont dessalés par passage sur une colonne PD10 (LKB-Pharmacia) à 4°C préalablement équilibrée avec le même tampon TES/NaOH. Les protéines dessalées sont éluées par le même tampon TES/NaOH. La partie protéique dessalée (3 ml) qui se situe dans la fraction entre 3 et 6 ml est utilisée pour le dosage de la PDH et l'ODHC.

II.5.3. Dosage l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC)

La PEPC est dosée par couplage enzymatique avec la malate déshydrogénase. Le phosphoénolpyruvate est carboxylé par la PEPC pour former de l'oxaloacétate et du phosphate inorganique. L'oxaloacétate formé est ensuite transformé en présence de NADH en malate et en NAD par la malate déshydrogénase (MDH). Le suivi de l'oxydation du NADH à 340 nm, à 4°C, permet de mesurer l'activité de la PEPC (figure II-1).

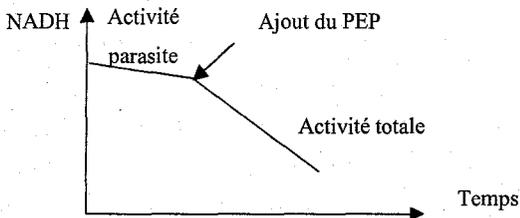
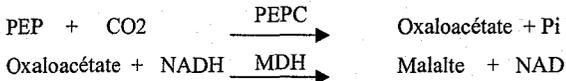


Figure II-1 : suivi du NADH au cours du dosage de l'activité PEPC.

La solution réactionnelle contient :

Tris/HCl, pH = 7,8	100 mM
MnSO ₄	5 mM
K ₂ CO ₃	10 mM
MDH	50 U/ml
Acétyl-CoA	0,1 mM
NADH	0,15 mM
PEP	2 mM

L'activité de la PEPC est la différence entre l'activité totale et l'activité parasite (figure II-1) qui sont mesurées respectivement en présence et en absence de phosphoénolpyruvate dans la solution réactionnelle.

II.5.4. Dosage l'activité de l'isocitrate déshydrogénase (ICDH)

L'ICDH transforme l'isocitrate et le NADP en α -cétoglutarate et en NADPH. Le dosage de l'activité de cette enzyme est effectué par mesure de l'apparition du NADPH, à 340 nm et à 30°C.



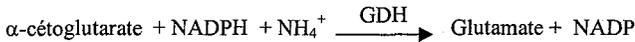
La solution réactionnelle contient :

Tris tri-carballylique (pH =7,8)	12,5 mM
MnCl ₂	0,45 mM
Isocitrate	2,27 mM
NADP	1 mM

L'activité ICDH est la différence de la formation de NADPH entre l'activité totale et l'activité parasite qui sont mesurées respectivement en présence et absence de l'isocitrate.

II.5.5. Dosage l'activité de la glutamate déshydrogénase (GDH)

Le dosage de l'activité de cette enzyme est effectué par mesure de la disparition du NADPH. La glutamate déshydrogénase transforme l' α -cétoglutarate, le NH₄⁺ et le NADPH en glutamate et en NADP.

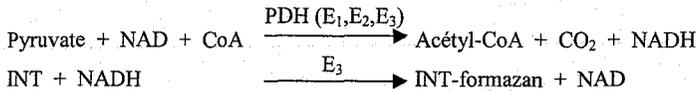


La solution réactionnelle contient :

Tris/tricarballylique (pH =7,8)	12,5 mM
NH ₄ Cl	37,6 mM
α -cétoglutarate	5 mM
NADPH	2,5 mM

L'activité de la GDH est la différence de la disparition de NADPH entre l'activité totale et l'activité parasite qui sont mesurées respectivement en présence et absence de l' α -cétoglutarate.

II.5.6. Dosage de l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH)



La PDH transforme le pyruvate, le NAD et CoA en acétyl-CoA, CO₂ et NADH. Le principe de la mesure est basé sur la méthode de Hinman et Blass (1981). Chez *C. glutamicum*, l'activité de la PDH ne peut pas être déterminée en utilisant l'extrait brut en raison d'effet d'inhibition par les effecteurs. Un extrait dessalé est donc utilisé. Le NADH formé est oxydé en transférant ses électrons sur l'INT par cette même enzyme. L'activité de la PDH est la différence entre l'activité totale et l'activité parasite qui sont mesurées respectivement en présence et en absence de pyruvate.

La solution réactionnelle contient :

Tampon phosphate, pH = 7,80	100 mM
MgCl ₂	5 mM
CoA	0,2 mM
NAD	2 mM
DTT	0,3 mM
BSA	1 mg/ml
TPP	0,2 mM
INT	0,6 mM
Pyruvate	5 mM

II.5.7. Dosage de l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase (ODHC)



L'ODHC transforme l' α -cétoglutarate, le CoA et le NAD en succinyl-CoA, CO₂ et NADH. La méthode de mesure a été mise au point par Shiio et Ujigawa (1980). Comme l'activité de l'ODHC est très faible et est difficile à mesurer en raison d'une forte l'activité parasite, le NAD est remplacé par l'APAD (présentant une structure homologue à celle du NAD). L'APADH

formé est mesuré à 365 nm. La différence entre l'activité totale et l'activité parasite mesurées, respectivement, en présence et en absence d' α -cétoglutarate est l'activité de l'ODHC.

La solution réactionnelle contient :

TES / NaOH (30 % de glycérol) pH = 7,70	100 mM
MgCl ₂	5 mM
CoA	0,2 mM
APAD	1 mM
TPP	0,3 mM
Cystéine	3 mM
α -cétoglutarate	1 mM

II.5.8. Dosage des protéines

Ce dosage a été réalisé sur les extraits bruts et les extraits dessalés afin de connaître leur concentration en protéine afin de déterminer l'activité spécifique des enzymes (en nmol/mn.mg protéine). Nous avons utilisé la méthode de Bradford (1976). Le bleu de coomassie présent dans le réactif de Bradford (Bio-rad n°500-0006) réagit avec les protéines en solution en formant un complexe protéique de couleur bleue qui absorbe la lumière visible à 595 nm. Une gamme étalon est réalisée à partir de concentrations croissantes (de 0 à 1 mg/ml) de sérum albumine bovine (BSA).

II.6. Estimation de la capacité de respiration cellulaire par oxygraphie

La capacité de respiration de la souche bactérienne est mesurée par l'intermédiaire d'une électrode à oxygène (WTW-multiline P4). La mesure est réalisée dans du tampon phosphate (3 g/l Na₂HPO₄, 6 g/l KH₂PO₄, 2 g/l NaCl et 8 g/l (NH₄)₂SO₄, pH = 7,6) contenant 5 g/l de glucose et 0,4 g/l de biomasse. Cette mesure est réalisée à la même température que celle du milieu de culture en bioréacteur avant l'ajout de biomasse. Le milieu de dosage est aéré afin d'obtenir la valeur maximum d'oxygène (environ 7 mg/l). Lorsque l'aération est arrêtée, la consommation d'oxygène est suivie sur un enregistreur. 3 mesures dans des conditions identiques sont réalisées pour chaque échantillon. L'erreur sur cette mesure est de l'ordre de 15%.

II.7. Mesure de la taille cellulaire et du potentiel membranaire

La taille cellulaire et le potentiel membranaire sont mesurés à l'aide d'un cytomètre (Bryte, BioRad). Le logiciel utilisé pour analyser les données est WinBryte développé par BioRad.

II.7.1. Caractéristiques et fonctionnement de l'appareil

Le cytomètre permet de collecter quatre types de signaux : deux signaux de diffusion aux petits et grand angles permettent d'analyser des paramètres physiques des particules (LS1 et LS2) et deux signaux de fluorescence des cellules ou des marqueurs utilisés à deux longueurs d'onde différentes (FL1 et FL2) (figure II-2). Le signal LS1 permet de mesurer la taille cellulaire, tandis que LS2 est considéré comme étant relatif au contenu intracellulaire. Le terme de "granulométrie" est parfois utilisé pour le caractériser.

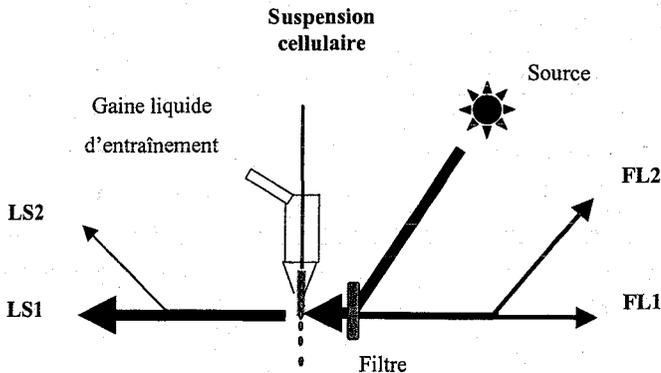


Figure II-2 : principe du fonctionnement de cytomètre.

- Source lumineuse : la lampe mercure/xénon (75 W), arc 1 mm, possédant une forte puissance d'illumination dans le spectre UV/bleu et dont la durée maximum d'utilisation est de 1.000 h.

- Bloc filtre : le bloc filtre (450-2311) contient un filtre d'excitation à des longueurs d'onde variant de 470-490 nm, un filtre dichroïque à 510 nm et un filtre d'émission laissant passer les longueurs d'onde supérieur à 520 nm. Ce filtre est adapté à la mesure du potentiel

membranaire utilisant le DiOC₆(3) comme marqueur ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 520 - 540 \text{ nm}$).

- Acquisition des signaux : cet appareil est équipé avec 4 multiplicateurs 200 - 1 000 volts, amplification de gains linéaires (1 - 50) et amplification log.

- Liquide de gaine : un débit d'eau MilliQ de 0,7 l/h est utilisé pour chaque mesure.

- Débit de l'échantillon : 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ est utilisé dans ce travail.

- Calibration : la calibration est faite systématiquement avant chaque série d'analyses afin de trouver la valeur de référence de LS1, LS2, FL1 et FL2. Des microbilles en polystyrène latex marqué, d'un diamètre de 1,5 μm (BioRad) sont utilisées. La calibration doit permettre d'obtenir les coefficients de variations de diamètre $\text{CV} < 0,7 \%$ et de fluorescence $\text{CV} < 1,5\%$.

II.7.2. Mesure de la taille cellulaire et de l'autofluorescence

Les cellules des échantillons de fermentation sont rapidement diluées dans du tampon phosphate (Na_2HPO_4 3g/l, KH_2PO_4 6g/l, NaCl 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 g/l, $\text{pH} = 7,6$) pour obtenir une concentration cellulaire de 4 à 5 10^6 cellules/ml. La température est maintenue à la température de culture pendant toute la mesure. Trois fois 10.000 événements sont analysés pour chaque échantillon. La taille des cellules et l'autofluorescence cellulaire sont mesurées sur LS1 et FL1 respectivement. L'autofluorescence cellulaire est la référence permettant de calculer le potentiel membranaire.

II.7.3. Mesure du potentiel membranaire

La suspension de bactéries est diluée dans du tampon phosphate (Na_2HPO_4 3g/l, KH_2PO_4 6g/l, NaCl 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 g/l, $\text{pH} = 7,6$) pour obtenir une concentration cellulaire de 4 à 5 10^6 bactéries/ml. 500 μl de cette suspension sont marqués en présence d'une solution DiOC₆(3) (préparée à la concentration de 25 μM dans de l'éthanol 95% v/v) afin d'avoir une concentration finale de 0,1 μM . Le temps de marquage est de 3 min. Une agitation vigoureuse doit être maintenue pendant ce marquage. La température est maintenue à la température de culture afin

de ne pas perturber les cellules. Trois mesures de 10.000 événements sont analysées pour chaque échantillon. Le potentiel membranaire est la différence entre la valeur de la fluorescence des cellules marquées et la valeur de l'autofluorescence.

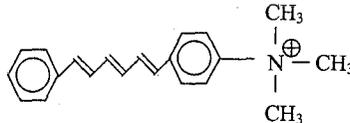
II.8. Mesure de la fluidité membranaire

La fluidité membranaire est un terme subjectif qui décrit le mouvement relatif par diffusion de molécules dans la membrane. Pour caractériser l'état de membrane, les biologistes utilisent préférentiellement le terme "fluidité" au lieu le terme "viscosité" parce qu'il explique la dynamique de la membrane (Vign et al., 1998).

Pour mesurer la fluidité membranaire, on utilise des sondes fluorescentes telles que 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriène (DPH) et 1-(4-(triméthylammonium)-phenyl)-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH) (figure II-3). Le DPH s'incorpore dans tous les milieux lipidiques cellulaires et peut donc caractériser la fluidité moyenne des lipides cellulaires, alors que le TMA-DPH, étant chargé positivement, s'incorpore spécifiquement dans les lipides de la couche externe de l'enveloppe cellulaire (Kuhry et al., 1983). Chez *C. glutamicum*, la couche du lipide externe de l'enveloppe cellulaire est une couche d'acides mycoliques (Eggeling et Sahn, 2001). L'utilisation de sonde TMA-DPH caractériserait donc la fluidité de cette couche d'acide mycolique.



1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriène
(DPH)



1-(4-(triméthylammonium)-phenyl)-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH)

Figure II-3 : sondes fluorescentes utilisées pour la mesure la fluidité.

Lorsque le TMA-DPH est incorporé dans un milieu lipidique tel que l'enveloppe cellulaire, positionné dans un état excitable et est excitée par un photon de la lumière polarisée (photosélectif), il émet de la fluorescence et fait un mouvement "Brownien". La vitesse de ce mouvement de la molécule excitée est dépendante de la viscosité du milieu où la sonde est localisée. Elle suit l'équation Perrin :

$$r_0 / r - 1 = K \cdot \tau / \eta$$

Où r_0 est la valeur d'anisotropie fondamentale (dans du glycérol à -60°C , la valeur d'anisotropie fondamentale du TMA-DPH est de 0,362), r est l'anisotropie de fluorescence, K est la constante, $1/\eta$ correspond à la fluidité du milieu et τ est le temps de vie d'une molécule fluorescente : il dépend du milieu, de la température et de la puissance de la lumière excitatrice. Dans ce travail, les valeurs du τ et η ont pu être mesurées à l'aide d'un spectrofluorimètre (SLM 48000, USA) équipé avec une lampe xénon 450 W pour l'excitation. Les fréquences de modulation de la lumière excitatrice sont de 5 à 90 MHz. L'anisotropie r est, pour sa part, mesurée à l'aide d'un fluofluidimètre. Pendant la mesure d'anisotropie, plusieurs molécules TMA-DPH positionnées dans un état excitable dans le milieu lipidique sont excitées et font alors des mouvements "Browniens", alors que d'autres molécules de TMA-DPH se positionnent et sont excitées les unes après les autres. La valeur d'anisotropie de fluorescence r reste donc stationnaire pendant la mesure. Le principe de mesure de l'anisotropie est décrit dans la figure II-4.

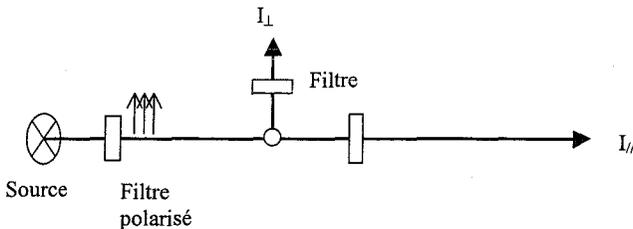


Figure II-4 : principe de mesure de l'anisotropie de fluorescence.

La sonde TMA-DPH incorporée dans l'enveloppe cellulaire est excitée par une lumière polarisée incidente et l'on observe alors le taux de polarisation de la fluorescence émise parallèlement et perpendiculairement. Si le mouvement rotationnel des molécules fluorescentes est faible en raison d'une fluidité faible, l'intensité de la lumière stationnaire polarisée émise en parallèle est conservée, tandis que la lumière stationnaire polarisée émise perpendiculairement est faible. Dans le cas contraire, on constate une diminution ou même une perte totale de l'intensité de la lumière polarisée émise parallèlement. L'anisotropie est calculée par l'équation suivante :

$$r = (I_{//} - G \cdot I_{\perp}) / (I_{//} + 2 \cdot G \cdot I_{\perp})$$

Où $I_{//}$ est la différence de l'intensité de fluorescence polarisée parallèle de cellules marquées avec de la sonde TMA-DPH et celle de cellules non-marquées, I_{\perp} est la différence de l'intensité de fluorescence polarisée perpendiculaire parallèle de cellules marquées et celle de cellules non-marquées, tandis que G est le facteur de correction de l'appareil.

En pratique, la mesure de l'anisotropie de fluorescence représente la fluidité de l'enveloppe cellulaire ou de la membrane lorsque le temps de vie de la molécule fluorescente n'est pas modifié pour les différents milieux lipidiques. Dans le cas contraire, le calcul de $1/\tau$ à partir de la valeur de r et τ sera donc obligatoire afin d'évaluer la fluidité d'un milieu lipidique.

Dans ce travail, la mesure de l'anisotropie a été réalisée à l'aide du fluofluidimètre AFFIBIO. Les échantillons marqués et non-marqués sont excités par la lumière polarisée à 365 nm et les intensités de la fluorescence émises parallèlement et perpendiculairement sont mesurées à 425 nm. Les échantillons de la fermentation sont dilués dans du tampon phosphate (3 g/l Na_2HPO_4 , 6 g/l KH_2PO_4 , 2 g/l NaCl et 8 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH = 7,6) pour obtenir une densité optique de 1 à la longueur d'onde de 570 nm. Ces suspensions cellulaires sont immédiatement congelées à -80°C afin d'éviter la modification de la composition membranaire jusqu'à la mesure de l'anisotropie. Nous avons vérifié l'effet de la congélation sur la mesure de l'anisotropie et aucun effet n'a été obtenu pour 5 mesures de 4 échantillons indépendants. Ces échantillons sont en suite décongelés graduellement et remis à la température de culture. Pour mesurer l'anisotropie, 3 ml d'échantillon sont marqués avec 3 μl de solution TMA-DPH (dissous dans du N,N diméthylformamide pour obtenir la concentration finale de 2 μM) (Molecular Probes, Oregon, USA) pendant 5 min. Il est important de noter que le TMA-DPH n'est fluorescent qu'en milieu lipidique après avoir été excité et que la membrane est saturée en TMA-DPH après 2 minutes de marquage (Bokas, 2002). La température de l'échantillon est rigoureusement vérifiée afin d'éviter des erreurs sur la valeur d'anisotropie mesurée.

CHAPITRE III :
ETUDE CINETIQUE DE
CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM 2262
EN CULTURE CONTINUE

CHAPITRE III : ETUDE CINÉTIQUE DE *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

2262 EN CULTURE CONTINUE

La première partie est consacrée à une analyse cinétique de *C. glutamicum* thermo-inductible en culture continue dans le domaine de température de 33 à 39°C. Les objectifs fixés sont:

- d'étudier la possibilité de maintenir une production prolongée de glutamate par une mise en œuvre en continu de la fermentation,
- de comparer le comportement cinétique de la souche en culture continue avec celui observé en culture semi-continue,
- d'exploiter les données cinétiques en culture continue pour mieux comprendre et maîtriser les processus contrôlant les transitions métaboliques de *C. glutamicum* entre l'état de croissance et celui d'excrétion de glutamate.

Pour ces cultures continues le milieu de culture utilisé contient un excès de biotine (2 mg/l) et une concentration relativement faible de 15 g/l de glucose afin de mettre en œuvre les cultures en limitation de glucose. Le taux de dilution appliqué entre 0,025 et 0,5 h⁻¹, a permis une analyse du métabolisme cellulaire dans un domaine élargi de vitesse spécifique de croissance des cellules, correspondant à la fois à la phase de croissance et la phase de production de la fermentation glutamique.

Dans un premier temps des cultures continues seront présentées aux températures de 33, 37 et 39°C et l'influence du taux de dilution sera décrit sur les principales caractéristiques cinétiques et physiologiques de la souche : la croissance cellulaire, la consommation de glucose, la production de glutamate, de lactate et de tréhalose, le contenu intracellulaire de glutamate, le potentiel membranaire et la taille cellulaire (figure III-1).

Dans un second temps la cinétique à 39°C de *C. glutamicum* sera comparée en culture continue et semi-continue, et une analyse globale de la régulation de la croissance et du métabolisme cellulaire sera proposée.

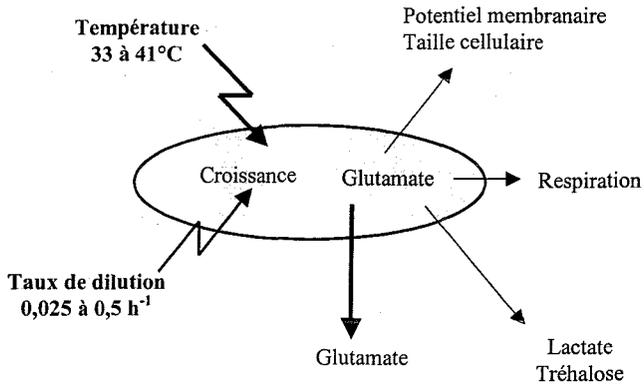


Figure III-1 : représentation schématique d'études cinétiques et physiologiques réalisées sur *C. glutamicum* en culture continue.

III.1. Etude cinétique de *C. glutamicum* en procédé continu à 33°C

Une première fermentation est démarrée par une culture discontinue sur un milieu contenant 15 g/l de glucose. Après 8 heures de culture, lorsque le niveau de glucose devient inférieur à 1 g/l, le fermenteur est alimenté en continu par un milieu contenant 15 g/l de glucose à une vitesse de dilution de 0,05 h⁻¹ (correspondant à un temps de passage de 20 h). La vitesse de dilution est successivement augmentée à 0,1 h⁻¹ après 100 h (temps de passage de 10 h), puis à 0,15 h⁻¹ à 175 h (temps de passage de 7 h). Une seconde culture est démarrée en discontinu sur un milieu à 15 g/l de glucose. L'alimentation en continue est mise en route à une vitesse de dilution de 0,3 h⁻¹ après 8 h (temps de passage de 3,3 h) pendant 19 h, puis de 0,5 h⁻¹ (temps de passage de 2 h) pendant 10 h. La régime permanente est obtenue après 5 temps de passages.

Pour ces deux cultures les variations mesurées au cours du temps de la composition du milieu, de la concentration intracellulaire de glutamate et du potentiel de membrane sont montrées dans les figures III-2 et III-3. Dans la figure III-4 sont reportées les valeurs stabilisées des grandeurs cinétiques et physiologiques en fonction du taux de dilution.

• Croissance cellulaire

Aux 5 vitesses de dilution étudiées, on observe, après une durée de quelques temps de passage, une stabilisation de la culture continue. La vitesse de croissance mesurée de la souche est alors égale à la vitesse de dilution. Dans tous les cas le niveau de glucose demeure très faible (inférieur à 0,01 g/l), tandis que la concentration stabilisée de biomasse augmente de 5,8 à 10 g/l avec les taux de dilution entre 0,05 et 0,5 h⁻¹. Une augmentation du rendement de conversion de glucose en biomasse de 0,38 à 0,65 g/g est observée pour des taux de dilution étudiés.

• Consommation de glucose

La vitesse de consommation de glucose augmente de 0,13 à 0,8 g/g.h avec le taux de dilution. L'extrapolation à taux de croissance nul donne une vitesse spécifique de consommation de glucose pour la maintenance de 0,06 g/g.h. Ce résultat suggère qu'aux faibles taux de dilution la vitesse de

consommation de glucose pour la maintenance représente un pourcentage important (près de 50 % pour le taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$) de la vitesse d'apport du glucose dans le milieu de culture. Il peut ainsi expliquer la diminution observée aux faibles taux de dilution du rendement de conversion de glucose en biomasse.

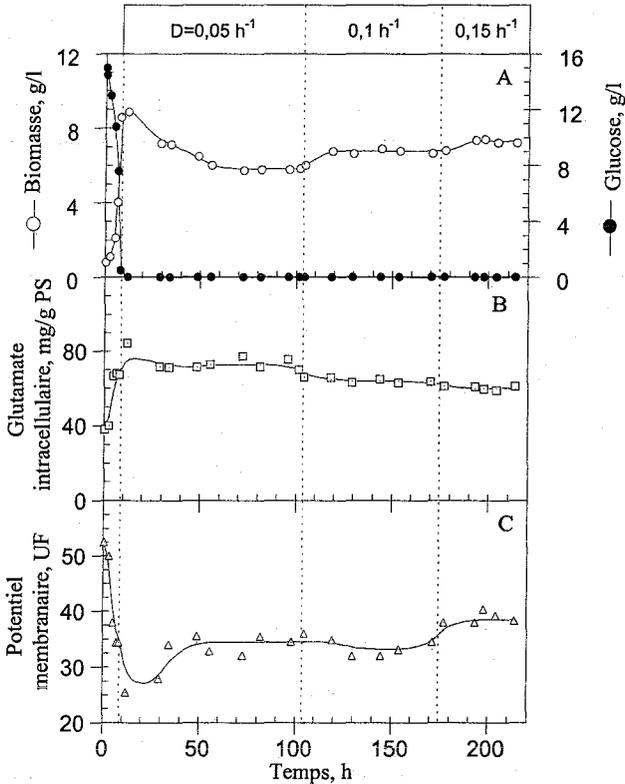


Figure III-2 : cinétiques au cours de temps de culture continue de *C. glutamicum* à 33°C et à taux de dilution de $0,05$ à $0,15 \text{ h}^{-1}$.

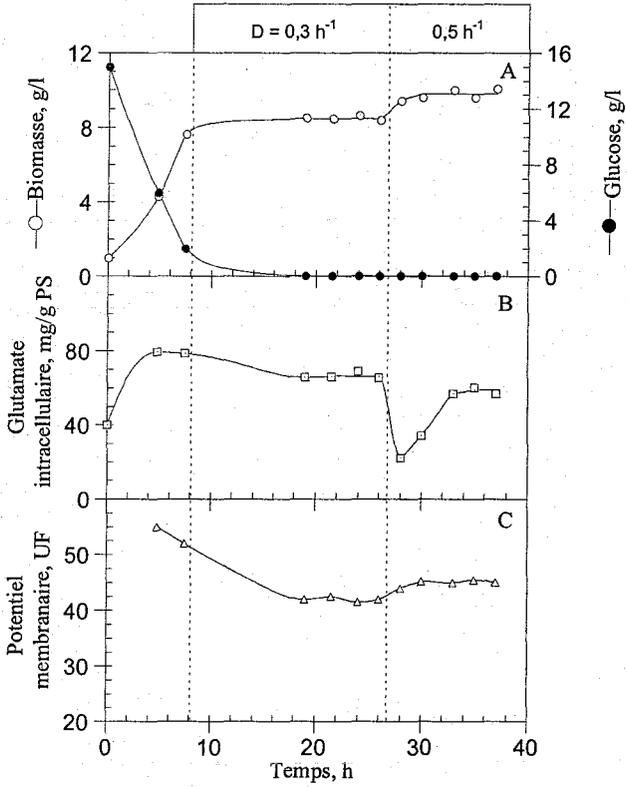


Figure III-3 : cinétiques au cours de temps de culture continue de *C. glutamicum* à 33°C et à taux de dilution de $0,3$ et $0,5 \text{ h}^{-1}$.

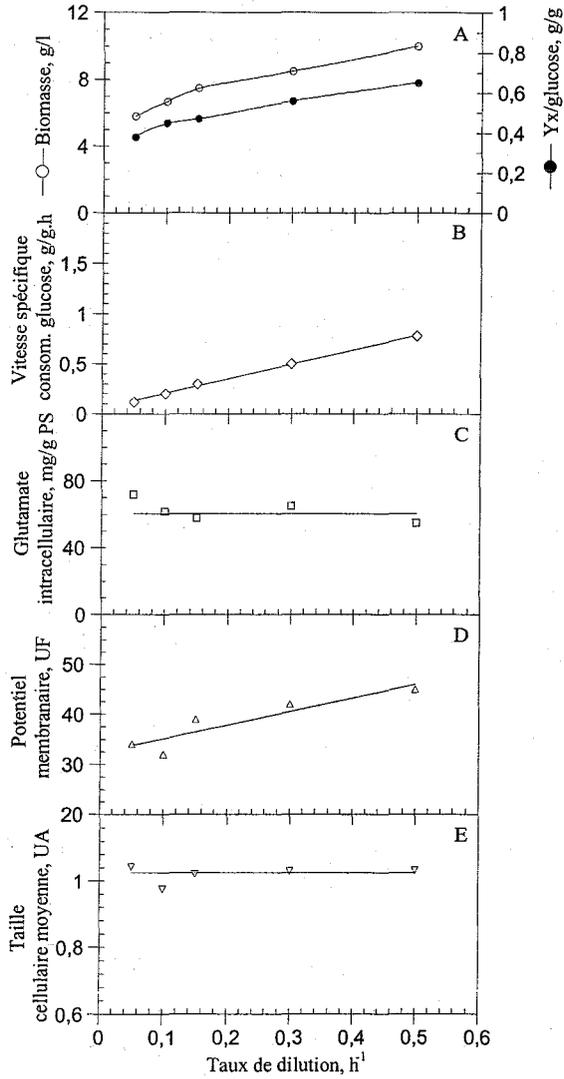


Figure III-4 : effet du taux de dilution sur des cinétiques de *C. glutamicum* à l'état équilibre à 33°C.

- **Excrétion de métabolites**

Dans aucune des conditions nous n'avons observé d'excrétion de glutamate, lactate ou tréhalose dans le milieu à 33°C.

- **Accumulation du glutamate intracellulaire**

Au cours des deux cultures continues le niveau de glutamate intracellulaire demeure relativement stable à un niveau élevé proche de la valeur mesurée pendant la culture à 33°C en présence abondant de glucose. Il semble diminuer légèrement lorsque le taux de dilution croît de 0,05 à 0,5 h⁻¹. Ceci pourrait être dû à une demande accrue de glutamate intracellulaire pour la synthèse de biomasse aux plus fortes vitesses de croissance.

- **Potentiel membranaire**

Le potentiel membranaire, mesuré par cytométrie en flux, augmente linéairement de 34 à 46 unités de fluorescence lorsque le taux de dilution, et donc la vitesse spécifique de croissance, passe de 0,05 à 0,5 h⁻¹.

- **Taille des cellules**

Aucune modification de la taille moyenne cellulaire, mesuré par cytométrie de flux, n'a été mise en évidence aux différents taux de dilution testés à 33°C.

III.2. Etude cinétique de *C. glutamicum* en procédé continu à 37°C

Deux cultures continues ont été réalisées à 37°C, à 4 taux de dilution entre 0,025 et 0,3 h⁻¹. Nous avons suivi, comme pour les cultures à 33°C, les paramètres suivants : la biomasse, le glucose, le glutamate, le lactate, le tréhalose, le glutamate intracellulaire, le potentiel membranaire et la taille cellulaire. Les évolutions au cours du temps de ces grandeurs sont montrées dans les figures III-5 et

III-6. La figure III-7 rapporte les valeurs stabilisées des grandeurs cinétiques et physiologiques en fonction du taux de dilution. La régime permanente est atteinte après 5 temps de passages.

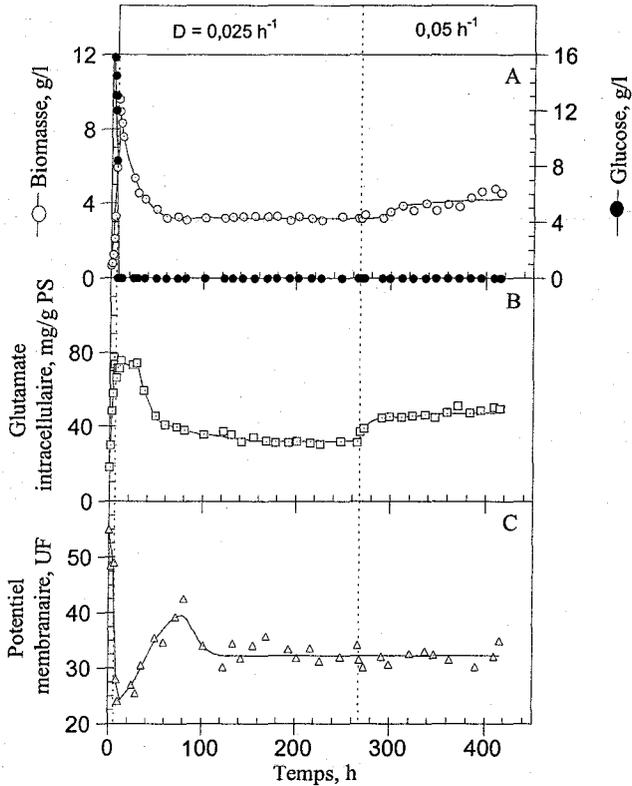


Figure III-5 : cinétiques au cours de temps de culture continue de *C. glutamicum* à 37°C et à taux de dilution de 0,025 et 0,05 h⁻¹.

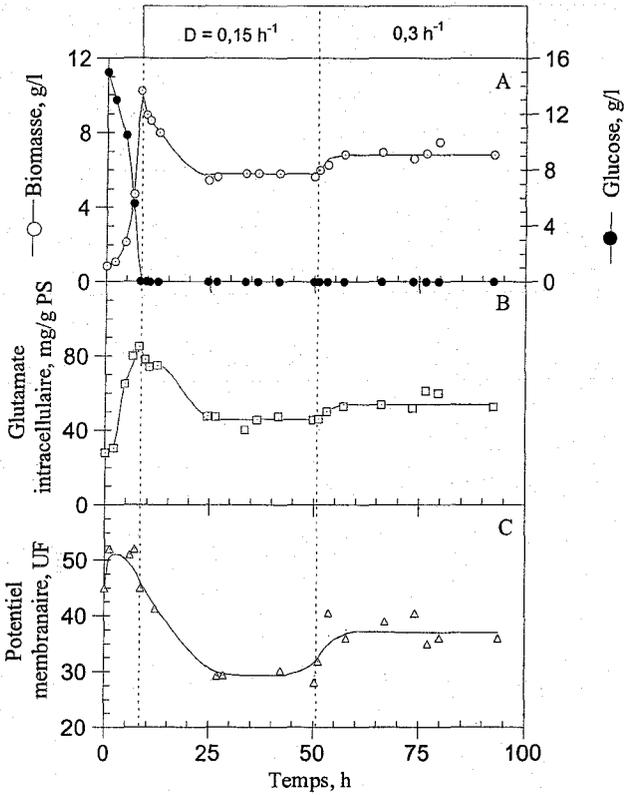


Figure III-6 : cinétiques au cours de temps de culture continue de *C. glutamicum* à 37°C et à taux de dilution de 0,15 et 0,3 h⁻¹.

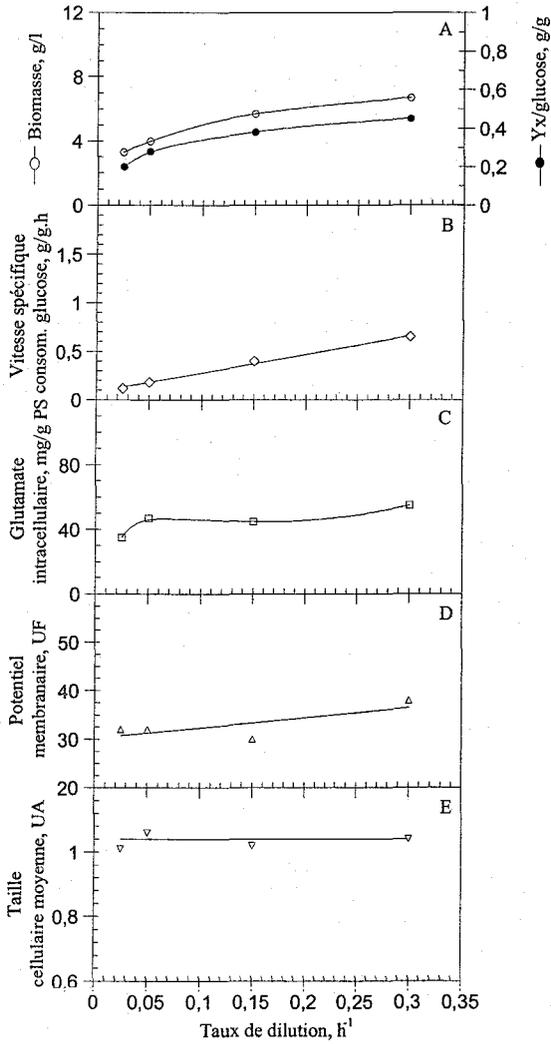


Figure III-7 : effet du taux de dilution sur des cinétiques de *C. glutamicum* à l'état équilibre à 37°C.

• **Croissance cellulaire**

Les deux cultures atteignent une régime permanente après environ 5 temps de passage pour les taux de dilution étudiés entre 0,025 et 0,3 h⁻¹, les vitesses spécifiques de croissance devenant alors égales aux taux de dilution imposés. La concentration de biomasse et le rendement de conversion de glucose en biomasse augmentent, respectivement, de 3,2 à 5,2 g/l et de 0,2 à 0,45 g/g avec l'augmentation du taux de dilution de 0,025 à 0,3 h⁻¹.

• **Consommation de glucose**

Le glucose est totalement pendant toute la culture en mode continu. La vitesse spécifique de consommation de glucose augmente de 0,12 à 0,63 g/g.h avec le taux de dilution. A cette température de 37°C, la vitesse spécifique de consommation de glucose pour la maintenance, extrapolée à croissance nulle, est de 0,085 g/g.h.

• **Excrétion de métabolites**

Le glutamate est produit très faiblement à 37°C (0,2 g/l au taux de dilution 0,3 h⁻¹) et négligeable pour les autres taux de dilution. Aucune excrétion de lactate ou de tréhalose n'est détectée.

• **Accumulation du glutamate intracellulaire**

Le glutamate intracellulaire est maintenu à un niveau assez élevé d'environ de 50 mg/g biomasse sèche pour les taux de dilution entre 0,05 et 0,3 h⁻¹.

• **Potentiel membranaire**

Le potentiel membranaire augmente de 32 à 40 UF avec l'augmentation du taux de dilution de 0,025 à 0,3 h⁻¹.

• Taille des cellules

La taille moyenne de cellules, quel que soit le taux de dilution, reste constante 1,1 UA (unité arbitraire) en culture continue à 37°C et à taux de dilution de 0,025 à 0,3 h⁻¹.

III.3. Etude cinétique de *C. glutamicum* en procédé continu à 39°C

Les fermentations sont démarrées de manière discontinue à 33°C sur un milieu à 15 g/l de glucose. Après 4 à 8 h, lorsque le glucose est pratiquement consommé, la culture est alimentée en continue par un milieu à 15 g/l de glucose et la température est élevée à 39°C. Les cinétiques ont été étudiées pour 4 cultures continues:

- Une culture à une vitesse de dilution de 0,1 h⁻¹.
- Trois cultures à une vitesse de dilution de 0,05 h⁻¹, destinées à vérifier la reproductibilité des résultats obtenus.

Pour la culture à taux de dilution de 0,1 h⁻¹, une élévation de température de 33 à 39°C provoque chez *C. glutamicum* 2262 une excrétion de glutamate, qui en culture continue est maintenue pendant une période de 50 h. Cependant la souche a un taux de croissance très faible en limitation de glucose, ce qui provoque son lessivage du fermenteur.

III.3.1. Etude cinétique de la culture continue de *C. glutamicum* à 39°C et un taux de dilution de 0,05 h⁻¹

Pour l'une des trois cultures effectuées à un taux de dilution de 0,05 h⁻¹, les variations mesurées au cours du temps des concentrations de biomasse, de glucose, de glutamate, de lactate et de tréhalose dans le milieu, ainsi que les vitesses spécifiques correspondantes de production et de consommation sont montrées dans la figure III-8. Dans la figure III-9 sont indiquées les variations au cours du temps des rendements de conversion de glucose en biomasse et glutamate, de la concentration intracellulaire de glutamate, de la taille moyenne des cellules, et de la vitesse spécifique de

respiration. Pour les deux autres cultures au même taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$, les résultats sont montrés en Annexes 1.

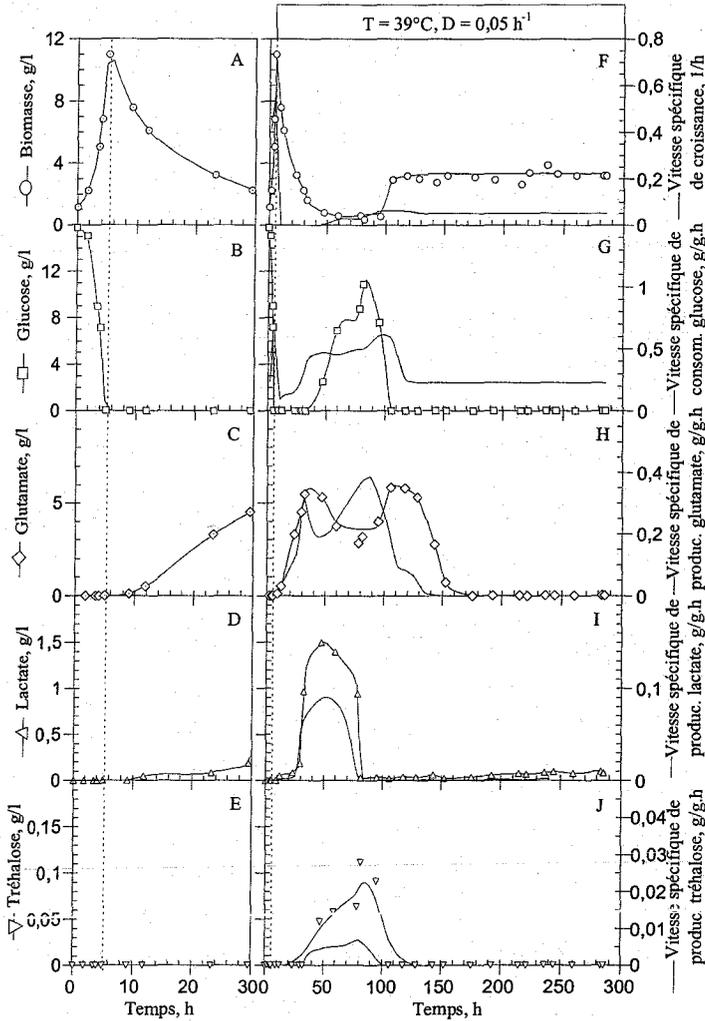


Figure III-8 : cinétiques de *C. glutamicum* en culture continue à 39°C et à taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$.

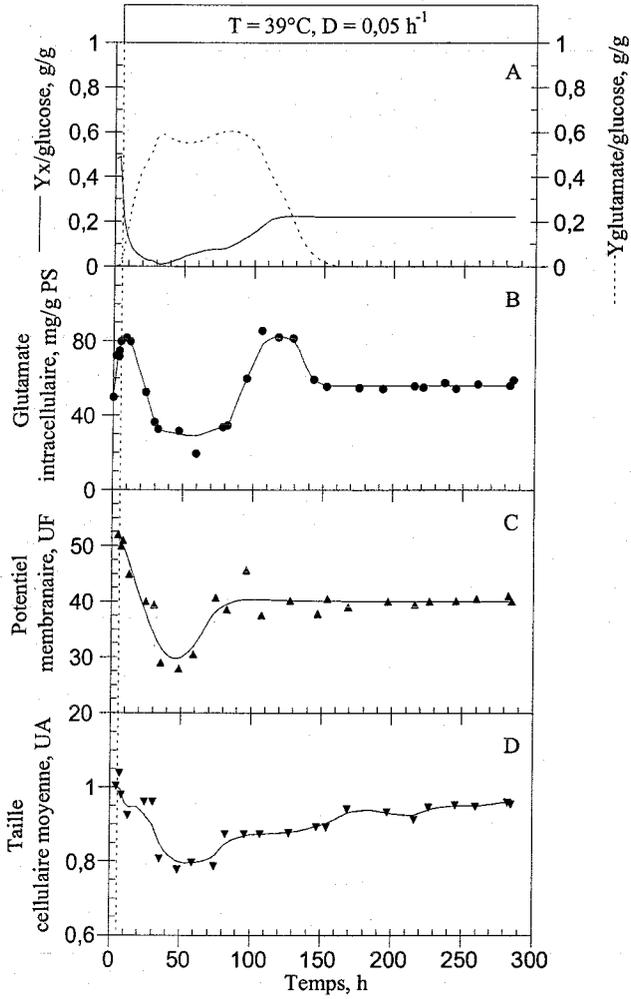


Figure III-9 : cinétiques de *C. glutamicum* en culture continue à 39°C et à un taux de dilution de 0,05 h⁻¹.

• **Croissance cellulaire**

L'augmentation de la température de 33 à 39°C provoque un arrêt quasi-instantané de la croissance cellulaire. Dans ces conditions la biomasse, qui atteint 10 g/l en fin de culture discontinuée à 33°C, est d'abord progressivement lessivée sur une période de 50 h pour atteindre 1 g/l. Dans un second temps on observe un redémarrage de la vitesse de croissance cellulaire qui se stabilise à une valeur de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Ceci résulte en une remontée de la concentration de biomasse qui atteint un niveau stable de 3,2 g/l après 110 h de culture. Dans ces conditions le rendement de conversion de glucose en biomasse, qui est de 0,5 g/g en fin de la culture initiale à 33°C, atteint un niveau plus faible de 0,22 g/g.

• **Consommation de glucose**

Durant les 30 premières heures de culture continue, le niveau de glucose est pratiquement nul. A partir de 40 h on observe une montée jusqu'à 10 g/l du niveau de glucose résiduel, qui coïncide avec le niveau faible de biomasse dans le fermenteur. Après 90 h, quand le niveau de biomasse augmente, la concentration de glucose diminue à nouveau et se stabilise à un niveau très faible pour le restant de la culture. Durant la même période la vitesse spécifique de consommation de glucose augmente puis diminue en même temps que la concentration de glucose. Elle se stabilise à 0,22 g/g.h en fin de culture.

• **Excrétion de glutamate**

L'excrétion de glutamate commence 2 h après le choc de température. La concentration de glutamate augmente jusqu'à 6 g/l sur la période de 10 à 35 h et puis diminue à 4 g/l à 95 h. De 100 h à 120 h, la concentration de glutamate remonte à 6 g/l, puis retombe définitivement pour le reste de la culture. Cette variation de la concentration de glutamate résulte du fait que la vitesse spécifique de production de glutamate augmente après le choc de température pour atteindre un maximum de 0,4 g/g.h à 30 h. Dans un second temps elle diminue puis remonte pour atteindre un second maximum de 0,4 g/g.h à 90 h. Par la suite la vitesse diminue progressivement jusqu'à s'annuler après 130 h.

• **Excrétion de lactate**

Le lactate est produit à partir de 10 h avec une vitesse spécifique de production relativement faible de l'ordre de 0,01 g/g.h. La vitesse augmente ensuite jusqu'à 0,1 g/g.h à 50 h avant de retomber à des valeurs proches de celle mesurée initialement. Il est intéressant de noter que l'excrétion de lactate est la plus intense pendant la période de la culture continue où la croissance est très faible et où le glucose est présent en excès dans le milieu de culture. Dans ces conditions la concentration maximale de lactate excrétée est de 1,5 g/l à 50 h.

• **Excrétion de tréhalose**

Une faible excrétion de tréhalose est observée sur la période de 35 à 100 h. La concentration maximale de tréhalose excrétée est de 0,1 g/l à 90 h, correspondant à une vitesse spécifique maximale de production de 0,005 g/g.h. On peut noter que le tréhalose est excrété lorsque la concentration de glucose est la plus élevée dans le milieu de culture. En forte limitation de glucose, au contraire, les cellules n'excrètent pas de tréhalose.

• **Glutamate intracellulaire**

Le glutamate intracellulaire présente un niveau de 80 mg/g lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance à 33°C. Après le choc de température, le glutamate intracellulaire diminue pour atteindre environ 30 mg/g après 30 h. Dans un second temps le glutamate intracellulaire remonte transitoirement à 80 mg/g puis se stabilise à 60 mg/g à partir de 140 h.

• **Potentiel membranaire**

Le potentiel membranaire moyen des cellules diminue après le choc température de 52 à 30 UF (unité de fluorescence) sur la période de 10 à 35 h. A partir de 50 h, le potentiel membranaire remonte à 40 et se stabilise à ce niveau pour les dernières heures de culture.

• Taille cellulaire

La taille moyenne des cellules, qui est de 1,1 UA (unité arbitraire) en culture discontinue à 33°C, diminue après le choc de température en culture continue à 0,8 UA sur l'intervalle de temps entre 10 et 75 h. La taille augmente ensuite progressivement jusqu'à une valeur proche de la valeur initiale. Part cytométrie de flux nous avons aussi déterminé l'évolution au cours du temps de la distribution des tailles des cellules de *C. glutamicum* en culture continue (figure III-10).

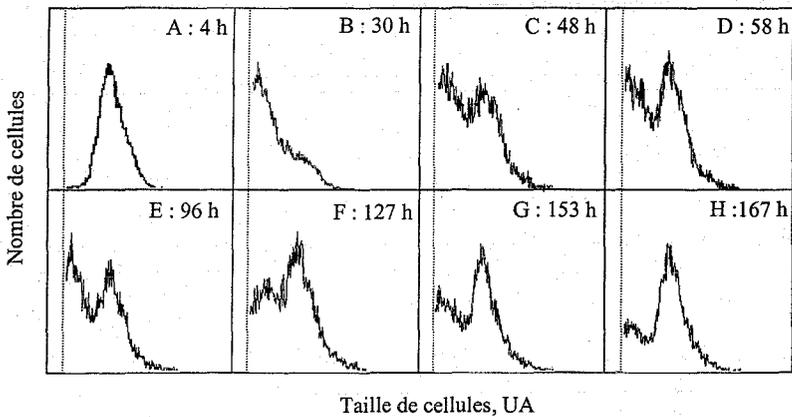


Figure III-10 : évolution de la taille cellulaire au cours de culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹.

En fin de phase de croissance à 33°C, les cellules ont toutes une grande taille. Après l'augmentation de la température à 39°C, on observe une diminution de taille pour la grande majorité des cellules. Néanmoins une faible proportion semble conserver la taille initiale. Après 50 h de culture, la proportion des cellules de grande taille croît progressivement pour devenir prépondérante en fin de culture.

III.3.2. Interprétations des cinétiques de cultures continues de *C. glutamicum* à 39°C et à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$

La culture continue à 39°C et à un taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$ a montré un comportement cinétique intéressant. Elle est notamment caractérisée par une diminution puis une remontée du niveau de cellules, une montée transitoire du glucose dans le milieu de culture, une excrétion durant une centaine d'heures de glutamate, de lactate et de tréhalose, ainsi que par deux augmentations et diminutions successives de la vitesse d'excrétion de glutamate. Ces caractéristiques cinétiques de *C. glutamicum* en culture continue ont été confirmées par les résultats de deux expériences supplémentaires effectuées au même taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$ et à la même température à 39°C. Dans cette partie nous proposons une interprétation des phénomènes observés.

• Comportement dynamique de la concentration cellulaire

Après le passage de 33 à 39°C, la première phase de diminution de la concentration en biomasse, qui est similaire à celle observée au taux de dilution de $0,1 \text{ h}^{-1}$, résulte d'un phénomène de lessivage des cellules du fermenteur continu. En effet, les cellules à 39°C, et en forte limitation de glucose ont une vitesse spécifique de croissance inférieure au taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$. En conséquence, elles sont progressivement lessivées sur une durée de 20 h à taux de dilution de $0,1 \text{ h}^{-1}$.

Pendant la culture à 39°C et à taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$, la remontée dans un second temps de la concentration cellulaire peut être expliquée par une colonisation de la culture continue par une population cellulaire possédant de meilleures propriétés de croissance. L'étude de la distribution des tailles de cellules montre qu'au moment du choc de température, si la grande majorité des cellules de *C. glutamicum* sont transformées en cellules excrétrices ayant une plus petite taille, une très faible proportion des cellules conservent une grande taille et pourrait donc ne pas être transformées en cellules excrétrices. Ces cellules résistantes au choc de température, non excrétrices de glutamate, seraient aussi caractérisées par une vitesse spécifique de croissance supérieure à celle des cellules excrétrices. En limitation de glucose en culture continue à 39°C, la vitesse spécifique de croissance des cellules résistantes demeure probablement inférieure à $0,1 \text{ h}^{-1}$. Par conséquent, au cours d'une

culture continue à une vitesse de dilution de $0,1 \text{ h}^{-1}$, ces cellules sont lessivées en même temps que les cellules excrétrices. Mais si dans les conditions de culture leur vitesse spécifique de croissance est supérieure à $0,05 \text{ h}^{-1}$, ces cellules peuvent progressivement se développer dans une fermentation continue à un taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Les cellules excrétrices étant lessivées, on assiste à une colonisation de la culture continue, sur une centaine d'heures, par les cellules résistantes au choc de température.

En conséquence la variation au cours du temps du niveau cellulaire au faible taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$ peut être interprétée comme une compétition dynamique en système continu de deux souches excrétrices et non-excrétrices de *C. glutamicum* possédant des taux de croissance différents, respectivement inférieures et supérieures au taux de dilution.

• Dynamique du comportement excréteur de glutamate à 39°C et à taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$

Pour l'interprétation du comportement dynamique de la concentration de glutamate dans le milieu, comprenant deux montées et descentes successive, nous proposons un phénomène de compétition métabolique entre la production de glutamate et de lactate chez les cellules excrétrices. En d'autres termes, lorsque les cellules synthétisent et excrètent du lactate, elles disposent de moins de glucose pour la synthèse de glutamate. Pour conforter cette hypothèse, nous avons calculé les besoins en glucose pour la synthèse des différents composés présents dans le milieu de culture à chaque instant du procédé continu réalisé à 39°C et à taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Les résultats sont montrés dans la figure III-11 et en annexes 1 pour les deux autres cultures. Sur la figure III-11, la vitesse spécifique mesurée de consommation du glucose monte progressivement jusqu'à $0,5 \text{ g/g.h}$ après le choc de température, puis diminue pour se stabiliser à $0,25 \text{ g/g.h}$.

Nous avons ensuite déterminé les vitesses spécifiques théoriques d'utilisation du glucose pour la formation de biomasse et de métabolites excrétés (Matériel et Méthodes). La vitesse spécifique de consommation du glucose pour la croissance est calculée comme le produit de la vitesse spécifique

de croissance et de la demande théorique de glucose pour la synthèse de biomasse, estimée à 1,67 g glucose par 1 g biomasse.

La vitesse spécifique de consommation du glucose pour la synthèse de glutamate est calculée comme le produit de la vitesse spécifique d'excrétion de glutamate et de la demande théorique de glucose pour la synthèse de glutamate, estimée à 1,22 g glucose par 1 g glutamate. De même la vitesse spécifique de consommation du glucose pour la synthèse de lactate est calculée comme le produit de la vitesse spécifique d'excrétion de lactate et de la demande théorique de glucose pour la synthèse de lactate, estimée à 1 g glucose par 1 g lactate.

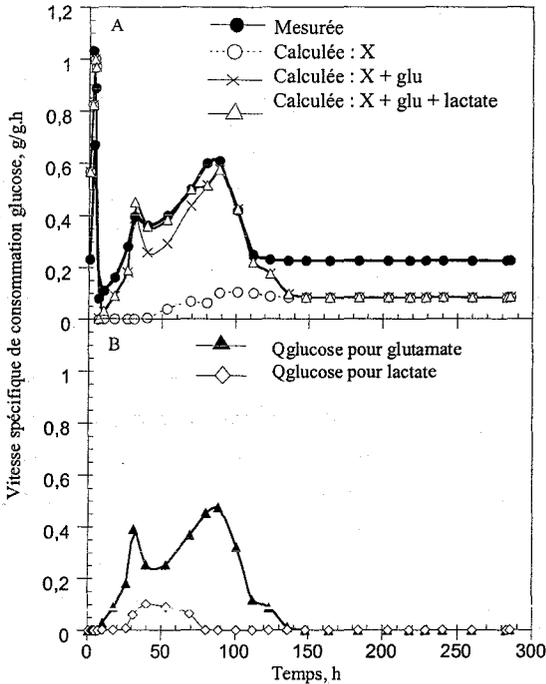


Figure III-11 : comparaison de la vitesse spécifique de consommation de glucose théorique (calculée) et celle mesurée de cellules cultivées à 39°C et à taux de dilution 0,05 h⁻¹.

Sur la figure III-11 est reportée la vitesse théorique globale d'utilisation du glucose, calculée comme la somme des vitesses théoriques de consommation du glucose pour la synthèse de biomasse, de glutamate et de lactate. La contribution de l'excrétion du tréhalose à la demande de glucose est considérée comme négligeable du fait de la faible valeur de la vitesse spécifique d'excrétion du tréhalose.

On observe que durant les 110 premières heures de la culture continue (période durant laquelle le glutamate est excrété), la vitesse théorique globale d'utilisation de glucose est, aux incertitudes expérimentales près, identique à la vitesse spécifique mesurée de consommation de glucose. Ce résultat vient conforter l'approche de la décomposition de la vitesse globale de consommation du glucose en contributions individuelles pour la synthèse de biomasse et de métabolites excrétés. Dans la dernière phase de la culture continue, caractérisée par le développement des cellules résistantes non-excrétrices, la vitesse théorique calculée de 0,08 g/g.h est très inférieure à la vitesse spécifique mesurée de consommation du glucose de 0,23 g/g.h. Cette différence peut être attribuée à une contribution supplémentaire de consommation de glucose pour la maintenance, voisine de 0,15 g/g.h, qui est particulièrement élevée pour ces cellules résistantes.

D'autre part, pendant la phase d'excrétion des métabolites (entre 20 et 60 h), la synthèse de lactate provoque une déviation du flux de glucose, qui sera par conséquent moins disponible pour la synthèse de glutamate. En conséquence, nous pouvons postuler que dans un environnement donné la cellule excrétrice possède une capacité maximale de consommation du glucose qui est notamment déterminée par le niveau de glucose dans le milieu de culture. Et dans ces conditions l'utilisation d'une partie du glucose pour la synthèse et l'excrétion du lactate réduit le flux de glucose disponible pour la synthèse de glutamate.

III.3.3. Culture en discontinu des cellules sélectionnées en fin de la culture continue à 39°C

Afin de vérifier les caractéristiques métaboliques des cellules qui ont finalement colonisé la culture continue au taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$, nous avons ajouté en fin de culture une solution de glucose préalablement chauffée à 39°C et réalisé une fermentation discontinue sur une période de 10 h. Les

variations mesurées au cours du temps des concentrations de biomasse, de glucose et de glutamate sont montrées figure III-12.

Le glucose, initialement à une concentration de 22 g/l, est rapidement consommé en 4 h. Dans le même temps, la concentration de biomasse augmente de 3 à 8 g/l. Ce qui correspond à un rendement de conversion du glucose en biomasse de 0,22 g/g, valeur identique à celle trouvée pour ces cellules en fin de culture continue. Après l'ajout de glucose discontinu le glutamate n'est que très faiblement excrété à moins de 1 g/l. Le glutamate du milieu est par la suite re-consommé par les cellules lorsque le glucose est épuisé. A noter que le glutamate intracellulaire demeure à un niveau élevé de 60 mg/g.

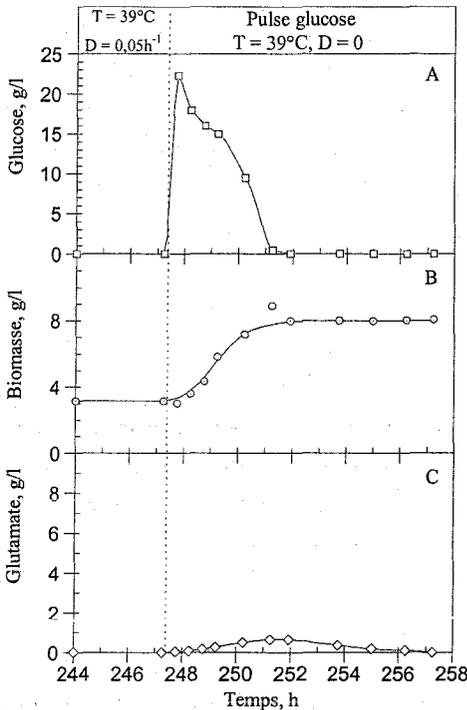


Figure III-12 : effet de glucose sur la cinétique des cellules sélectionnées de la culture continue à 39°C et à taux de dilution de $0,05\text{ h}^{-1}$.

En conséquence le comportement cinétique après l'ajout d'une quantité de glucose confirme que les cellules sélectionnées en fin de culture continue à 39°C ont en grande partie perdue la capacité d'excrétion du glutamate à cette température.

III.3.4. Culture en continu aux températures de 39°C et 41°C à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ des cellules sélectionnées en fin de la culture continue à 39°C à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$

Dans une expérience supplémentaire, les cellules non productrices sélectionnées ont été recultivées en continu à une faible vitesse de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$ en limitation de glucose. La culture est démarrée en discontinu à 33°C avec 15 g/l de glucose initial. La culture continue est ensuite maintenue à 39°C pendant 120 h, puis à 41°C jusqu'à 180 h. Les évolutions mesurées au cours du temps des concentrations de substrats et de produits, des vitesses spécifiques de consommation et production, des rendements de conversion et du glutamate intracellulaire sont montrées dans les figures III-13 et III-14.

• Croissance cellulaire

Après l'augmentation de la température de 33 à 39°C, la vitesse spécifique de croissance dans un premier temps baisse de $0,55 \text{ h}^{-1}$ jusqu'à une valeur proche de $0,015 \text{ h}^{-1}$, puis remonte progressivement pour atteindre $0,05 \text{ h}^{-1}$, la valeur du taux de dilution. Dans le même temps, la biomasse diminue de 11 g/l à une valeur stable voisine de 4 g/l. Dans ces conditions le rendement de conversion de glucose en biomasse est près de 0,2 g/g, identique que celle obtenue précédemment pour ces cellules. Lorsqu'à 160 h la température de culture est augmentée à 41°C, la croissance s'arrête progressivement, et la biomasse est lessivée du fermenteur.

• Consommation de glucose

Pendant la culture continue le glucose demeure à un niveau très faible d'environ 0,02 g/l et la vitesse spécifique de consommation se stabilise à 0,2 g/g.h. L'augmentation de la température à 41°C,

entraîne une augmentation de la vitesse de consommation de glucose jusqu'au lessivage final des cellules.

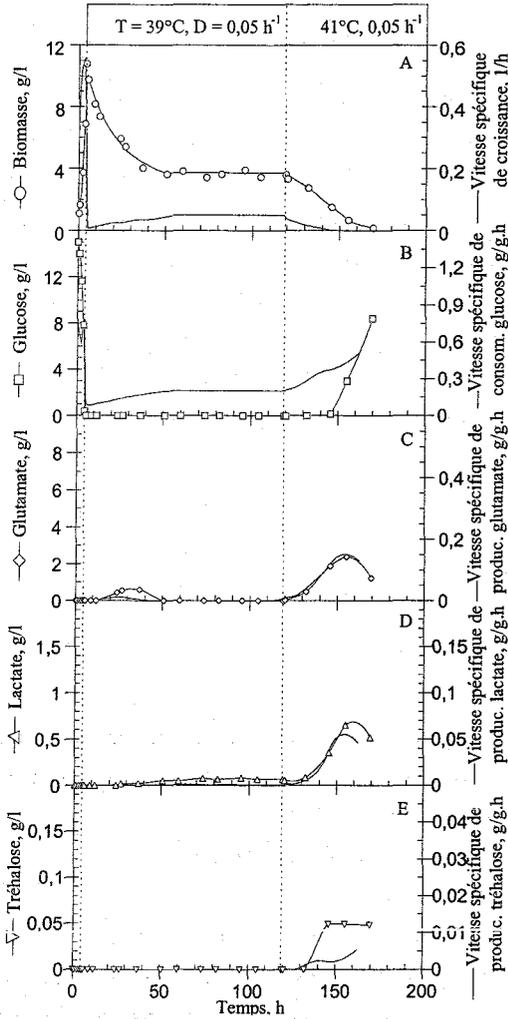


Figure III-13 : cinétiques en culture continue à 39 et 41°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹ des cellules sélectionnées de la culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹.

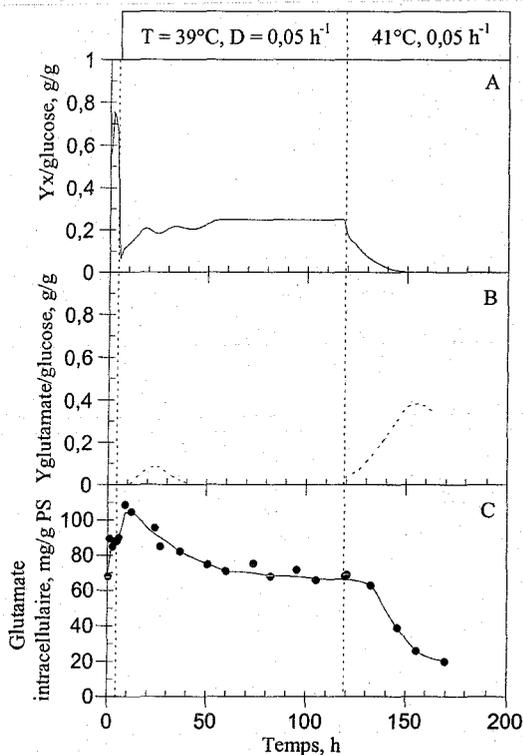


Figure III-14 : cinétiques en culture continue à 39 et 41°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹ des cellules sélectionnées de la culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹.

• Excrétion de glutamate, du lactate et du tréhalose

Durant la culture à 39°C les excrétions de glutamate, lactate et tréhalose demeurent négligeables. Le passage à 41°C, par contre, entraîne une excrétion des trois métabolites qui atteignent des concentrations maximales de 2 g/l pour le glutamate, 0,5 g/l pour le lactate et 0,05 g/l pour le tréhalose. Le glutamate est ainsi produit à une vitesse spécifique relativement faible de 0,15 g/g.h avec un rendement maximum de 0,4 g/g. La production de lactate apparaît pendant l'arrêt de

croissance, tandis que le tréhalose est produit en période d'excès de glucose dans le milieu de culture.

• **Glutamate intracellulaire**

A 39°C, le niveau de glutamate intracellulaire se stabilise à 65 mg/g valeur identique à celle retrouvée au cours des fermentations précédentes des cellules non excrétrices. Quand la température de culture est augmentée à 41°C, l'excrétion de glutamate résulte en une baisse du niveau de glutamate intracellulaire jusqu'à 20 mg/g.

En conclusion, les cellules non-excrétrices précédemment sélectionnées en culture continues à 39°C conservent leurs propriétés quand elles sont remises en culture continue à 39°C. Par contre, elles retrouvent en partie leur capacité d'excrétion du glutamate quand elles sont soumises à une température plus élevée de 41°C.

III.4. Comparaison des cinétiques de *C. glutamicum* productrices de glutamate en cultures continue et semi-continue à 39°C

Dans une dernière partie nous avons comparé la cinétique de *C. glutamicum* 2262 en culture continue à 39°C et au taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$ à la cinétique de la même souche en culture semi-continue à 39°C dans des conditions de production maximales de glutamate. Les deux fermentations sont démarrées en discontinu à 33°C pour une propagation initiale de biomasse. Après 8 heures, la température est portée à 39°C et l'alimentation de milieu est mise en route.

Par rapport à la culture continue, le fonctionnement de la fermentation semi-continue se caractérise par deux différences:

- une absence de soutirage de milieu, ce qui élimine les phénomènes de lessivage cellulaire et résulte en une accumulation de glutamate,
- un niveau initial de glucose plus élevé (60 g/l au lieu de 15 g/l), et une alimentation plus rapide en glucose. Ceci résulte d'abord en une concentration plus élevée de glucose au moment du choc de

température (50 g/l pour le semi-continu, 0,01 g/l pour le continu), ensuite en niveau plus élevé durant les 20 h suivantes (entre 5 et 10 g/l pour le semi-continu et moins de 0,02 g/l pour le continu).

Sur les figures III-15, III-16 et III-17, sont comparées les données cinétiques et physiologiques au cours des deux fermentations.

• **Croissance cellulaire**

Pour les deux fermentations, l'augmentation de température de 33 à 39°C provoque un ralentissement puis un arrêt de la croissance. Le ralentissement est plus rapide dans les conditions de forte limitation en glucose du continu. En absence de soutirage des cellules, le niveau de biomasse augmente au cours du semi-continu, alors qu'il diminue au cours du continu. Par contre les évolutions du rendement de conversion de glucose en biomasse sont similaires pour les deux fermentations.

• **Consommation de glucose**

La vitesse spécifique de consommation de glucose est toujours plus élevée en semi-continu du fait de la plus forte concentration en glucose dans le milieu.

• **Excrétion de glutamate**

Pour les deux fermentations la montée de température de 33 à 39°C provoque une excrétion du glutamate. Mais la vitesse spécifique d'excrétion augmente beaucoup plus rapidement en semi-continu où les cellules sont exposées à une concentration plus élevée en glucose. Par contre les rendements de conversion de glucose en glutamate sont voisins pour les deux fermentations. Pour la fermentation semi-continue, une différence majeure est l'accumulation du glutamate excrété dans le milieu, qui atteint 90 g/l après 25 h. Ce qui provoque l'arrêt de la fermentation et de l'excrétion. Pour la fermentation continue, au contraire, le niveau de glutamate ne dépasse pas 6 g/l, et l'excrétion du

glutamate peut être maintenue durant une centaine d'heure, jusqu'au lessivage des cellules excrétrices.

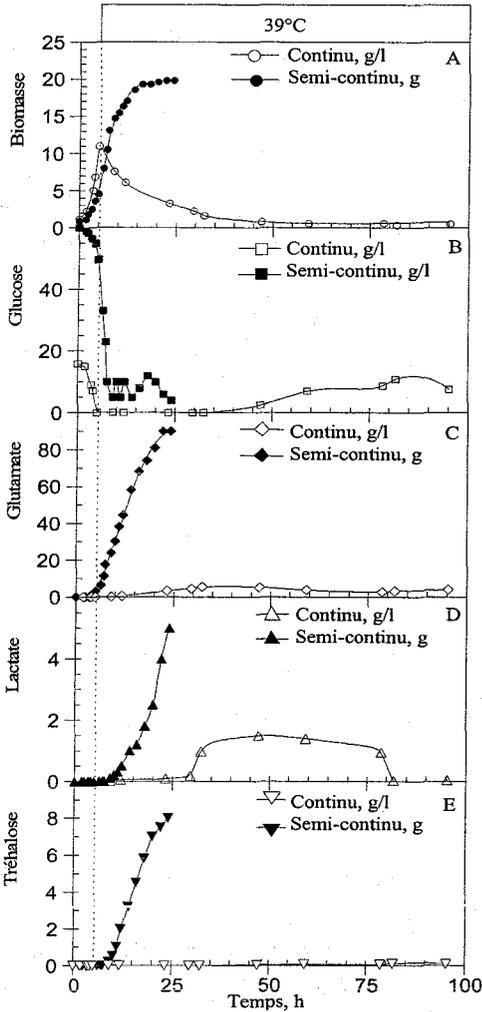


Figure III-15 : comparaison des cinétiques à 39°C de la culture continue à taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$ et semi-continue.

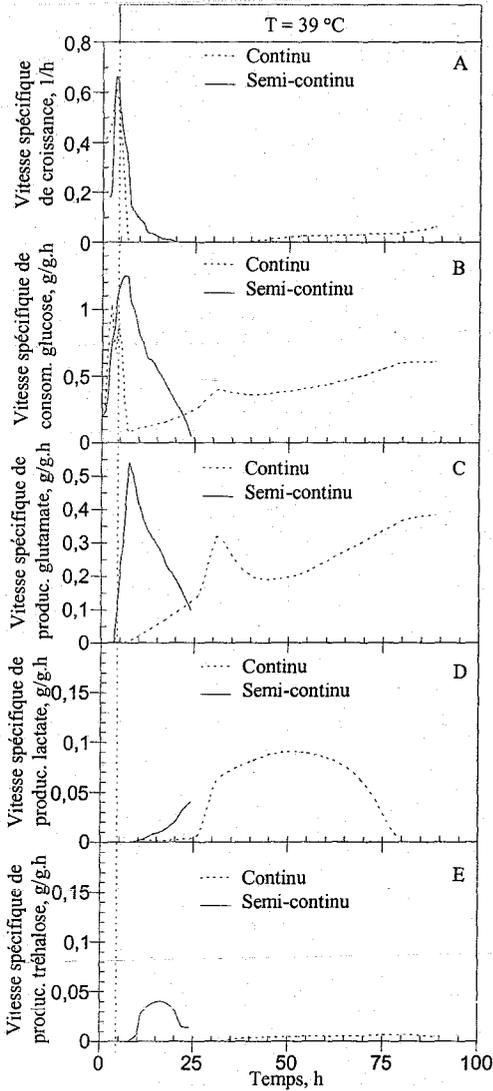


Figure III-16 : comparaison des vitesses spécifiques à 39°C de la culture continue à taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$ et semi-continue.

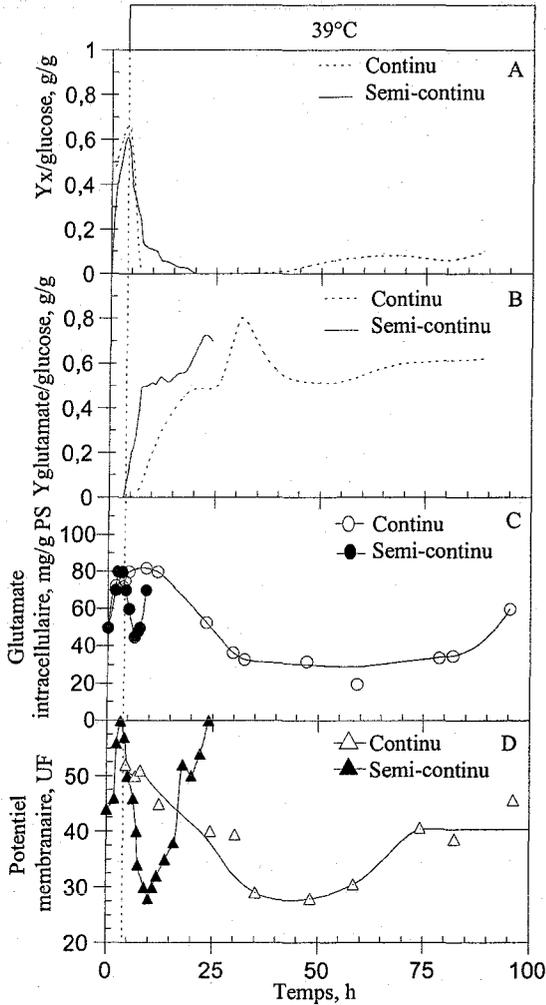


Figure III-17 : comparaison des cinétiques à 39°C de la culture continue à taux de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$ et semi-continue.

- **Excrétion de lactate**

En semi-continu, le lactate n'est produit qu'en fin de culture, lorsque la croissance cellulaire est suffisamment ralentie, pour atteindre un niveau de 5 g/L. En continu, le lactate est aussi excrété en période de réduction de la vitesse spécifique de croissance et d'accumulation transitoire de glucose dans le milieu, mais son niveau ne dépasse pas 1,5 g/l

- **Excrétion du tréhalose**

En culture semi-continue, l'excrétion de tréhalose jusqu'à 8 g/l est favorisée par le niveau élevé de glucose, alors qu'elle reste très faible en culture continue limitée en glucose.

- **Glutamate intracellulaire**

Dans les deux fermentations, après le choc de température le niveau de glutamate intracellulaire diminue à une valeur voisine de 40 mg/g, cette diminution étant cependant beaucoup plus rapide en semi-continu dû à une excrétion plus intense du glutamate.

- **Potentiel membranaire**

De même pour les deux modes de culture, le potentiel membranaire chute après le choc de température, la diminution étant à nouveau beaucoup plus rapide en semi-continu.

En conclusion, le comportement cinétique à 39°C de *C. glutamicum* en cultures semi-continue et continue montre beaucoup de similitudes au niveau de la transition métabolique entre les phases de croissance et d'excrétion, de la production des trois principaux métabolites glutamate, lactate et tréhalose, de l'évolution de grandeurs physiologiques comme le potentiel de membrane, la taille des cellules et le contenu intracellulaire en glutamate. Toutefois les processus métaboliques se déroulent à une plus faible vitesse en culture continue du fait d'une concentration de glucose fortement limitante. Par ailleurs le soutirage en continu du glutamate formé permet de prolonger la phase de

production de glutamate jusqu'à une centaine d'heures à une vitesse de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$, l'arrêt de la production de métabolites étant provoqué par le lessivage des cellules excrétrices.

III.5. Conclusion sur l'apport des cultures continues à la connaissance des caractéristiques cinétiques de *C. glutamicum* 2262 thermo-inductible

En conclusion de cette première partie nous proposons une discussion générale des principales caractéristiques cinétiques de *C. glutamicum* 2262 dans les conditions de croissance et d'excrétion de glutamate telles qu'elles ont été observées au cours des cultures continues et précédemment dans des cultures discontinue et semi-continue (Lapujade, 2000).

• Croissance cellulaire

Les cultures continues réalisées en limitation de glucose ont d'abord permis de préciser l'influence limitante de la concentration de glucose sur la vitesse spécifique de croissance. Si en culture discontinue ou semi-continue, les cellules se développent initialement à un taux de croissance de l'ordre de $0,6 \text{ h}^{-1}$, en culture continue à 33 et 37°C les cellules ont pu être maintenues sur des périodes de plusieurs dizaines d'heures à des taux de croissance inférieurs, compris entre 0,5 et $0,025 \text{ h}^{-1}$. Cette réduction du taux de croissance n'est cependant obtenue qu'à des concentrations de glucose très basses, inférieures à $0,1 \text{ g/l}$.

L'ensemble des études effectuées en cultures discontinues et continues ont également confirmé la forte influence d'un choc de température sur la croissance de *C. glutamicum* 2262. Une montée de température de 33 à 39°C provoque une diminution du taux de croissance de $0,6 \text{ h}^{-1}$ à moins de $0,05 \text{ h}^{-1}$ sur une période de quelques heures.

Par ailleurs les cultures continues ont également mis en évidence une hétérogénéité de population dans la préparation cellulaire étudiée. Lors du choc de température, une faible proportion des cellules n'excrètent pas de glutamate, ce qui leur permet de se maintenir à un taux de croissance

supérieur à celui des cellules excrétrices, et ainsi d'être finalement sélectionnées dans ces cultures continues à une vitesse de dilution de $0,05 \text{ h}^{-1}$.

• Consommation de glucose

Pour la cinétique de consommation de glucose, l'ensemble des résultats obtenus en fermentations continues et discontinues, montrent les caractéristiques suivantes de *C. glutamicum* 2262 :

- Dans des conditions de non excrétion de glutamate, la vitesse spécifique de consommation du glucose augmente avec la vitesse de croissance.
- Pour les cellules en condition de croissance (à 33 et 39°C), le rendement de conversion de glucose en biomasse atteint une valeur maximale de $0,6 \text{ g/g}$ aux fortes vitesses de croissance. En limitation de glucose, par contre, on observe une importante diminution de ce rendement de conversion avec la diminution du taux de croissance, jusqu'à une valeur de $0,2 \text{ g/g}$ (figure III-18).

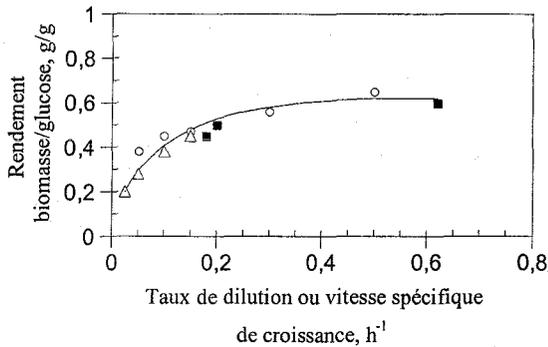


Figure III-18 : relation entre la vitesse spécifique de croissance et le rendement de conversion de glucose en biomasse pendant les cultures continues à 33°C (○) et 37°C (Δ) et discontinues à 33°C (■).

Ce résultat suggère l'existence d'une importante consommation de glucose pour la maintenance cellulaire, qui, aux faibles vitesses de croissance, représente une proportion importante de la consommation globale de glucose.

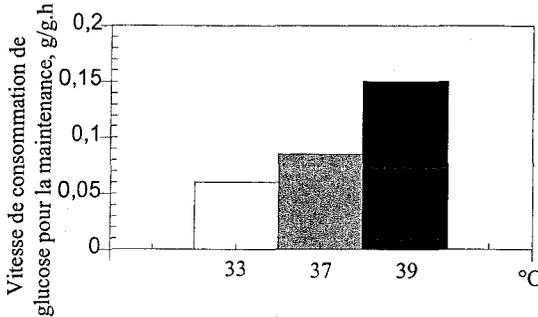


Figure III-19 : effet de la température de culture sur la vitesse spécifique de consommation de glucose pour la maintenance.

- La demande de glucose pour la maintenance, déterminée en extrapolant à vitesse de croissance nulle la vitesse spécifique de consommation du glucose, a été déterminée en culture continue à différentes températures. Les valeurs obtenues (figure III-19), indiquent une augmentation importante avec la température de cette maintenance cellulaire, de 0,05 g/g.h à 33°C jusqu'à 1,5 g/g.h à 39°C. Ce phénomène explique les diminutions de rendement de conversion de glucose en biomasse observées aux températures les plus élevées.

• Excrétion de glutamate

Pour la cinétique d'excrétion de glutamate, les principales caractéristiques de *C. glutamicum* peuvent être résumées comme suit :

- Les vitesses maximales d'excrétion de *C. glutamicum* 2262 mesurées à différentes températures et modes de cultures (figure III-20) montrent que dans les conditions de non-limitation de glucose du discontinu, la vitesse spécifique d'excrétion augmente rapidement avec la température entre 36 et

39°C pour atteindre 0,8 g/g.h. En cultures continues limitées en glucose, les vitesses d'excrétion augmentent également avec la température mais sont plus faibles et ne dépassent pas 0,4 g/g.h à 39°C. Cependant, l'excrétion de glutamate peut être maintenue sur des périodes plus longues en cultures continues dans des conditions de non accumulation du glutamate dans le milieu, ce qui confirme le rôle dominant du glutamate extracellulaire sur l'arrêt de la production de glutamate en cultures discontinues (Lapujade, 2000). Des diminutions de vitesse d'excrétion de glutamate en limitation de glucose ont été observées pour d'autres souches de *C. glutamicum* dont l'excrétion est induite par une carence de biotine en culture discontinue (Gutmann et al., 1992). Ceci est interprété par une diminution du niveau d'ATP, pendant la limitation de glucose, qui est nécessaire pour l'exporteur de glutamate (Gutmann et al., 1992).

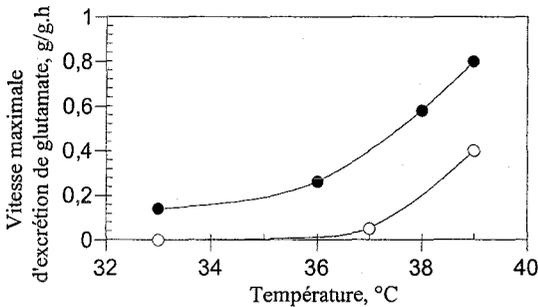


Figure III-20 : effet de la température de culture sur la vitesse spécifique maximale d'excrétion de glutamate en fermentation continue (○) et discontinue (●) (Lapujade et al., 1999).

- Le rendement de conversion de glucose en glutamate est de l'ordre de 0,5 à 0,6 g/g pour les deux modes de culture discontinus et continus.

• Excrétion de lactate

Les résultats des cultures discontinues et continues indiquent que le lactate peut être excrété simultanément au glutamate, mais uniquement aux très faibles vitesses de croissance, inférieures à

0,05 h⁻¹. La vitesse d'excrétion du lactate est aussi favorisée par la présence de glucose dans le milieu (figure III-21). La vitesse spécifique de production de lactate augmente avec la chute de croissance au cours des cultures continue et semi-continue en présence d'une concentration de glucose supérieure à 0,1 g/l (figure III-21). Toutefois, la vitesse spécifique de production de lactate en culture continue est plus élevée que celle en culture semi-continue à 39°C pour une même vitesse spécifique de croissance. Ceci peut être expliqué par le fait que la chute de croissance pendant la culture continue est principalement due à la température, tandis que l'arrêt de croissance pendant la culture semi-continue, observé en fin de culture, est dû également à d'autres facteurs tel que la forte concentration de métabolites extracellulaires (Lapujade, 2000).

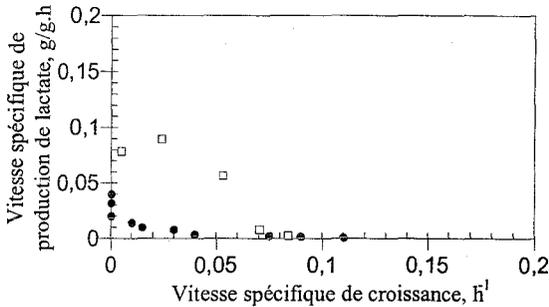


Figure III-21 : relation entre la vitesse spécifique de croissance et la vitesse spécifique de production de lactate pendant les cultures continue (□) et semi-continue (●) en présence de glucose supérieur à 0,1 g/l.

D'un point de vue métabolique, ce comportement cinétique peut être expliqué par une réduction de la capacité des voies respiratoire, et notamment de la NADH oxydase, chez les cellules excrétrices en croissance réduite (Cocaign-Bousquet et al., 1996 ; Gourdon et Lindiey, 1999). Dans ces conditions d'accumulation de NADH, la cellule utiliserait la voie du lactate pour assurer l'oxydation de NADH.

• Excrétion de tréhalose

Les résultats des cultures continues confirment qu'en phase d'excrétion, *C. glutamicum* 2622 peut simultanément produire du tréhalose. L'excrétion de tréhalose n'a lieu, cependant, qu'aux faibles vitesses de croissance, inférieures à $0,1 \text{ h}^{-1}$, et en présence d'un excès de glucose dans le milieu (figure III-22).

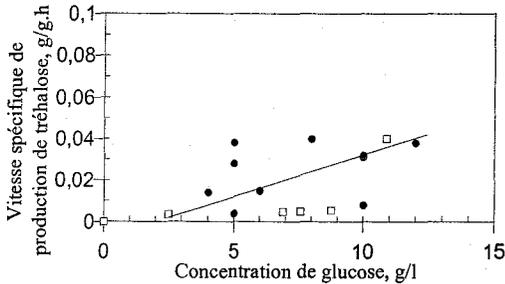


Figure III-22 : relation entre la concentration de glucose et la vitesse spécifique de production de tréhalose pendant la phase de production de glutamate à 39°C en culture continue (□) et en culture semi-continue (●).

Cette production accrue de tréhalose peut être due à une accumulation intracellulaire de glucose-6-phosphate, en présence une forte concentration de glucose, dans des conditions de croissance réduite.

• Glutamate intracellulaire

Une caractéristique importante de *C. glutamicum*, en culture continue ou discontinue, est la forte accumulation de glutamate intracellulaire. Lorsque les cellules sont en conditions de non-excrétion de glutamate, les valeurs de glutamate intracellulaire mesurées à différents taux de croissance et température sont reportées dans la figure III-23. Ce niveau intracellulaire est toujours maintenu à un niveau très élevé, entre 50 et 80 mg/g, quelque soit le taux de croissance entre $0,05$ et $0,5 \text{ h}^{-1}$, et donc

le niveau de glucose. Ce qui, d'un point de vue métabolique, semble suggérer l'existence d'un processus très efficace de régulation de glutamate intracellulaire à un niveau élevé chez ces souches.

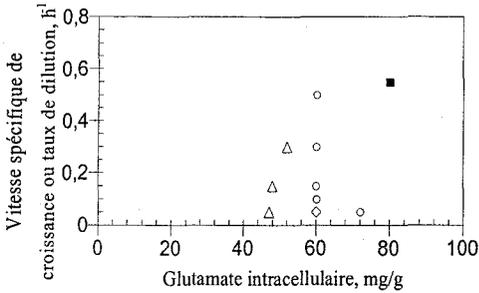


Figure III-23 : relation entre le niveau de glutamate intracellulaire et la vitesse spécifique de croissance (phase non-excrétion de glutamate) en culture continue à 33°C (○), 37°C (Δ), 39°C (◊) et culture discontinue à 33°C (■).

Dans des conditions d'excrétion de glutamate, on observe toujours une diminution du niveau de glutamate intracellulaire à des valeurs comprises entre 30 et 50 mg/g. Des niveaux analogues ont été observés précédemment dans d'autres conditions d'induction de l'excrétion de glutamate (Debay, 1996 ; Hoischen et Krämer, 1989 ; Lapujade et al., 1999).

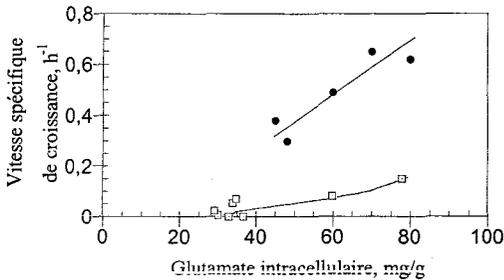


Figure III-24 : relation entre le niveau de glutamate intracellulaire et la vitesse spécifique de croissance de cellules excrétrices de glutamate à 39°C en culture continue à taux de dilution de 0,05 h⁻¹ (□) et semi-continue (●).

On peut cependant remarquer que même aux plus fortes vitesses d'excrétion, le niveau de glutamate demeure encore très supérieur à celui des autres métabolites intracellulaires, suggérant que, dans ces conditions, l'excrétion représente dans ces conditions une étape fortement limitante pour la cinétique de production de glutamate.

Par ailleurs, quand en phase d'excrétion de cultures continues et discontinues à 39° le taux de croissance est reporté en fonction du niveau de glutamate intracellulaire (figure III-24), on observe une diminution du taux de croissance avec le glutamate intracellulaire. Le niveau de glutamate intracellulaire pourrait donc représenter un des facteurs clefs contrôlant la vitesse de croissance cellulaire. Et la diminution rapide du taux de croissance observée après le choc de température pourrait être la conséquence directe de l'excrétion d'une partie du glutamate intracellulaire.

• Potentiel membranaire

Pour des cellules non-excrétrices à 33 et 37°C, les données obtenues en fermentations discontinues et continues montrent une bonne corrélation entre le potentiel de membrane et le taux de croissance cellulaire (figure III-25).

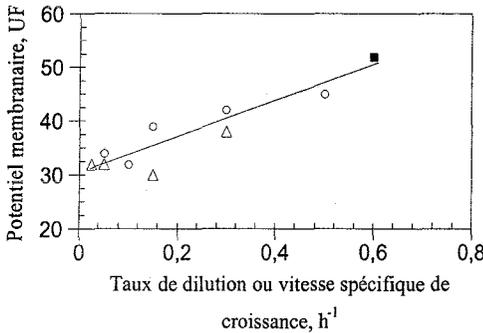


Figure III-25 : relation entre la vitesse spécifique de croissance et le potentiel membranaire de cellules non-productrices de glutamate de culture continue à 33°C (○), 37°C (Δ) et culture discontinue à 33°C (■).

Elles confirment les observations précédentes sur l'augmentation du potentiel de membrane avec le taux de croissance (Debay, 1996 ; Hoischen et al, 1990 ; Lapujade, 2000). Par ailleurs, à un taux de croissance donné, la température entre 33 et 37°C n'a pas d'influence significative sur le potentiel de membrane.

Pour des cellules excrétrices à 39°C (figure III-26), on observe également une bonne corrélation entre le potentiel de membrane et le taux de croissance, avec des valeurs étant similaires à celles trouvées en condition de croissance.

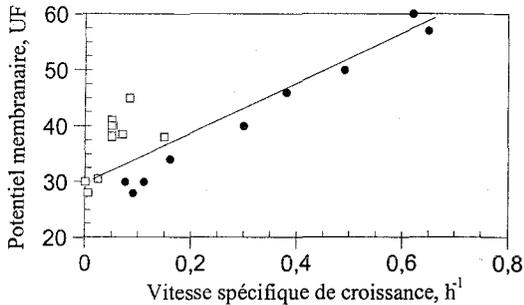


Figure III-26 : relation entre la vitesse spécifique de croissance et le potentiel membranaire de cellules productrices de glutamate à 39°C en culture continue (□) et semi-continue (●).

Ces études confirment donc le peu d'influence de l'excrétion de glutamate sur le potentiel membranaire de *C. glutamicum* (Gutmann et al., 1992 ; Lapujade, 2000).

• Taille cellulaire

En état de croissance à 33 et 37°C, la taille des cellules n'est pratiquement pas affectée par le taux de croissance et la température. Dans ces conditions réseau arabinogalactane-peptidoglycane paraît peu évoluer avec l'état de croissance des cellules (Hirasawa et al., 2000 ; Kijima et al., 1998).

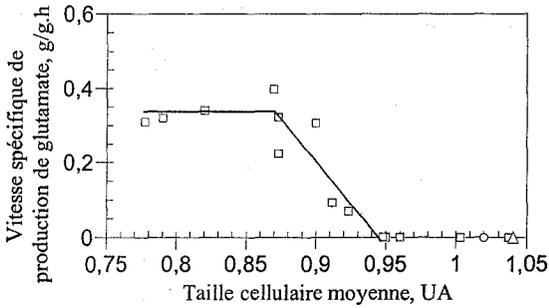


Figure III-27 : relation entre la taille cellulaire et la vitesse spécifique de production de glutamate pendant la culture continue à 33°C (○), 37°C (Δ) et 39°C (□).

Par contre, après le déclenchement de l'excrétion de glutamate, on observe toujours une diminution de la taille moyenne des cellules.

Pour l'ensemble des cultures discontinues et continues à 39°C, on observe une bonne corrélation entre la taille des cellules et la vitesse d'excrétion de glutamate (figure III-27), la taille cellulaire étant réduite de 50% aux flux d'excrétion les plus importants. Cependant, des résultats différents ont été décrits pour d'autres souches de *C. glutamicum* qui subissent un gonflement lorsque le glutamate est produit en conditions de limitation de biotine ou d'ajout de pénicilline (Kinoshita, 1985 ; Shibukawa et al., 1968 ; Hirasawa et al., 2000).



CHAPITRE IV :
CARACTERISATION
METABOLIQUE DE *CORYNEBACTERIUM*
GLUTAMICUM 2262 EN CULTURE A
DIFFERENTES TEMPERATURES

CHAPITRE IV : CARACTERISATION METABOLIQUE DE *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* 2262 EN CULTURE A DIFFERENTES TEMPERATURES

Dans ce chapitre, l'étude de l'évolution d'activités enzymatiques au cours des cultures a été réalisée afin à la fois, de mieux comprendre le comportement cinétique étudié dans le chapitre précédent, et de caractériser le métabolisme cellulaire pendant les phases de croissance et d'excrétion de glutamate induite par la montée de la température de culture.

Lors du passage de la phase de croissance à la phase de production de glutamate, des métabolites de la glycolyse s'accumulent dans le milieu extracellulaire en culture semi-continue (Gourdon et Lindley, 1999) et en culture continue. Il semble que le passage des métabolites de la glycolyse vers le cycle de Krebs soit limitant pendant la phase de production de glutamate. Cependant, les voies anaplérotiques ne sont pas responsables, car l'amplification d'une enzyme anaplérotique, la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC), ne restaure pas la synthèse de glutamate (Delaunay et al., 1999b). Toutefois, les données sur la pyruvate déshydrogénase (PDH) pendant la production de glutamate ne sont pas disponibles. Par ailleurs, le niveau de glutamate intracellulaire chute pendant la phase de production de glutamate. Pour atteindre l'objectif de ce chapitre, le suivi d'activités enzymatique du passage de la glycolyse vers le cycle de Krebs (la phosphoénolpyruvate carboxylase PEPC et la pyruvate déshydrogénase PDH), de la synthèse de glutamate (l'isocitrate déshydrogénase ICDH et la glutamate déshydrogénase GDH) et de la déviation de l' α -cétoglutarate vers la synthèse de succinyl-CoA (l' α -cétoglutarate déshydrogénase appelée "l'oxoglutarate dehydrogenase complex" ODHC) a été choisi.

Dans un premier temps, nous allons mettre au point la méthode de mesure de l'activité de l'ODHC et la PDH. L'évolution d'activités enzymatiques au cours des cultures continues à différentes températures sera étudiée dans un second temps afin de mieux comprendre l'effet de la température de culture sur le niveau de ces enzymes. Nous finissons, dans un dernier temps, ce chapitre par l'étude de la relation entre la concentration en glutamate intracellulaire et le niveau de synthèse des enzymes.

IV.1. Mise au point de dosages d'activités enzymatiques

IV.1.1. Activité α -cétoglutarate déshydrogénase (ODHC)

La méthode de dosage de l'activité α -cétoglutarate déshydrogénase (ODHC) a été mise au point pour la première fois par Shiiio et al. (1982). La mesure d'activité ODHC est la mesure par spectrophotométrie du NADH formé par l'ODHC en consommant de l' α -cétoglutarate et du NAD. Lorsque de faibles activités sont présentes intracellulairement, comme c'est le cas chez *Corynebacterium glutamicum*, le NAD est remplacé par l'APAD (accepteur d'électron qui a une structure homologue du NAD) car l'APADH formé par l'ODHC est plus stable que le NADH. Toutefois, la méthode présentée dans la littérature intègre l'activité parasite qu'il est nécessaire de soustraire pour accéder au véritable niveau de l'ODHC chez *Corynebacterium glutamicum* (figure IV-1). D'autre part, ce paragraphe précise le protocole de dessalage de la protéine dans l'extrait brut et la température optimale de dosage de l'activité ODHC.

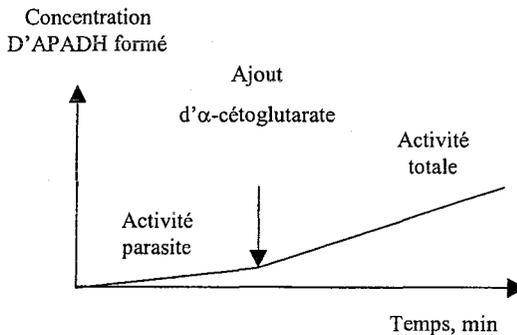


Figure IV-1 : principe de dosage de l'activité ODHC.

Afin de ne pas surestimer l'activité ODHC, nous mesurons dans un premier temps, l'activité parasite (en absence d' α -cétoglutarate) puis l'activité totale dans un second temps. L'APADH formé au cours du temps par l'ODHC est la différence de ces deux activités.

- La mesure de l'activité ODHC des différentes fractions d'éluion émanant de l'extrait acellulaire déposé sur colonne PD 10 (Pharmacia) nous a permis de définir avec précision les fractions porteuse d'activité ODHC (figure IV-2).

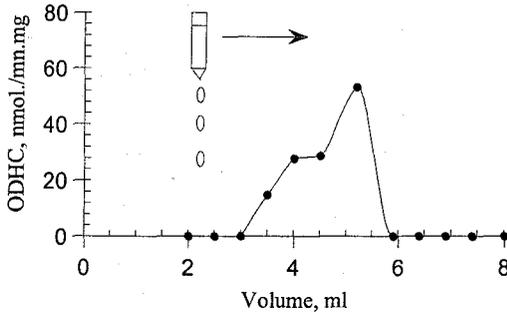


Figure IV-2 : activité ODHC dans les fractions d'extraits dessalés de *Corynebacterium glutamicum* cultivé sur milieu de glutamate.

- Il est important de noter que l'ODHC nécessite du glycérol pour être active (tableau IV-1). Par ailleurs, il est également nécessaire d'ajouter du glycérol dans le tampon (TES/NaOH, 0,1 M, pH = 7,7) pour solubiliser et extraire cette enzyme. Il est possible donc que l'ODHC soit dégradée ou/et elle ne soit pas soluble dans le tampon (TES/NaOH, 0,1 M, pH = 7,7) d'extraction sans glycérol.

	ODHC	
	(nmol/min.mg protéine)	
	Dosage avec glycérol	Dosage sans glycérol
Extrait dans tampon d'extraction avec glycérol	5,5	5,2
Extrait dans tampon d'extraction sans glycérol	2,2	0,2

Tableau IV-1 : effet de glycérol sur le dosage de l'activité ODHC.

- Un extrait acellulaire dessalé obtenu à partir de cellules cultivées sur milieu contenant du glutamate comme source carbonée a été utilisé pour étudier l'effet de la température sur l'activité ODHC. La température optimale de mesure de l'activité ODHC se situe à 29°C (figure IV-3).

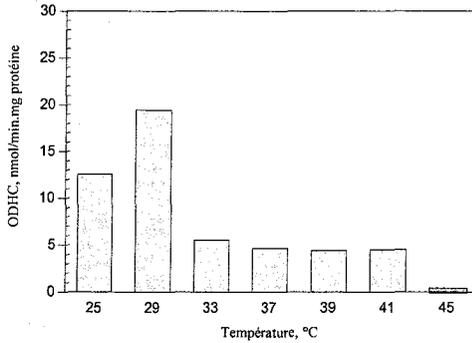


Figure IV-3 : effet de la température sur le dosage de l'activité ODHC.

L'augmentation de la température au-delà de 30°C entraîne une perte d'activité ODHC de 75%. Il est nécessaire de noter que l'activité ODHC mesurée à 33 et 39°C n'est pas significativement différente. A 45°C, aucune activité ODHC ne peut être mesurée. Par ailleurs, à 30°C, le pH optimal de l'activité ODHC est 7,7, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment par Shiiro et al. (1982). L'erreur sur la mesure de l'activité de cette enzyme est de 20%.

IV.1.2. Activité pyruvate déshydrogénase (PDH)

La méthode de mesure d'activité PDH est disponible dans la littérature (Cocaign-Bousquet et al., 1996 ; Hinman and Blass, 1981). Le principe de la méthode est présenté dans la figure IV-4 et la composition de la solution réactionnelle est dans la partie Matériels et Méthodes.

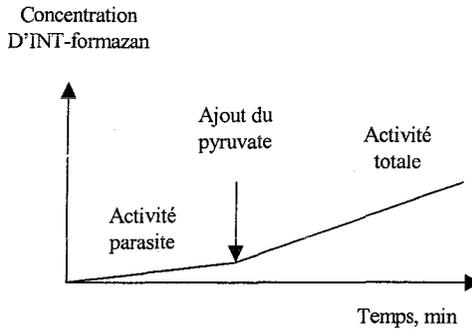


Figure IV-4 : principe de dosage de l'activité PDH.

Cependant, l'utilisation de cette méthode ne permet pas de mesurer l'activité PDH dans l'extrait brut de *Corynebacterium glutamicum*, lorsque l'activité endogène (la formation de coloration INT-formazan en absence de pyruvate) est soustraite. Ceci est probablement dû à l'inactivation de l'activité PDH par des métabolites présents dans l'extrait brut.

Afin d'enlever des petites molécules potentiellement inhibitrices de l'activité PDH, nous avons dessalé l'extrait acellulaire de même façon que pour l'activité ODHC. Le dessalage de l'extrait a permis donc de mesurer l'activité PDH chez *Corynebacterium glutamicum* (tableau IV-2).

PDH (nmol/min.mg)	PDH (nmol/min.mg)
Extrait Brut	Extrait dessalé
0	15

Tableau IV-2 : effet du dessalage sur le dosage de l'activité PDH.

Une activité de 15 nmol/min.mg protéine a été mesurée chez *Corynebacterium glutamicum* en phase exponentielle sur milieu avec glucose comme seule source carbonée.

- Nous avons ensuite testé l'activité PDH en utilisant différents tampons (Tris/HCl, Phosphate et TES/NaOH) pour extraire et pour mesurer l'activité PDH afin de supprimer l'étape de dessalage.

		Dosage de la PDH, nmol/min.mg protéine		
		Extrait préparé avec Tampon	Tris/HCl	Tampon-P
• Cellules cultivées sur glucose	Tris/HCl	0	0	0
	Tampon-P	0	0	0
	TES/NaOH	0	0	0
	TES/NaOH (Extrait dessalé)	ND	12	14
• Cellules cultivées sur glutamate	Tris/HCl	ND	5	6
	Tampon-P	ND	ND	ND
	TES/NaOH	ND	6	6,5

Tableau IV-3 : effet de tampons sur le dosage de l'activité PDH. ND : non déterminé.

L'activité PDH de cellules cultivées sur milieu contenant du glucose ne peut pas être détectée (tableau IV-3), mais une activité d'environ 6 nmol/min.mg protéine est détectée lorsque les cellules ont été cultivées sur milieu contenant du glutamate comme source de carbone.

Il est évident que l'activité PDH mesurée dans ces conditions est optimale lorsque le tampon TES/NaOH est utilisé pour extraire et mesurer l'activité PDH. Toutefois, le tampon phosphate peut également être utilisé lors de la mesure de l'activité PDH. Par ailleurs, le dessalage de l'extrait brut est nécessaire pour obtenir une forte activité PDH.

- Le tableau IV-4 présente l'effet du glycérol sur la mesure de l'activité PDH. Il apparaît que l'ajout de glycérol dans le tampon d'extraction permet d'avoir une activité PDH plus élevée, mais le glycérol n'augmente pas l'activité PDH lorsqu'il est ajouté au test enzymatique. Il est possible que le glycérol protège la PDH pendant l'extraction par sonication.

	Dosage de la PDH (nmol/mn.mg protéine)	
	avec glycérol	Sans glycérol
Extrait dessalé, avec glycérol	14	13
Extrait dessalé, sans glycérol	7,7	7,5

Tableau IV-4 : effet de glycérol sur l'activité PDH.

Le figure IV-5 présente l'effet de la température sur la mesure d'activité PDH de l'extrait dessalé des cellules cultivées sur un milieu contenant du glutamate comme source carbonée.

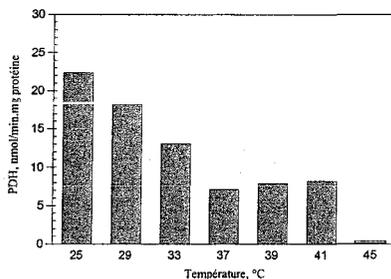


Figure IV-5 : effet de la température sur l'activité PDH.

L'activité PDH augmente lorsque la température de mesure diminue (25 à 33°C). A 45°C, l'activité PDH ne peut pas être détectée. Il apparaît donc qu'à 39°C, température de production du glutamate, l'activité PDH est réduite de 40% par rapport à 33°C pour le même niveau de la PDH. Par conséquent, contrairement à ce qui a été mesuré pour l'activité ODHC, le choc de température baisse directement l'activité PDH. Pour trois mesures d'un extrait dessalé, l'erreur de 15% a été calculée sur la mesure de l'activité PDH.

IV.2. Caractérisation métabolique de *C. glutamicum* 2262 en culture continue à différentes températures

Cette partie présente le suivi des activités enzymatiques au cours de cultures continues afin de caractériser la physiologie et le métabolisme cellulaire pendant la croissance et la production de glutamate, dont leurs cinétiques ont été présentées dans le chapitre III. Puisque les cinétiques de culture à 37°C ressemblent à celles à 33°C, nous avons donc suivi seulement des activités enzymatiques pendant la culture continue à 33°C qui nous permettra de caractériser la physiologie et le métabolisme cellulaire pendant la phase de croissance.

IV.2.1. Culture continue à 33°C de *C. glutamicum* 2262

L'évolution de la biomasse, du niveau intracellulaire en glutamate, ainsi que les activités enzymatiques clés du métabolisme de *C. glutamicum* 2262 sont présentées à l'état stationnaire à 33°C en fonction du taux de dilution (0,05 à 0,5 h⁻¹) appliqué (figure IV-6).

• Activité PEPC

A l'état stationnaire à 33°C pour les taux de dilution étudiés, l'activité PEPC varie entre 130 et 200 nmol/min.mg protéine. Une augmentation de l'activité PEPC est mesurée pendant la culture continue à 33°C aux faibles taux de dilution. Ceci en accord avec les résultats observés par Delaunay et al. (1999b) qui ont observé une augmentation du niveau de l'activité PEPC en phase de production de glutamate, lorsque la croissance est fortement ralentie en fermentation semi-continue à 39°C.

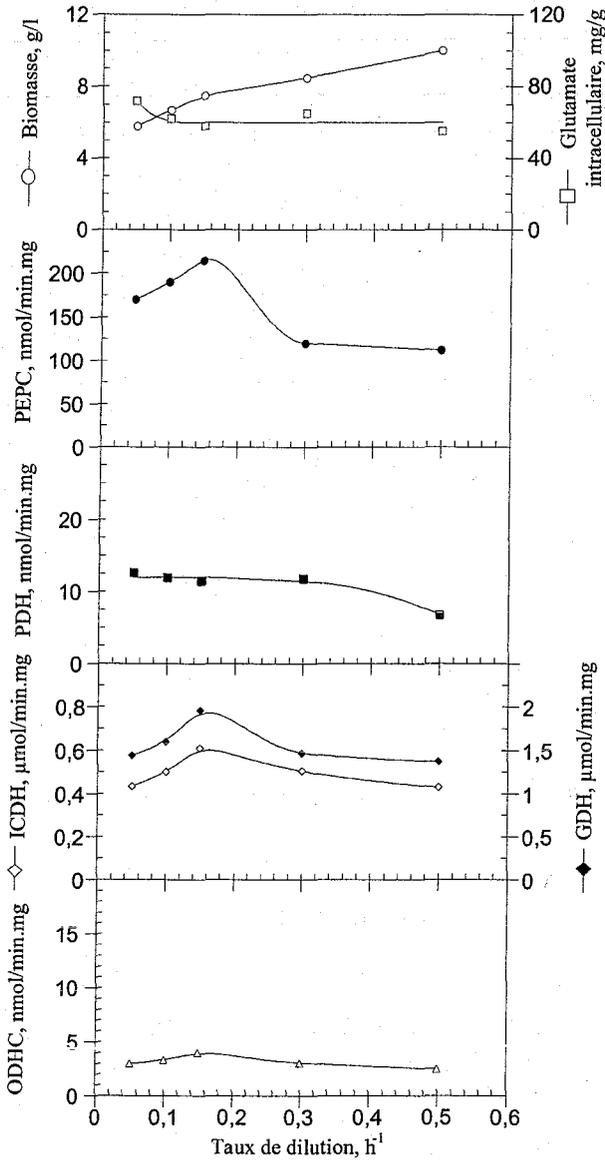


Figure IV-6 : concentration de biomasse, le glutamate intracellulaire et niveaux d'activités enzymatiques de *C. glutamicum* 2262 à l'état stationnaire de culture continue à 33°C à différents taux de dilution.

• Activité PDH

La PDH présente une activité de 10 à 12 nmol/min.mg protéine quelque soit le taux de dilution compris entre 0,05 et 0,3 h⁻¹ en culture continue à 33°C. Au taux de dilution de 0,5 h⁻¹, le niveau de l'activité PDH est légèrement diminué. Toutefois, cette diminution ne provoque pas une production de lactate car la concentration de glucose dans le milieu de culture est faible (environ 0,02 g/l). Il faut noter que l'activité PDH est relativement faible comparée à l'activité de la PEPC mesurée in vitro.

• Activités ICDH et GDH

Ces deux enzymes présentent des niveaux relativement élevés pendant la culture continue à 33°C. Une activité ICDH de 0,5 µmol/min.mg protéine et GDH de 1,5 à 1,8 µmol/min.mg protéine ont été mesurées à l'état stationnaire à 33°C pour tous les taux de dilution étudiés.

• Activité ODHC

De faibles activités ODHC de 3 à 4 nmol/min.mg protéine ont été détectées au cours de cultures continues limitées par le glucose à 33°C pour les taux de dilution étudiés. Il est nécessaire de noter que ces valeurs sont plus faibles que celles mesurées en culture discontinue non-limitée par le glucose. Ces légères baisses sont observées simultanément à une légère diminution du niveau de glutamate intracellulaire en culture continue.

IV.2.2. Culture continue de *C. glutamicum* 2262 à 39°C

L'évolution de la biomasse, du niveau intracellulaire en glutamate, ainsi que d'activités enzymatiques du métabolisme de *C. glutamicum* 2262 cultivé à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹ sont présentées dans la figure IV-7.

• Activité PEPC

La PEPC présente d'une activité de 60 nmol/min.mg protéine pendant la culture en mode discontinue à 33°C. Après le changement en culture continue et l'augmentation la température

de 33 à 39°C, la PEPC monte à environ 180 nmol/min.mg protéine sur la période entre 40 et 100 h. Ensuite, elle diminue graduellement pour se stabiliser à 85 nmol/min.mg protéine sur la période de 120 à 280 h. L'évolution du niveau de PEPC se fait de manière inversement proportionnelle au niveau du glutamate intracellulaire. En effet, lors de la période de croissance le niveau de glutamate intracellulaire est élevé, alors que le niveau de la PEPC reste faible. Au contraire, lorsque le glutamate intracellulaire est faible pendant la phase d'excrétion de glutamate, la PEPC est fortement exprimée.

• **Activité PDH**

La PDH présente un niveau de 12 nmol/min.mg protéine pendant la culture à 33°C en mode discontinu. Après le choc de température, à partir de 20 h, l'activité PDH chute rapidement et se stabilise à 5 nmol/min.mg protéine sur une période entre 35 et 96 h. Ensuite, elle remonte et se stabilise à 10 nmol/min.mg protéine sur une période de 150 à 180 h. Il est nécessaire de noter que la production de lactate, présentée dans le chapitre précédent, apparaît pendant la forte diminution du niveau de l'activité PDH.

• **Activité ICDH et GDH**

L'ICDH et la GDH présentent des niveaux élevés et assez stables de 0,8 et de 1 μ mol/min.mg protéine respectivement au cours de la culture continue à 39°C. Ces niveaux sont donc probablement non limitants pour la biosynthèse de glutamate ou la croissance quelle que soit la phase cellulaire.

• **Activité ODHC**

L'ODHC présente un niveau de 5 nmol/min.mg protéine pendant la culture discontinuée à 33°C. Après le choc de température, le niveau de cette enzyme chute dramatiquement sur la période entre 15 et 50 h en culture continue lorsque le taux de croissance est minimal. Elle remonte rapidement ensuite à 15 nmol/min.mg protéine à 120 h avec l'augmentation du niveau intracellulaire de glutamate et la reprise de la croissance. Après 120 h, l'ODHC diminue légèrement pour se stabiliser à 6 nmol/min.mg protéine à partir de 260 h de culture.

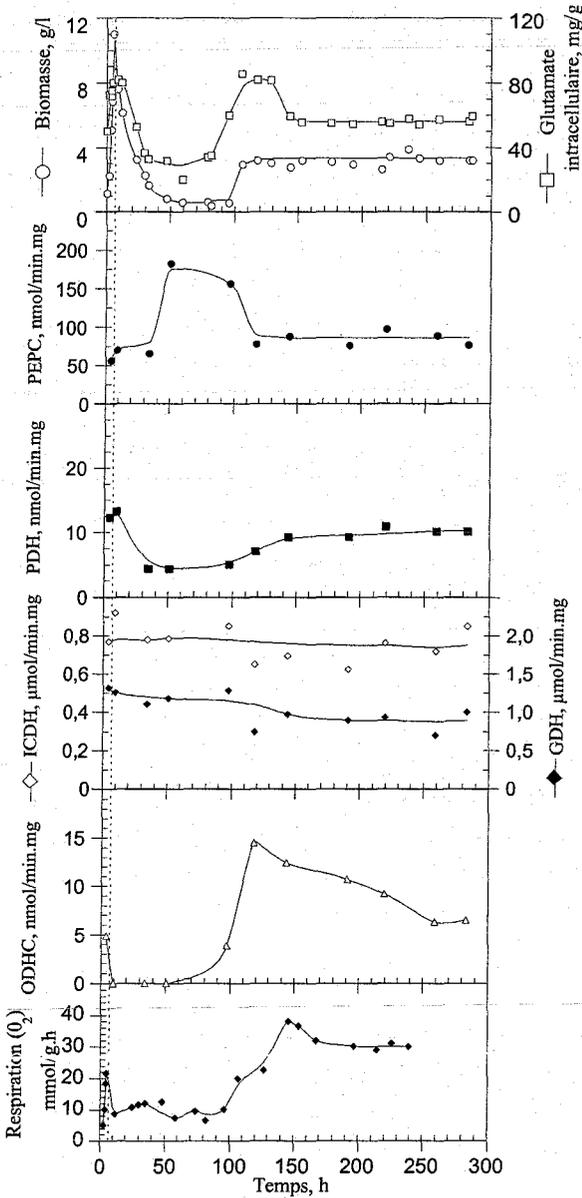


Figure IV-7 : concentration de biomasse, le glutamate intracellulaire, niveaux d'activités enzymatiques et respiration de *C. glutamicum* 2262 au cours de culture continue à 39°C et $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ qui est débutée après 5 h de culture discontinue à 33°C.

• **Vitesse spécifique de respiration**

La vitesse spécifique de respiration de l'oxygène de cellules en phase exponentielle de croissance à 33°C est de 22 mmol/g.h en présence de glucose. Après le choc de température, la capacité respiratoire cellulaire chute à 10 mmol/g.h et est ensuite maintenue à cette valeur sur une période entre 10 et 96 h. A partir de 100 h, tout comme les activités PDH et ODHC, la respiration remonte et atteint, à 150 h, une valeur maximale proche de 30 mmol/g.h qui est maintenue jusqu'à la fin de la culture.

IV.2.3. Culture continue à 39 et 41°C des cellules sélectionnées

Afin de caractériser le métabolisme de *C. glutamicum* 2262 en cultures continues, l'étude de l'évolution au cours du temps des activités PEPC, PDH, ICDH, GDH et ODHC, utilisant des cellules sélectionnées de la culture continue, a été effectuée en culture continue à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ et à 39 et 41°C (figure IV-8). Ces cellules ont perdu la capacité de production de glutamate à 39°C en culture continue à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$.

• **Activité PEPC**

Le niveau intracellulaire de PEPC des cellules sélectionnées n'est pas significativement modifié (environ 110 nmol/min.mg protéine) au cours de la culture à 39°C à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ sur une période entre 5 à 120 h. Après l'augmentation de la température à 41°C, l'activité PEPC augmente rapidement sur une période de 120 à 170 h. Cette augmentation apparaît avec la chute rapide de la croissance et du niveau du glutamate intracellulaire.

• **Activité PDH**

L'activité PDH semble se stabiliser à 10 nmol/min.mg protéine après 100 h de culture. Lorsque la température de culture est augmentée à 41°C, après 120 h, l'activité PDH chute légèrement à 7,5 nmol/min.mg protéine et se stabilise à ce niveau jusqu'à la fin de culture.

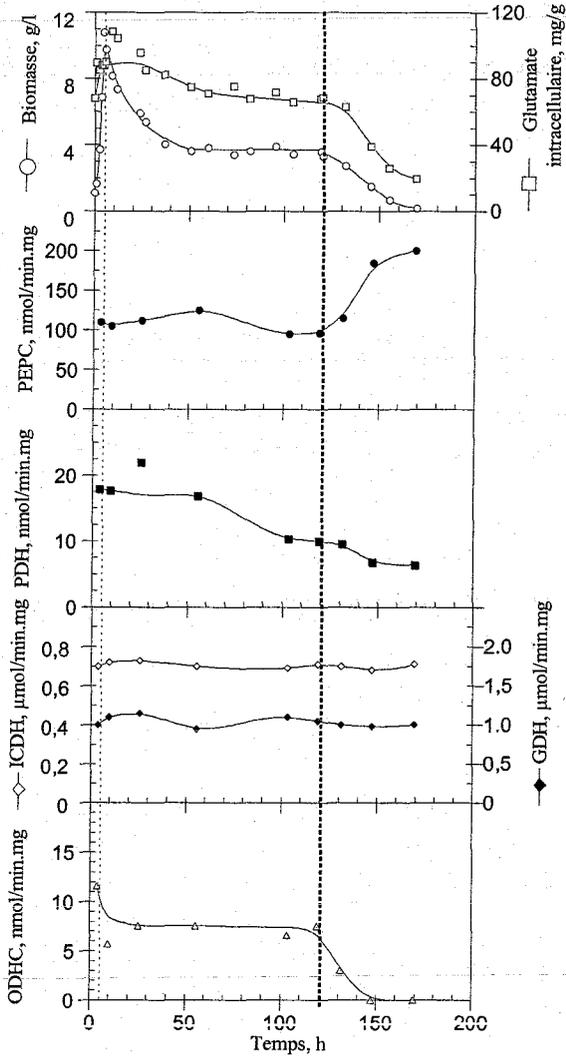


Figure IV-8 : évolution au cours du temps de la concentration en biomasse, du glutamate intracellulaire, des niveaux intracellulaires des activités enzymatiques de *C. glutamicum*

2262 sélectionné cultivé en mode continu à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$,

à 39°C (de 5 à 120 h) et 41°C (de 120 à 170 h).

• **Activité ICDH et GDH**

Les niveaux intracellulaires en ICDH et GDH restent élevés et stables au cours de la culture continue à 39 et 41°C. Ceci montre que la synthèse de ces deux enzymes n'est affectée ni par le taux de croissance cellulaire, ni par le niveau de glutamate intracellulaire, ni par la température de culture entre 33 et 41°C.

• **Activité ODHC**

Le niveau d'ODHC intracellulaire se situe à 11 nmol/min.mg protéine pendant la culture à 33°C en mode discontinu. Après le choc de température à 39°C, le niveau d'ODHC des cellules sélectionnées baisse mais reste relativement élevé aux environs de 7 nmol/min.mg protéine pendant la culture continue à 39°C sur la période de 10 à 120 h.

Après l'augmentation de la température à 41°C (à partir de 120 h), l'activité ODHC diminue fortement sur la période de 120 à 150 h et est inactivée à partir de 150 h. Tout comme la culture précédente, le niveau en ODHC intracellulaire évolue de la même manière que le niveau de glutamate intracellulaire.

IV.2.4. Discussion

• **Modification du continu enzymatique de *C. glutamicum* 2262**

On constate que le niveau de l'activité PEPC augmente fortement pendant les cultures à 33 et à 39°C lorsque la croissance est fortement diminuée. Cette diminution a été également observée pendant la fermentation glutamique en mode semi-continu à 39°C lors de la forte réduction de la croissance par la température (Delaunay et al., 1999b).

De même que pour les procédés de production de glutamate induits par une limitation en biotine, un ajout de tensioactif ou un ajout de pénicilline (Kawahara et al., 1997 ; Kimura et al., 1999), une très forte réduction de l'activité ODHC est mesurée durant la phase de production du procédé thermo-induit. En effet, la PDH et l'ODHC sont deux complexes d'enzymes différentes composés de trois sous-unités ; la troisième sous-unité de ces enzymes est la lipoamide

déshydrogénase (Schwinde et al., 2001). Cette unité commune participe également à transférer des électrons vers la chaîne respiratoire dans la membrane cytoplasmique. Ceci explique la corrélation entre le niveau de la PDH et la respiration cellulaire pendant la culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹ (figure IV-9). Une relation identique est obtenue entre la respiration et le niveau en ODHC (données non montrées).

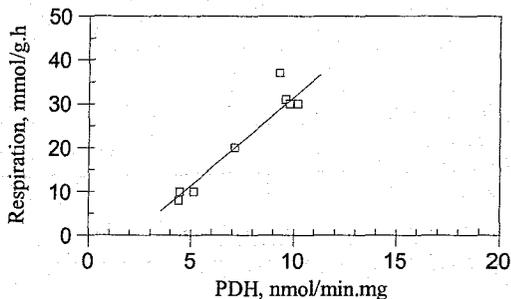


Figure IV-9 : relation entre le niveau de la PDH et la respiration de *Corynebacterium glutamicum* en fermentation continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹.

Par ailleurs, l'activité de ces deux enzymes est trouvée dans la fraction soluble d'un extrait cellulaire en présence du glycérol, ainsi que dans la fraction contenant les débris membranaires. Enfin, Kimura et al. (1999) ont montré que le mutant dont le gène *dtsR* est inactivé (codant probablement pour une sous-unité du complexe enzymatique catalysant la synthèse des acides gras) est capable de produire du glutamate sans induction et d'avoir une faible activité ODHC. Ces différents éléments nous conduisent donc à penser que les complexes enzymatiques PDH et ODHC sont liés de quelque manière à la membrane. Bien que Shibukawa et al. (1968) n'aient pas mesuré de variation de la composition de la membrane de *Microbacterium ammoniaphilum* au cours du procédé induit par de la pénicilline, nous pouvons penser qu'une altération de la membrane (composition, la fluidité) serait responsable de la perte de ces activités enzymatiques au cours du procédé thermo-induit. La même conclusion a été rapportée par Kimura et al. (1999) pour le procédé induit par une limitation en biotine, un ajout de tensioactif ou un ajout de pénicilline. Il semble probablement que la lipoamide déshydrogénase soit réduite à 39°C, ce qui diminuerait l'activité respiratoire des cellules en même temps que les activités ODHC et PDH. L'étude de la modification de l'enveloppe de *Corynebacterium glutamicum* 2262 pendant la croissance et la production de glutamate par le choc de température est donc nécessaire (chapitre V).

Les activités ICDH et GDH présentent des niveaux élevés chez *Corynebacterium glutamicum* quelque soit le mode et la température de culture. Elles sont stables au cours des cultures étudiées.

• Relation entre le niveau des enzymes et le métabolisme de *C. glutamicum* 2262

Nous avons observé une augmentation de l'activité PEPC de 2 à 3 fois lorsque les cellules sont en phase de production de glutamate en culture continue. Ce résultat a aussi été observé en culture semi-continue (Delaunay et al., 1999b ; Gourdon et Lindley, 1999). Ce résultat est tout à fait cohérent avec le fait que le glutamate intracellulaire exerce une activité répressive sur la synthèse de PEPC. Cette enzyme n'est pas limitante pour la production de glutamate en fermentation semi-continue induite par le choc de température (Delaunay et al., 1999b). La PEPC en culture continue n'est donc probablement pas responsable de l'accumulation de lactate dans le milieu de culture puisque son activité est semblable au niveau mesuré en mode semi-continu.

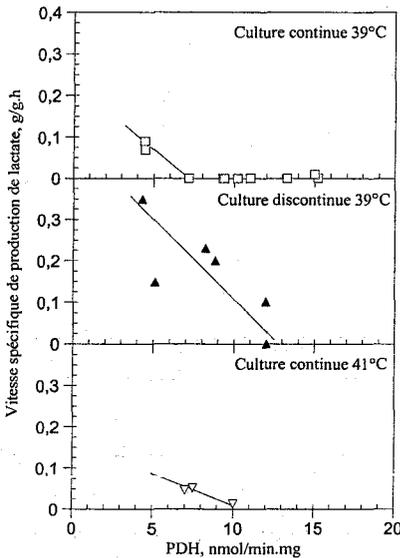


Figure IV-10 : relation entre le niveau de la PDH et la production de lactate : (□) culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹, (▲) culture discontinue à 39°C (la cinétique de cette culture est présentée dans la partie IV.3) et (▽) culture continue à 41°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹.

La chute du niveau de la PDH pendant la phase de production de glutamate est très probablement à l'origine de l'accumulation des métabolites intracellulaires de la glycolyse observée par Gourdon et Lindley (1999). Lors de l'arrêt ou la réduction de la croissance pendant la phase de production de glutamate, le flux carboné n'est pas utilisé pour synthétiser des matériels cellulaires mais il inonde la voie de glycolyse. Le niveau de l'activité PDH est subi une réduction importante par la régulation après le choc de température et probablement par l'effet direct de la température qui est observé *in vitro*. Par ailleurs, la respiration est réduite pendant la phase de production de glutamate pendant laquelle la croissance est fortement réduite. Dans ces conditions, l'accumulation du NADH est très probable, car l'accumulation du NADH a été déjà observée chez *C. glutamicum* lorsque la croissance cellulaire est réduite (Cocaign-Bousquet et al., 1996).

Les figures IV-10 et IV-11 montrent, respectivement, la relation entre le niveau de l'activité PDH et la vitesse spécifique de production de lactate et la relation entre la respiration et la vitesse spécifique de production de lactate.

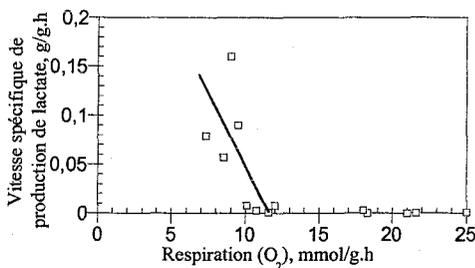


Figure IV-11 : relation entre la respiration et la vitesse spécifique de production de lactate en culture continue à 39°C.

La production du lactate pendant la phase de production de glutamate permet donc d'évacuer le pyruvate et le NADH. Nous pouvons conclure que la chute du niveau de l'activité PDH pendant la phase de production de glutamate est un phénomène défavorable à la production de glutamate.

L'activité ODHC est complètement inhibée pendant la phase d'excrétion du glutamate. Ce comportement de régulation chez *C. glutamicum* est bénéfique pour la production de glutamate, car le flux carboné au niveau de l' α -cétoglutarate passe vers la synthèse de glutamate au lieu du succinyl-CoA.

	Vitesse de la synthèse de glutamate (g/g.h)
<p>Croissance (culture discontinue à 33°C)</p> <ul style="list-style-type: none"> . $\mu = 0,6 \text{ h}^{-1}$. Glutamate intracellulaire = 80 mg/g . Excrétion = 0 g/g.h . Protéine = 50% poids sec 	<p>Pour</p> <ul style="list-style-type: none"> . La biomasse = 0,065 g/g.h . L'excrétion = 0 g/g.h <li style="text-align: right;">Totale = 0,065 g/g.h
<p>Excrétion de glutamate (culture continue à 39°C)</p> <ul style="list-style-type: none"> . $\mu = 0 \text{ h}^{-1}$. Glutamate intracellulaire = 32 mg/g . Excrétion = 0,4 g/g.h 	<p>Pour</p> <ul style="list-style-type: none"> . La biomasse = 0 g/g.h . L'excrétion = 0,4 g/g.h <li style="text-align: right;">Totale = 0,4 g/g.h

Tableau IV-5 : vitesses spécifiques de la synthèse de glutamate pendant les phases de croissance et de production de la fermentation glutamique.

Comme on peut le voir dans le tableau IV-5, si on tient compte des différents flux de synthèse de glutamate nécessaires à la synthèse de la biomasse, à l'accumulation de glutamate dans les cellules, et l'excrétion au travers de l'enveloppe cellulaire, la vitesse de synthèse de glutamate par les cellules en phase de croissance est fortement réduite par rapport à celle mesurée en phase d'excrétion de glutamate.

IV.3. Relation entre le contenu en glutamate intracellulaire et le niveau de synthèse de la PEPC, de la PDH et de la ODHC de *C. glutamicum* 2262

Nous avons observé des relations entre le niveau des activités enzymatiques (PEPC, PDH et ODHC) et la contenu intracellulaire de glutamate en culture continue limitée par le glucose à différentes températures. Afin d'avoir davantage de données pour mettre en évidence ces relations, nous allons étudier le niveau de ces enzymes lors de culture susceptible de présenter différentes concentrations intracellulaires en glutamate. C'est pourquoi nous allons étudier cette relation au cours d'une culture discontinue non limitée par le glucose et une culture discontinue avec du glutamate comme seule source carbonée.

IV.3.1. Culture discontinue de *C. glutamicum* 2262 à 39°C sur glucose

Cette culture apporte des données supplémentaires sur la synthèse de la PEPC, la PDH, l'ICDH, la GDH et l'ODHC pendant la culture à 39°C non-limitée pas le glucose (figures IV-12 et IV-13).

• Principales cinétiques

Le comportement cinétique de *C. glutamicum* en fermentation discontinue ressemble à celui observé en fermentation semi-continue (chapitre III). Après le choc de température à 39°C, le glutamate est excrété jusqu'à la fin de la culture lorsque le glucose dans le milieu de culture est totalement consommé. Bien que le lactate soit produit tout au long de la culture, sa concentration augmente fortement à partir de 10 h de culture.

• Activité PEPC

Le niveau de l'activité PEPC est d'environ 75 nmol/min.mg protéine lorsque les cellules sont cultivées à 33°C. Après le choc de température à 39°C, l'activité PEPC augmente graduellement de 75 à 150 nmol/min.mg entre 4 et 15 h, période pendant laquelle le niveau de glutamate intracellulaire chute de 80 à environ 40 mg/g PS. L'évolution de la PEPC au cours de cette culture est tout à fait classique puisque son évolution est semblable à celle mesurée en culture semi-continue par Delaunay et al. (1999b).

• Activité PDH

Pendant la culture à 33°C, le niveau de la PDH est de 15 nmol/min.mg protéine. Après l'augmentation de la température de 33 à 39°C, l'activité PDH chute graduellement de 15 à 5 nmol/min.mg protéine et se stabilise à ce niveau pour les dernières heures de la culture. De la même manière que les cultures continues précédentes, l'activité PDH chute parallèlement à la diminution du niveau de glutamate intracellulaire.

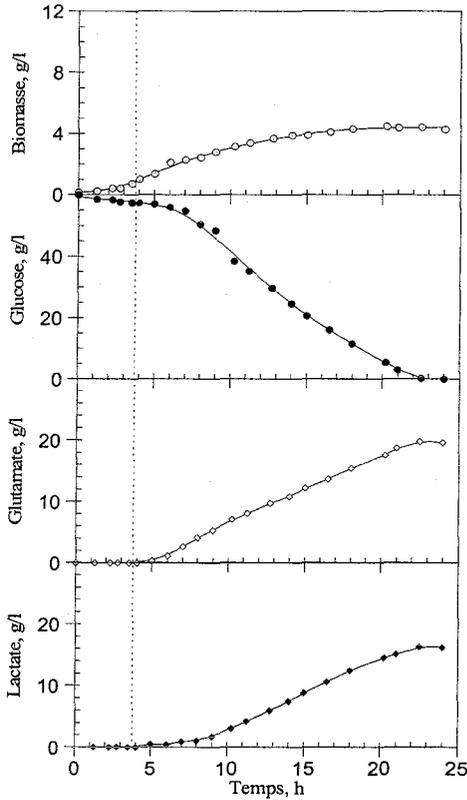


Figure IV-12 : évolution de la concentration de biomasse, de glucose, de glutamate et de lactate au cours du temps en culture discontinue de *C. glutamicum* 2262 à 39°C. Le changement de la température de 33 à 39°C est réalisé après 4 h de culture.

• Activités ICDH et GDH

Aucune modification significative de l'ICDH ou de la GDH n'a été observée au cours de la culture discontinue à 33 et 39°C. Les niveaux de ces enzymes sont élevés au cours de la culture. Ces résultats sont en accord avec tous les résultats obtenus pendant les fermentations continues.

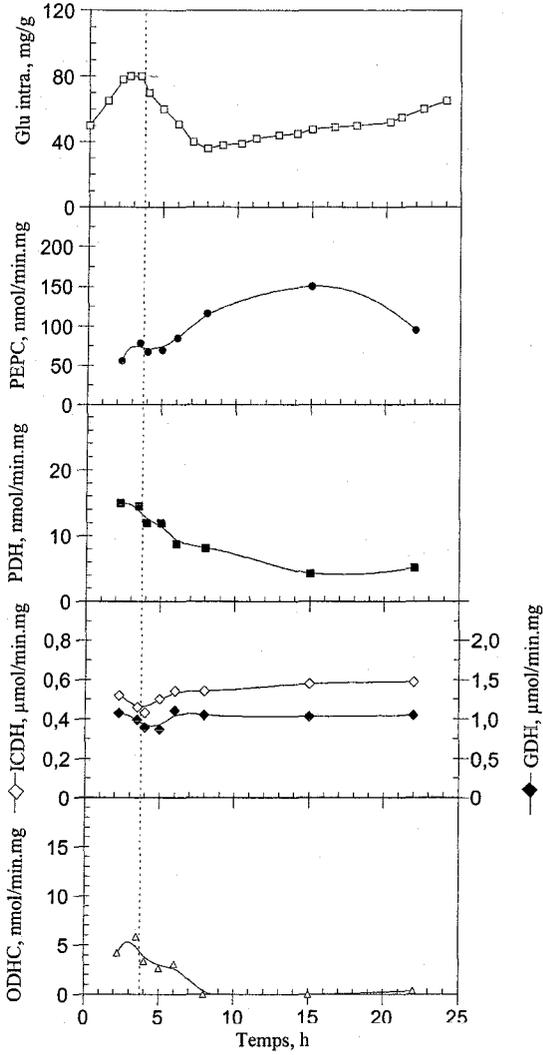


Figure IV-13 : évolution des activités PEPC, PDH, ICDH, GDH et ODHC au cours du temps en culture discontinue à 39°C.

- **Activité ODHC**

L'ODHC présente une activité d'environ 5 nmol/min.mg protéine pendant la culture à 33°C. Après le choc de température à 39°C, l'activité de cette enzyme chute rapidement sur la période de 4 à 8 h et n'est pas mesurable ensuite. Par rapport aux cultures continues, nous observons le même comportement de régulation. Par conséquent la présence de glucose n'a pas d'effet significative sur la synthèse de l'enzyme pendant cette culture. L'inactivation de l'enzyme est observée systématiquement lorsque le niveau de glutamate intracellulaire chute fortement.

IV.3.2. Culture discontinuée à 33°C sur glutamate

Afin d'évaluer l'effet du glutamate intracellulaire sur le niveau de synthèse de la PDH et de l'ODHC, nous avons étudié également l'effet d'ajout de glutamate (20 g/l) dans le milieu de culture comme source de carbone sur la synthèse de ces enzymes en mode discontinu à 33°C. Le niveau de ces enzymes et le glutamate intracellulaire pendant la phase exponentielle de croissance de *C. glutamicum* sont présentés dans le tableau IV-6.

Source carbonée	Glutamate intracellulaire, mg/g PS	PDH nmol/min.mg protéine	ODHC nmol/min.mg protéine
Glucose	80	15	6
Glutamate	110	30	34

Tableau IV-6 : effet du glutamate sur le contenu intracellulaire en glutamate et la synthèse de la PDH et de l'ODHC.

On constate que sur milieu glucose, l'activité PDH est de 15 nmol/min.mg protéine et le glutamate intracellulaire de 80 mg/g PS. Sur le milieu contenant le glutamate comme seule source de carbone, le glutamate intracellulaire est de 110 mg/g PS, et l'activité PDH doublée. Ceci suggère que le glutamate intracellulaire pourrait être un inducteur de la synthèse de la PDH. Lorsque *Corynebacterium glutamicum* est cultivé sur milieu contenant du glucose comme seule source de carbone à 33°C, une activité d'ODHC de 6 nmol/min.mg protéine est mesurée. De

même que pour l'activité PDH, sur milieu contenant du glutamate comme seule source de carbone, l'activité ODHC est fortement augmentée.

IV.3.3. Discussion

Afin de mettre en évidence la relation existante entre la synthèse des enzymes (PEPC, PDH et ODHC) et la concentration en glutamate intracellulaire, nous prenons toutes les données obtenues pendant les cultures continues et discontinues en présence de concentrations en glucose limitante et non-limitante à différentes températures de culture.

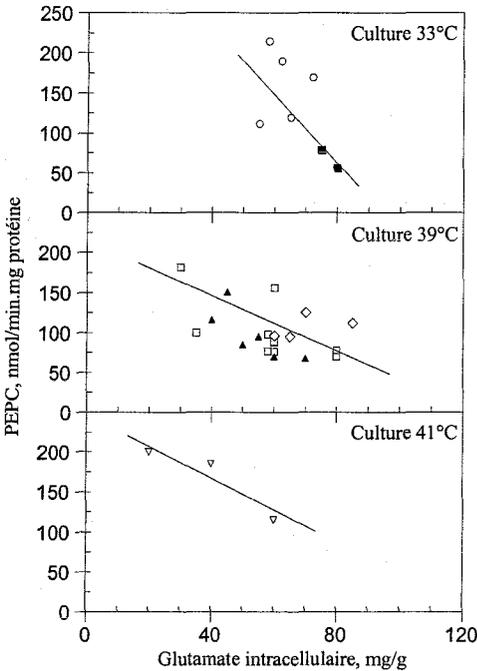


Figure IV-14 : relation entre le glutamate intracellulaire et l'activité PEPC : (○) culture continue à 33°C, (□) culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹, (◇) culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹ utilisant des cellules sélectionnées, (▽) culture continue à 41°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹, (■) culture discontinue à 33°C et (▲) culture discontinue à 39°C.

• Activité PEPC

Pendant la culture à 33°C en présence d'excès de glucose, le contenu intracellulaire de glutamate est élevé, alors que la PEPC est peu exprimée. Par contre, pendant la culture continue à 33°C limitée par glucose, le niveau de glutamate intracellulaire est moins élevé, alors que l'activité PEPC est plus élevée (figure IV-14).

De même que pour les cultures à 39 et 41°C, nous avons une bonne augmentation de la synthèse de la PEPC lors de la diminution du niveau de glutamate intracellulaire, quelque soit le mode de culture (figure IV-14). Par ailleurs, une augmentation de la synthèse de la PEPC est observée pendant la culture réalisée sur milieu contenant du glutamate comme source de carbone comparé à celle sur milieu avec glucose (Shiio et Ujigawa, 1978). Ceci est dû à l'augmentation du niveau de glutamate intracellulaire qui est observée pendant la culture de *Corynebacterium glutamicum* sur milieu contenant de glutamate comme source de carbone (tableau IV-5).

Ces résultats permettent de mettre en évidence l'effet répresseur de glutamate intracellulaire sur de la synthèse de la PEPC chez *Corynebacterium glutamicum*. Ce phénomène déjà décrit dans la littérature (Shiio et Ujigawa, 1978) permet aux bactéries de contrôler le flux carboné vers la synthèse de glutamate afin de maintenir une concentration nécessaire de glutamate à l'intérieur des cellules.

• Activité PDH

La figure IV-15 montre le niveau de l'activité PDH en relation avec le niveau de glutamate intracellulaire. Quelle que soit la température de culture entre 33 et 41°C et le mode de culture, le niveau de PDH augmente avec le niveau de glutamate intracellulaire. Lorsque *C. glutamicum* sont cultivées sur milieu contenant du glutamate comme source de carbone, le glutamate intracellulaire augmente fortement et la PDH est fortement exprimée. Ces résultats laissent présumer que la synthèse de la PDH pourrait être activée par le niveau de glutamate intracellulaire.

Il est probable que l'augmentation de glutamate intracellulaire active la synthèse de la PDH permettant ainsi une synthèse en quantité élevée d'acétyl-CoA (précurseur de la synthèse des composés membranaires) et une activation de la respiration pour la synthèse de l'énergie

cellulaire nécessaires pour la croissance. Ce phénomène provoque, en phase de production de glutamate, une conséquence de limiter l'approvisionnement en cycle de Krebs, puisqu'en phase de production le glutamate intracellulaire chute et entraîne alors une baisse de l'activité PDH.

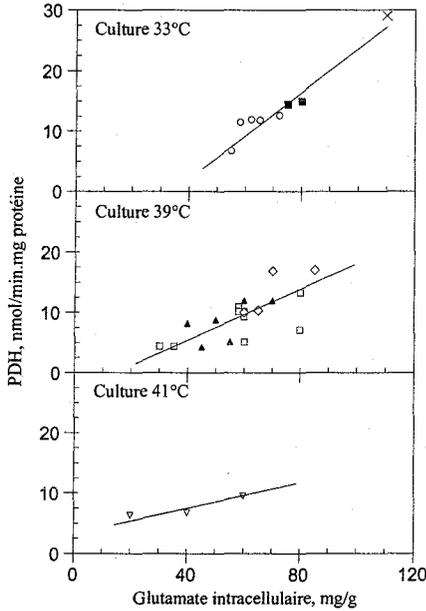


Figure IV-15 : relation entre le glutamate intracellulaire et l'activité PDH : milieu glucose : (○) culture continue à 33°C, (□) culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹, (◇) culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹ utilisant des cellules sélectionnées, (▽) culture continue à 41°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹, (■) culture discontinue à 33°C et (▲) culture discontinue à 39°C et milieu glutamate : (x) culture discontinue à 33°C.

• Activité ODHC

De même que pour l'activité PDH, l'activité ODHC diminue très fortement en phase de production de glutamate. Dans la plupart des cas l'activité résiduelle n'est plus mesurable. Dans ces conditions, le contenu de glutamate intracellulaire est fortement réduite. Dès lors, quelque soit le mode de culture utilisé (mode d'alimentation, température, source carbonée) le niveau de l'ODHC est élevé lorsque le contenu en glutamate intracellulaire est élevé (figure IV-16, tableau IV-6).

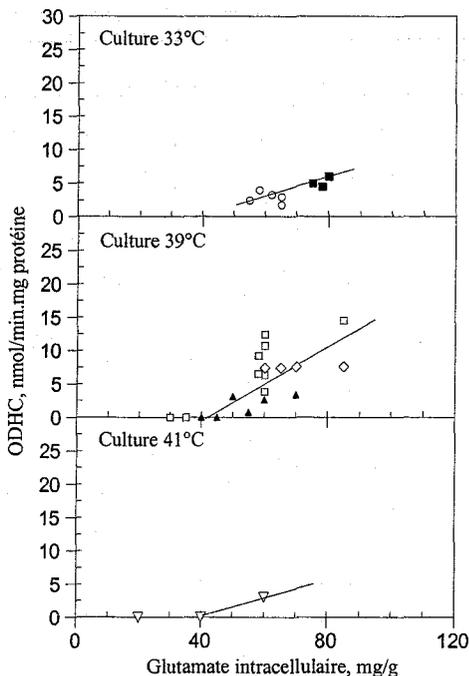


Figure IV-16 : relation entre le glutamate intracellulaire et la synthèse de l'ODHC : (○) culture continue à 33°C, (□) culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹, (◇) culture continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹ utilisant des cellules sélectionnées, (▽) culture continue à 41°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹, (■) culture discontinue à 33°C et (▲) culture discontinue à 39°C.

Ceci suggère que le glutamate intracellulaire active la synthèse de l'ODHC. Ce phénomène permet de fournir en phase de croissance une quantité importante de glutamate intracellulaire ainsi que les précurseurs métaboliques nécessaires à la formation de biomasse. Dans le cas contraire, lorsque les cellules sont en phase de production de glutamate, la baisse dramatique de l'activité ODHC permet de couper la voie vers la synthèse de succinyl-CoA et de favoriser la synthèse d' α -cétoglutarate précurseur de glutamate.

IV.4. Discussion

Deux hypothèses peuvent expliquer le changement du métabolisme de *C. glutamicum* de la croissance vers la production de glutamate :

- La première hypothèse (figure IV-17) est basée sur le rôle central du glutamate intracellulaire nécessaire à la croissance de *C. glutamicum* (figure III-23 dans le chapitre III).

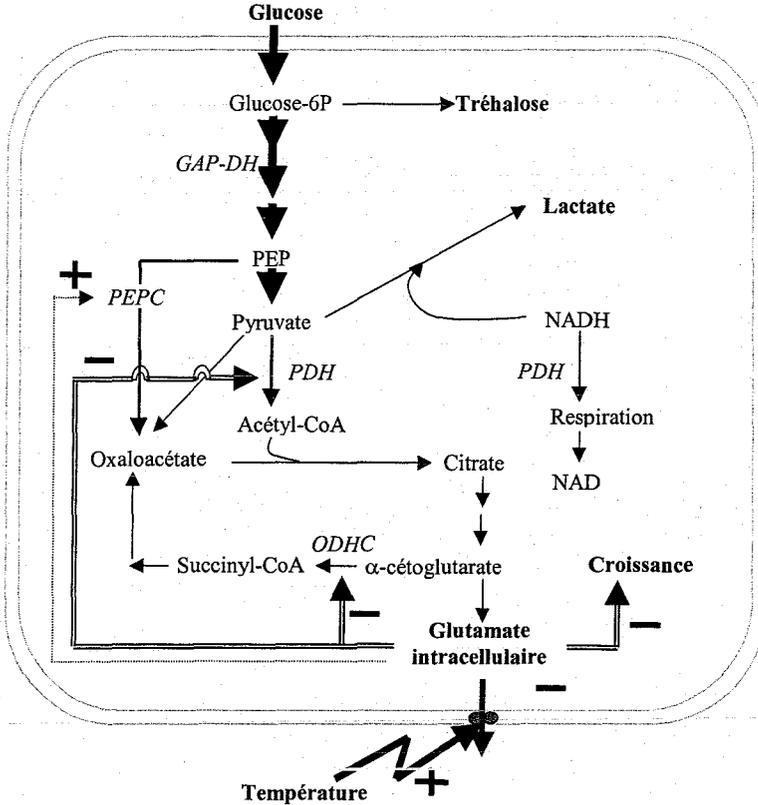


Figure IV-17 : première hypothèse “le glutamate joue un rôle central de la régulation du métabolisme chez *C. glutamicum*”.

Le choc de température active l'exporteur de glutamate qui provoque la chute du niveau de glutamate intracellulaire. La chute du niveau de glutamate intracellulaire dérègle la synthèse

de la PEPC et réprime celle de l'ODHC afin de restaurer le niveau de glutamate intracellulaire et réprime également la synthèse de la PDH. La chute de la PDH et de l'ODHC, dont la troisième sous-unité participe au transfert des électrons de la chaîne respiratoire, provoque très probablement une accumulation intracellulaire de NADH et de pyruvate. L'accumulation de NADH et de pyruvate à leur tour va permettre une activation de la synthèse de lactate par la LDH.

- La deuxième hypothèse est basée sur la modification de la composition membranaire après le choc de température (figure IV-18).

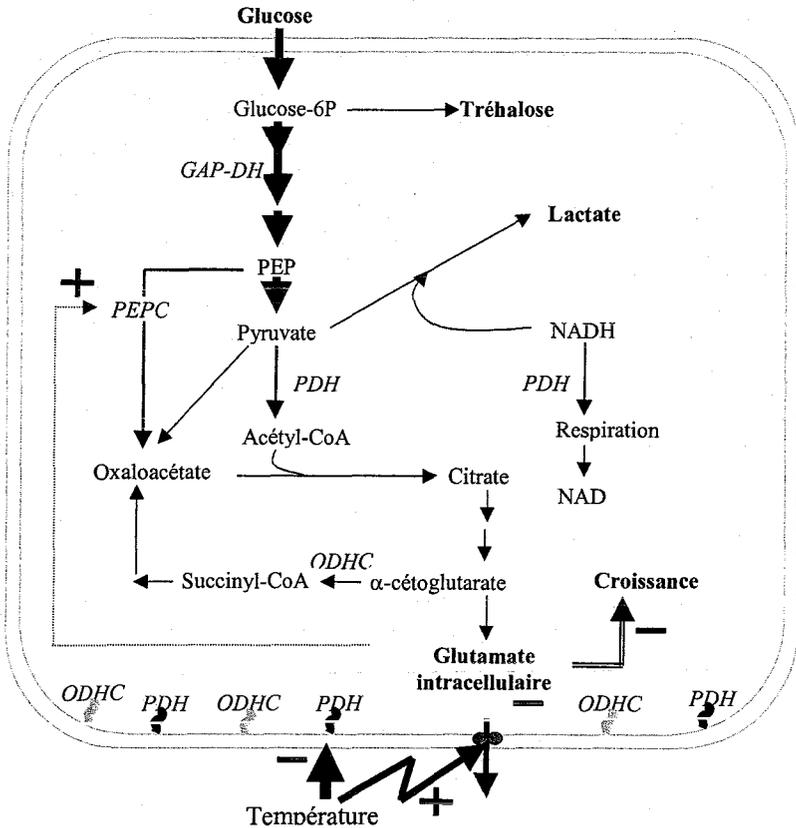


Figure IV-18 : deuxième hypothèse "le choc de température altère la structure de membrane qui inactive la PDH et ODHC chez *C. glutamicum*".

Le choc de température modifie la structure de la membrane qui active l'exporteur de glutamate. L'excrétion de glutamate provoque donc une chute du contenu intracellulaire de glutamate. Cette diminution déréprime la synthèse de la PEPC, mais n'a pas d'effet sur celle de la PDH et de l'ODHC. La diminution de la PDH et l'inactivation de l'ODHC sont dues à la modification de la structure membranaire par le choc de température, car ces deux enzymes sont liées à la membrane. Dans ces conditions, le lactate est naturellement produit car les activités PDH et respiratoire sont fortement réduites.

Pour préciser ces hypothèses, il est nécessaire de quantifier les protéines exprimées qui sont les sous-unités de la PDH et l'ODHC pendant la croissance et la production de glutamate induite par le choc de température. Si la quantité des sous-unités de ces enzymes sera diminuée après le choc de température, nous concluons que la première hypothèse sera valable. Dans les autres cas, si la quantité des sous-unités de ces enzymes ne sera pas modifiée ou sera augmentée après le choc de température, la deuxième hypothèse expliquera le présent résultat, car les sous-unités exprimées nécessitent du repliement pour être actives.



CHAPITRE V :
ETUDE DE LA MODIFICATION DE
LA PAROI DE *CORYNEBACTERIUM*
GLUTAMICUM 2262 PENDANT LA
CROISSANCE ET LA PRODUCTION
DE GLUTAMATE

CHAPITRE V : ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA PAROI DE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM 2262 PENDANT LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE GLUTAMATE

Les chapitres précédents ont porté sur l'étude des cinétiques et la régulation enzymatique de *C. glutamicum* 2262 pendant les phases de croissance et de production de glutamate. Au cours de ce chapitre, nous allons essayer de mieux comprendre l'effet de l'augmentation de la température sur la paroi cellulaire. L'étape d'excrétion du glutamate au travers de la paroi de *C. glutamicum* 2262 a été identifiée comme limitante dans le processus de production de glutamate (Lapujade et al., 1999). Dans ce domaine, bien qu'au cours des études précédentes, les travaux publiés ne permettent pas à l'heure actuelle de définir une relation claire entre la composition de la paroi cellulaire et l'excrétion de glutamate. Des études plus ou moins récentes montrent que l'excrétion de glutamate apparaît bien que la composition de la membrane cytoplasmique (acides gras saturés, acides gras insaturés et phospholipides) de *C. glutamicum* pendant la phase de croissance et de production de glutamate par limitation de biotine ou ajout de pénicilline ne soit pas modifiée (Hoischen et Krämer, 1990 ; Shibukawa et al., 1968) et que l'activation de l'excrétion est observée lors de la diminution de lipides totaux la composition de membrane cytoplasmique n'est pas changé (Hoischen et Krämer, 1990). Au cours de procédé température, une augmentation du rapport acides gras saturés / acides gras insaturés est observée bien que la teneur en lipides totaux ne soit pas significativement modifiée pendant la phase de production de glutamate (Gourdon, 1999).

Afin de mieux comprendre l'effet de la température sur la synthèse des acides gras de *C. glutamicum* 2262, thermo-inductible pour la production de glutamate, nous avons étudié dans un premier temps l'effet de l'apport d'oléate ou de palmitate (acides gras qui représentent 90% d'acides gras totaux) sur la croissance cellulaire et la production de glutamate. Ceci permet d'évaluer d'une part l'effet de la température sur le métabolisme de ces acides gras avant et après le choc de température et d'autre part de mesurer la sensibilité de la production de glutamate vis-à-vis de ces acides gras. Pour compléter notre compréhension sur la relation entre la modification de la paroi cellulaire et l'excrétion de glutamate, nous étudierons, dans un second temps, la fluidité de la paroi cellulaire pendant la fermentation glutamique.

V.1. Etude de l'effet des acides gras sur la croissance et la production de glutamate

V.1.1. En culture discontinue

• Effet de l'oléate sur la croissance et la production de glutamate à 33°C

La croissance de *C. glutamicum* 2262 et sa production en glutamate à 33°C en présence d'oléate à 0-2 g/l sont présentées dans la figure V-1. La biomasse atteint une concentration de 18 g/l à 24 h en absence d'oléate (figure V-1A). Lorsque l'oléate est ajouté entre 0,02 et 0,2 g/l, aucun effet visible n'est mesuré sur la croissance cellulaire. la biomasse est légèrement affectée en croissance de la concentration de l'oléate. A la concentration de 2 g/l d'oléate, la croissance est complètement inhibée (figure V-1F).

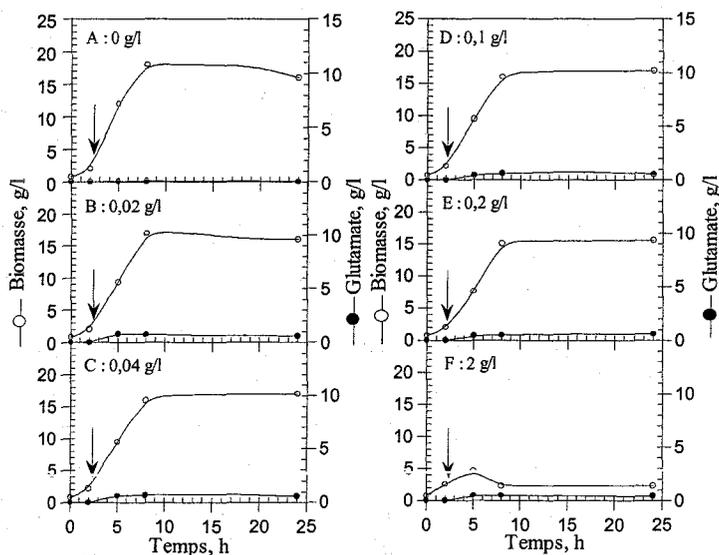


Figure V-1 : effet de différentes concentrations d'oléate sur la croissance de *C. glutamicum* 2262 et sa production de glutamate à 33°C en culture discontinue. → : ajout de l'oléate.

Quelque soit la concentration d'oléate utilisé, une production de glutamate d'environ 0,5 g/l est mesurée. En effet, le glutamate est produit exclusivement immédiatement après l'ajout d'oléate.

• Effet de l'oléate sur la croissance et la production de glutamate à 39°C

A 39°C, l'ajout d'oléate jusqu'à 0,2 g/l, favorise la croissance cellulaire (figure V-2A). En effet on constate une augmentation de la concentration finale en biomasse de 100% entre 0,02 et 0,2 g/l d'oléate. En revanche, l'ajout d'oléate réduit la production de glutamate. A 2 g/l d'oléate, on note également une inhibition de la croissance, ainsi qu'une très faible production de glutamate.

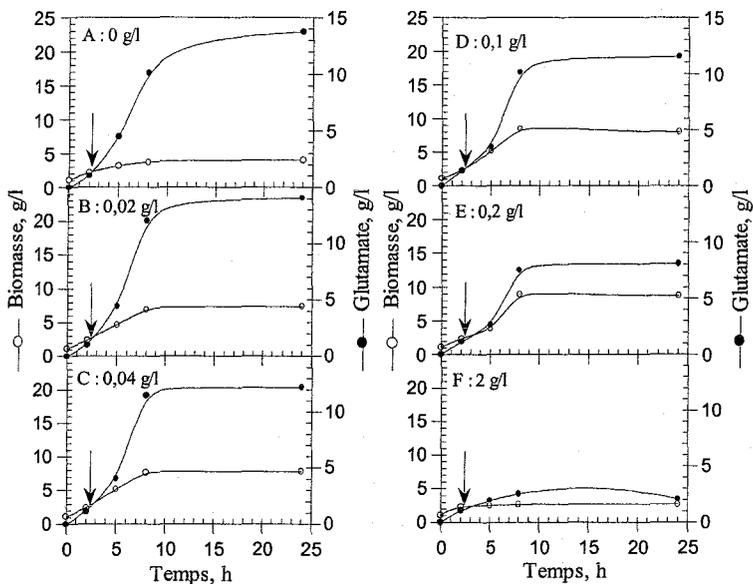


Figure V-2 : effet de différentes concentrations d'oléate sur la croissance de *C. glutamicum* 2262 et sa production de glutamate à 39°C en culture discontinue. → : ajout de l'oléate.

• Effet du palmitate sur la croissance et la production de glutamate à 33°C

La figure V-3 présente les cinétiques de *C. glutamicum* 2262 en culture discontinue à 33°C en présence du palmitate à une concentration variant de 0 à 2 g/l.

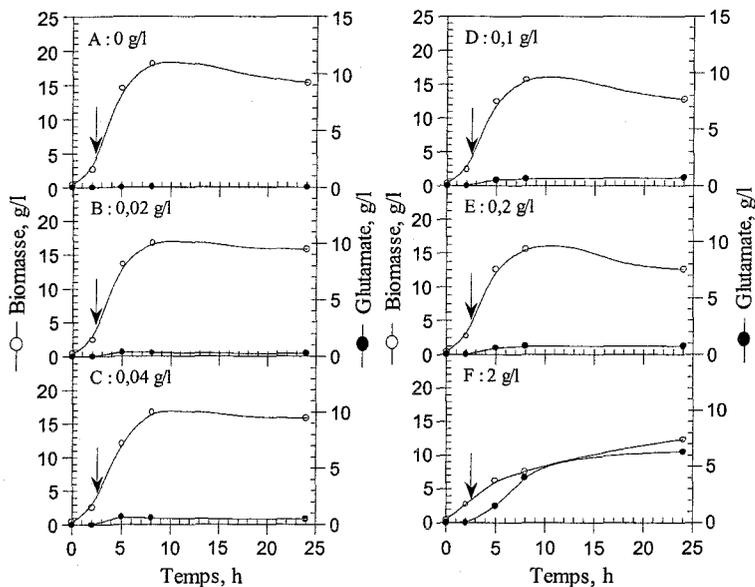


Figure V-3 : effet de différentes concentrations de palmitate sur la croissance de *C. glutamicum* 2262 et sa production de glutamate à 33°C en culture discontinue. → : ajout du palmitate.

Le palmitate semble avoir le même effet sur les culture à 33°C que l'oléate. En effet, lorsque le palmitate est ajouté de 0,02 à 0,1 g/l, une très légère inhibition de la croissance et une augmentation de la production de glutamate sont observées. L'ajout du palmitate à une concentration de 2 g/l inhibe fortement la croissance et permet de produire du glutamate de 6,5 g/l à 24 h de culture.

• Effet du palmitate sur la croissance et la production de glutamate à 39°C

La figure V-4 présente les cinétiques de cultures réalisées à 39°C en présence de palmitate de 0 à 2 g/l. L'ajout de faibles concentrations de palmitate de 0,02 à 0,2 g/l, permet d'augmenter légèrement la croissance, alors que la production de glutamate n'est pas significativement augmentée.

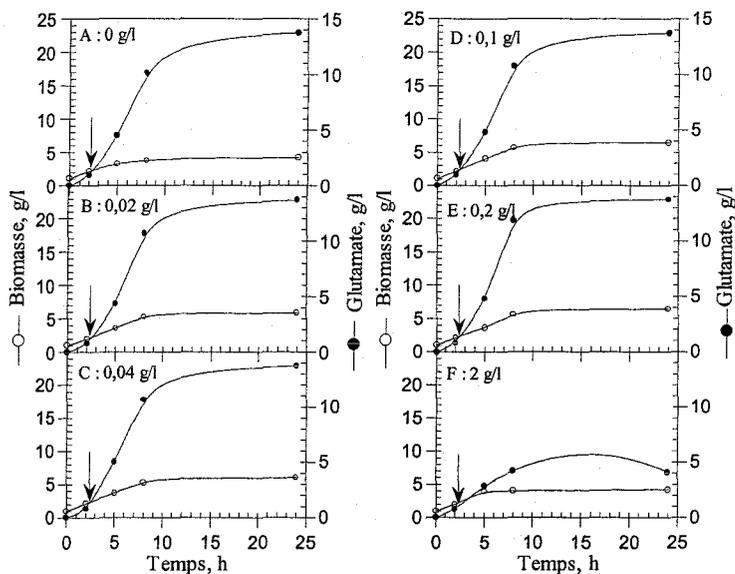


Figure V-4 : effet de différentes concentrations de palmitate sur la croissance de *C. glutamicum* 2262 et sa production de glutamate à 39°C en culture discontinue. → : ajout du palmitate.

Il est intéressant de noter qu'à forte concentration de palmitate (2 g/l), la croissance n'est pas différente du témoin, alors que la production de glutamate est fortement réduite.

IV.1.2. En culture semi-continue : comparaison du procédé de production de glutamate en présence et absence de palmitate

Le palmitate semble avoir de l'effet positif pour la production de glutamate en culture discontinue en fiole d'Erlenmeyer. Afin de préciser l'effet du palmitate sur la production de glutamate par *C. glutamicum*, l'étude de la production de glutamate a été réalisée en fermentation semi-continue. Le palmitate est ajouté 3 h après le choc de température à 39°C dans le milieu de culture à une concentration de 0,2 g/l. L'évolution au cours du temps des concentrations en biomasse, glucose, glutamate et les vitesses spécifiques de consommation du glucose et de production du glutamate, ainsi que les rendements de conversion sont présentés dans les figures V-5 et V-6 en comparaison avec le témoin.

• Croissance

Pendant la culture à 33°C, la croissance augmente rapidement et atteint la phase exponentielle après 4 h. A ce moment, la température de culture est augmentée à 39°C afin de déclencher la phase de production de glutamate. Après le choc de température, la croissance et le rendement en biomasse chutent fortement et sont pratiquement nuls à partir de 13 h de culture pour les deux fermentations (figure V-6A et V-6D). La formation de biomasse augmente lentement après le choc de température et atteint la valeur maximale d'environ 20 g à 15 h de culture. Aucun effet significatif du palmitate à une concentration de 0,2 g/l sur la croissance n'a été observé.

• Consommation de glucose

La consommation de glucose augmente avec la croissance pendant la culture à 33°C (figure V-6B). Après le choc de température, la consommation de glucose augmente pendant quelques heures de culture et puis diminue graduellement jusqu'à la fin de la fermentation (figure V-6B). Lorsque le palmitate est ajouté, pendant la culture à 39°C, la vitesse spécifique de consommation de glucose est maintenue plus élevée comparé à la culture témoin. En fin de fermentation, 190 et 249 g de glucose sont respectivement consommés par les cellules cultivées en absence et présence de palmitate.

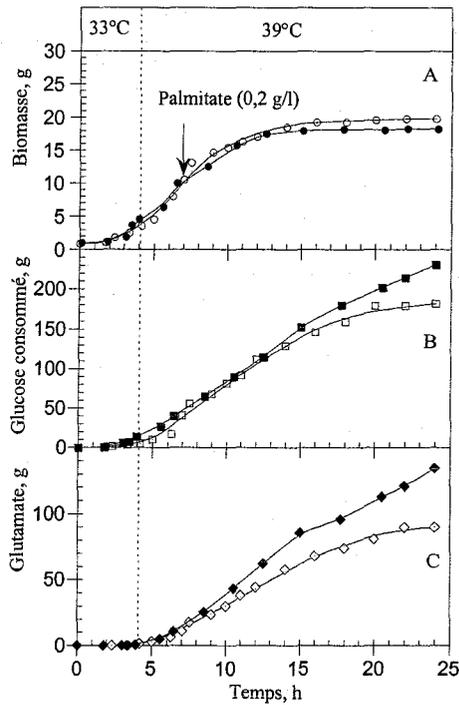


Figure V-5 : comparaison de cinétique de culture en absence (○, □ et ◇) et en présence de 0,2 g/l de palmitate (●, ■, ◆).

● Production de glutamate

La vitesse spécifique de production de glutamate augmente après augmentation de la température et atteint la valeur maximale de 0,55 g/g.h à 7 h de culture pour les deux cultures, ensuite cette vitesse diminue graduellement jusqu'à la fin de fermentation (figure V-6C). Cependant, lorsque le palmitate est ajouté après 7 h de culture, la chute de la vitesse spécifique de production de glutamate est beaucoup plus lente, ceci permet d'augmenter la quantité de glutamate accumulé dans le milieu de culture (figure V-5C).

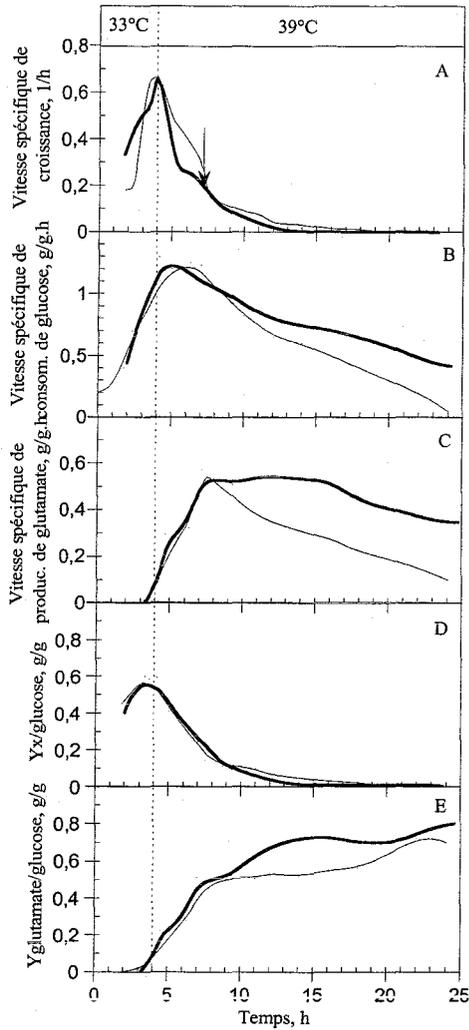


Figure V-6 : comparaison les vitesses spécifiques de croissance, de consommation de glucose et de production de glutamate et les rendements en biomasse et glutamate de fermentation semi-continue à 39°C de *C. glutamicum* 2262 en absence (—) et présence (—) de palmitate.

En fin de fermentation, 90 et 140 g de glutamate ont été produits respectivement sans et avec ajout de palmitate, ce qui correspond à 80 et 100 g/l. Le rendement instantané de conversion de glucose en glutamate augmente graduellement après le choc de température, il atteint sa valeur la plus élevée lorsque la croissance est complètement inhibée. De même, l'ajout de palmitate permet d'augmenter le rendement de conversion de glucose en glutamate (figure V-6E).

V.1.3. Discussion

• Effet de l'oléate et du palmitate sur la croissance de *C. glutamicum* 2262

Les acides gras majoritaires (90%) chez *C. glutamicum* sont l'acide oléique et l'acide palmitique. Ces acides gras sont synthétisés à partir de malonyl-CoA par deux systèmes enzymatiques différents : FAS-I-A (synthétise les acides gras insaturés comme l'oléate) et FAS-I-B (synthétise les acides gras saturés comme le palmitate et le stéarate) (Stuible et al., 1996 ; Stuible et al., 1997).

	33°C		39°C	
	Biomasse maximale, g/l	Glutamate maximale, g/l	Biomasse maximale, g/l	Glutamate maximale, g/l
Témoins	18	0	4	15
0,2 g/l d'oléate	15	0,5	9	8
0,2 g/l de palmitate	15	0,7	6	15

Tableau V-1 : effet de l'oléate et du palmitate sur la croissance et la production de glutamate de *C. glutamicum* cultivé à 33 et à 39°C en mode discontinu.

A 33°C, en culture discontinue, l'ajout de l'oléate ou du palmitate jusqu'à 0,2 g/l n'affecte pas significativement la croissance et la production de glutamate (tableau récapitulatif V-1); en revanche à une concentration de 2 g/l, ces acides gras inhibent la croissance. Lorsqu'une molécule tensioactive dérivée du palmitate est ajoutée dans le milieu de culture pour induire la production de glutamate, cette molécule est absorbée et clivée par les cellules pour donner l'acide gras

correspondant (Huchenq et al., 1984). La partie chargée du tensioactif n'induit pas la production de glutamate mais elle permet de disperser le tensioactif dans le milieu de culture. En effet, c'est l'acide gras saturé (le palmitate) du tensioactif qui induit l'excrétion de glutamate (Naji et al., 2000). Il est probable que l'ajout de palmitate à 2 g/l dans le milieu de culture ait le même effet, mais de façon moins importante que pour un tensioactif à cause de sa faible solubilité. Récemment, Kimura et al. (1999) ont mis en évidence la répression du gène *dtsR*, codant probablement pour une protéine participant à la formation du complexe protéique catalysant la biosynthèse des acides gras par le tween 40. L'inhibition de la croissance par l'ajout de palmitate peut donc être expliquée par l'inhibition de la synthèse des acides gras nécessaires pour la croissance. Quant à l'ajout de l'oléate à 2 g/l, nous constatons que l'inhibition complète de croissance est due à la concentration trop forte de cet acide gras.

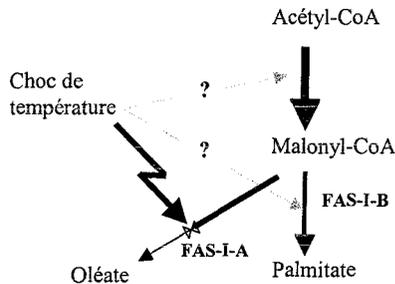


Figure V-7 : effet de la température sur la synthèse des acides gras chez *C. glutamicum* 2262.

A 39°C, la croissance est fortement inhibée, alors la concentration de biomasse finale est fortement réduite (Tableau V-1). A cette température, l'apport d'une faible concentration en oléate ou palmitate permet de restaurer la croissance cellulaire. Ceci indique que le choc de température limite la synthèse des acides gras nécessaires pour la croissance. Cependant, l'ajout de l'oléate augmente fortement la formation de biomasse, tandis que l'apport de palmitate n'améliore que faiblement la croissance. Ce résultat est en accord avec les résultats de Gourdon (1999) qui a observé une diminution de la teneur en acide oléique cellulaire après le choc de température à 39°C pendant la

fermentation semi-continue. Il semblerait donc que l'augmentation de la température de culture exerce un effet négatif sur le système FAS-I-A qui est responsable à la formation de l'oléate (figure V-7). L'inhibition de l'activité catalytique du système enzymatique FAS-I-A par l'augmentation de la température a été montrée *in vitro* par Kawaguchi et al. (1979). Cependant, nous ne pouvons pas encore identifier l'enzyme exacte qui est inhibée par le choc de température.

• **Effet de l'oléate et du palmitate sur la production de glutamate par *C. glutamicum***

2262

Pour toutes les cultures à 33 et à 39°C, l'apport de l'oléate dans le milieu de culture ne permet pas d'augmenter la production de glutamate, pas contre il réduit la production de glutamate à 39°C (tableau récapitulatif V-1). Ceci peut être expliqué par l'augmentation de la croissance pendant la culture à 39°C en présence de l'oléate qui dirige un flux carboné partiel vers la synthèse de biomasse.

	Glutamate produit, g/l (à 24 h de culture)	
	Témoin	Ajout du palmitate
Fermentation discontinue à 33°C	0	6,5 *
Fermentation semi-continue à 39°C	80	104 **

Tableau V-2 : effet du palmitate sur la production de glutamate.

Palmitate (*) : 2 g/l, (**) : 0,2 g/l.

A 33°C en mode discontinu en présence 2 g/l de palmitate, comme à 39°C en mode semi-continu avec 0,2 g/l de palmitate dans le milieu de culture, une amélioration de la production de glutamate comparé au témoin peut être mesurée (tableau récapitulatif V-2). Ceci se traduit lors du procédé semi-continu par un maintien sur une période plus longue de la vitesse spécifique de production de glutamate. En fermentation semi-continue à 39°C, l'ajout 0,2 g/l de palmitate permet de produire du glutamate de 140 g au lieu de 90 g à 24 h de culture (figure V-5C).

Ce phénomène n'est pas observé en mode discontinu en fiole d'Erlenmeyer probablement car le pH des cultures n'est pas régulé. Le pH lors de culture discontinue a chuté à environ 4 et a probablement eu un effet sur la croissance et la production de glutamate.

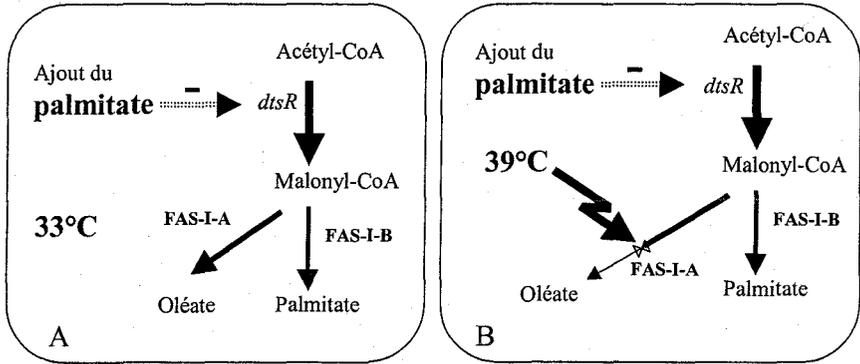


Figure V-8 : effet du palmitate et de la température sur la voie biosynthèse des acides gras chez *C. glutamicum* 2262. A : 33°C, B : 39°C.

L'augmentation de la production de glutamate en présence de palmitate à 33 et 39°C peu être due à l'effet décrit par Kanzaki et al. (1967), qui observent une augmentation de la production de glutamate lorsque les cellules présentent une teneur réduite en oléate par rapport au palmitate. Ces résultats sont également en accord avec les travaux de Takinami et al. (1968), qui ont mis en évidence une augmentation de la production de glutamate en présence de tensioactif dérivé de palmitate mais pas en présence de tensioactif dérivé d'oléate. Le palmitate dans le milieu de culture va donc probablement s'intégrer dans la paroi de *C. glutamicum* par conséquent augmenter le rapport d'acide gras saturé/insaturé. Une conséquence, sera le maintien de la vitesse spécifique de production de glutamate sur une période beaucoup plus longue à 39°C. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure un effet répresser du palmitate sur les gènes responsables de la synthèse d'enzymes (ou de sous-unités enzymatiques) impliqués dans la synthèse des précurseurs d'acides gras. En effet, le tween 40 (dérivé du palmitate) réprime l'expression du gène *dtsR* (Kimura et al., 1999) (figure V-8A et V-8B).

La température de 39°C permet d'amplifier l'augmentation du rapport d'acide gras saturé/insaturé en présence de palmitate, car la synthèse d'oléate est inhibée (le complexe FAS-I-A) par l'élévation de la température (Kawaguchi et al. 1979 ; Stuible et al., 1996 ; Stuible et al., 1997) (figure V-8B). Cette augmentation peut être donc à l'origine du maintien de la vitesse spécifique de production de glutamate sur une période beaucoup plus longue à 39°C.

V.2. Etude de la fluidité de la paroi de *C. glutamicum* 2262 producteur de glutamate

La première partie de ce chapitre a permis d'avoir une meilleure connaissance de l'effet du choc de température sur le métabolisme des acides gras nécessaires pour la synthèse de la bicouche de phospholipides. La couche d'acides mycoliques, qui se situe à l'extérieur de la couche de phospholipides, joue un rôle de barrière plus ou moins fluide chez *Mycobacterium*. Toutefois, l'étude de son rôle lors du processus de production de glutamate par *C. glutamicum* n'est pas encore effectuée. Afin de caractériser les modifications de cette couche chez *C. glutamicum* 2262 pendant la production de glutamate induite par le choc de température, nous avons utilisé la sonde TMA-DPH, chargée positivement ; cette sonde fluorescente permet de mesurer sa fluidité puisqu'elle ne pourra pas (ou très mal) traverser cette couche lipidique externe. La méthode de mesure a été optimisée pour cette bactérie, elle est détaillée dans le chapitre Matériels et Méthodes. Dans ce travail, nous avons mesuré la valeur d'anisotropie qui est inversement proportionnelle à la fluidité de la paroi de *C. glutamicum* 2262. Le temps de vie de la sonde TMA-DPH a été également vérifié afin de valider les valeurs d'anisotropie obtenues.

L'article dans cette partie est l'étude de la fluidité de *C. glutamicum* 2262 au cours du procédé de production de glutamate par le choc de température en modes semi-continu et discontinu. Des significatives corrélations entre la température de culture et la fluidité de la paroi cellulaire, ainsi qu'entre la fluidité de la paroi cellulaire et la vitesse spécifique de production de glutamate ont été obtenues.

Article : étude de la fluidité de la paroi cellulaire de *C. glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique

Cell wall fluidity modification for an effective glutamate excretion
in *Corynebacterium glutamicum* 2262

Dimitrios Bokas^a, Davin Uy^a, Stéphane Delaunay^b, Pierre Germain^b, Jean-Marc Engasser^b,
Guy Duportail^c, Mireille Donner^d and Jean-Louis Goergen^{a*}

^aLaboratoire des Sciences du Génie Chimique - CNRS and ^bLaboratoire Bioprocédés Agro-alimentaires - ENSAIA. Institut National Polytechnique de Lorraine - 2, Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

^cLaboratoire de Biophysique, URA 491 du CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur de Strasbourg. BP 24. 67401 Illkirch Cedex, France

^dLaboratoire de Nutrition et Maladies Métaboliques, EA3446, Faculté de Médecine, BP 184. 9, avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

* Corresponding author. Tel.: +33-3-8359-5844; fax: +33-3-8359-5804.

E-mail address: Jean-Louis.Goergen@ensaia.inpl-nancy.fr

Projet de publication

Abstract: TMA-DPH was used to assess the cell wall fluidity of *Corynebacterium glutamicum* 2262 during the temperature triggered glutamate producing process. Because the fluorescence life time of TMA-DPH was constant all over the process, fluorescence anisotropy might reflect the cell wall fluidity. As a consequence of the chemical structure of TMA-DPH, corynomycolic acid layer was probably the target of the probe. When the temperature of the fed-batch culture was increased from 33 to 39°C to induce glutamate excretion, the fluidity of the cell wall increased (corresponding to a decrease in fluorescence anisotropy value from 0.212 to 0.186), while the specific glutamate

production rate attained its maximal value of 0.55 g/g.h. The increase in fluidity of *C. glutamicum* cell wall was not due to the physical effect of the temperature elevation, but might be an alteration of the composition of the cell wall. When the bacteria were cultivated at 33, 36, 38 and 39°C in batch cultures, a linear relationship was obtained between the maximum specific glutamate production rate and the cell wall fluidity. This suggests that the fluidity of the cell wall play an important role in glutamate excretion by *C. glutamicum* 2262 during the temperature-triggered process.

Keywords: fluidity, excretion, glutamate, *Corynebacterium glutamicum*, temperature

1. Introduction

To improve glutamate production, the identification of the limiting steps is important, while the understanding of the factors controlling those limiting steps will be crucial. Recent data suggested that a major kinetic bottleneck is likely located at the level of glutamate excretion. In fact, a six fold increase in glutamate excretion flux is measured when the glutamate export system is activated by a temperature shift during the temperature triggered process (Delaunay et al., 1999; Lapujade et al., 1999) and the amplification of the last synthesis step (glutamate dehydrogenase) yielded a higher intracellular glutamate titer but an identical excretion rate in *Corynebacteria* (Börmann-El Kholly et al., 1993; Lapujade, 2000; Lapujade et al., 1999). Besides, a high internal accumulation of glutamate can be measured, even under the fastest excretion conditions. To identify the parameters modulating the glutamate efflux in *C. glutamicum*, modification of the composition of the membrane, of the cellular energy and of the membrane potential of producing and non-producing cells have been carried out. The recent finding has shown that the cellular energy was needed for an active glutamate excretion (Gutmann et al., 1992; Sekine et al., 2001), whereas the alteration of membrane potential did not affect the glutamate production (Gutmann et al., 1992; Lapujade, 2000).

Many papers have contributed to the understanding of the mechanisms responsible for glutamate excretion. In biotin limitation or surfactant processes, it was proposed that the modification of cytoplasmic membrane phospholipids such as an increase in the ratio (saturated to

unsaturated) fatty acids (Demain and Birnbaum, 1968; Shibukawa and Ohsawa, 1966, Marquet et al., 1986), or a decrease in phospholipids (Clément et al., 1984; Clément and Lanéelle, 1986; Huchenoq et al., 1984) or a decrease in total lipids (Hoischen and Krämer, 1990) are necessary for glutamate excretion. Besides, during the glutamate production phase of the temperature triggered process, though a reduction of the total lipids content was not observed, an increase in the ratio (saturated/unsaturated) fatty acids was measured (Gourdon, 1999).

On the other hand, the glutamate excretion by penicillin addition is not related to any modification of the composition of cytoplasmic membrane (Shibukawa et al., 1968). In fact, the modification of the arabinogalactan-peptidoglycan structure upon penicillin addition might explain the glutamate excretion as swelling of the glutamate-producing cells occurred (Shibukawa et al., 1968) as a result of the arabinogalactan-peptidoglycan network weakening (Wijayarathna et al., 2001). In addition, an *alr*-disrupted mutant (gene encoding for D-alanine racemase, which generates D-alanine necessary for the formation of the arabinogalactan-peptidoglycan network) was able to excrete glutamate in a D-alanine deficient medium (Eggeling et al., 2001).

Another hypothesis is the glutamate excretion as a result of a modification of the glutamate biosynthesis pathway. Kimura (2002) suggested that the glutamate efflux might be principally due to a change in cell metabolism at the 2-oxoglutarate branch point since a mutant deficient in 2-oxoglutarate dehydrogenase activity was capable to excrete highly the glutamate without any stress and presented a comparable fatty acid composition to its parent strain.

At last, cell wall fluidity has recently been identified as a key factor of the glutamate excretion process. A temperature sensitive mutant of *C. glutamicum* KY9714 has recently been shown to be able to produce high amounts of glutamate at higher temperature (37°C): that mutant was generated by a mutation on *ItsA* gene, probably involved in cell wall fluidity regulation (Hirasawa et al., 2000).

However, only few data on the fluidity of the lipids of glutamate producing *C. glutamicum* have been reported. It demonstrated that the fluidity of extracted lipids of *C. glutamicum* membrane was not modified during the glutamate excretion induced by local anesthetic (Lambert et al., 1995), while the modification of the cell wall fluidity of *Brevibacterium* sp. ATCC 13869 measured during growth and glutamate production induced by biotin limitation could not be evidenced since irregular values of fluorescence anisotropy were measured during their experiences (Neubeck et al., 1993).

In the present paper, we investigated the fluidity of cell wall during growth and glutamate overproduction of *C. glutamicum* 2262 triggered by increasing in culture temperature from 33 to 39°C. The anisotropy and the lifetime of the probe fluorescence have been measured for evaluating the fluidity of cell wall. The effects of culture temperatures (33,36,38 and 39°C) on the fluidity of cell wall and on the specific glutamate production rate were assessed.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and medium composition

The strain used throughout this study was *Corynebacterium glutamicum* 2262. The composition of the glutamate production medium used was based on MCGC medium (Von der Osten et al., 1989) in which the citrate was replaced by deferoxamine. This medium consisted of: glucose (60 g l⁻¹), Na₂HPO₄ (3 g l⁻¹), KH₂PO₄ (6 g l⁻¹), NaCl (2 g l⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (8 g l⁻¹), MgSO₄ · 7 H₂O (0.4 g l⁻¹), FeSO₄ · 7 H₂O (40 mg l⁻¹), FeCl₃ (4 mg l⁻¹), ZnSO₄ · 7 H₂O (1 mg l⁻¹), CuCl₂ · 2 H₂O (0.4 mg l⁻¹), MnSO₄ · H₂O (4 mg l⁻¹), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O (0.2 mg l⁻¹), Na₂B₄O₇ · 10 H₂O (0.4 mg l⁻¹), CaCl₂ (84 mg l⁻¹), biotin (2 mg l⁻¹), thiamine (20 mg l⁻¹), deferoxamine (3 mg l⁻¹), glycine betaine (2 g l⁻¹). Polypropylene glycol (1.3 g l⁻¹) was used as anti-foaming agent. The additional amounts of glucose were added, as required, during the production phase.

2.2. Fermentation conditions

The inoculum was grown in shake-flask cultures at 33°C in the modified MCGC medium, supplemented with Na₂HPO₄, 3.8 g l⁻¹ and 1.9 g l⁻¹ urea. The glucose concentration was diminished to 34 g l⁻¹ and pH was set at 7.6 with NaOH.

For fed-batch cultures, 40 ml of this overnight culture of *C. glutamicum* were used to inoculate a 2 liters bioreactor (Biolafitte, France) containing 0.75 l of modified MCGC. The culture was grown at 33°C with an air rate of 60 l h⁻¹. The pH set point was 7.6, regulated with NH₃ 12N. When the biomass concentration reached 5.6 g l⁻¹, corresponding an exponential phase, the culture temperature was increased to 39°C to induce glutamate production. During the production phase, the

culture was pulsed with a concentrated glucose solution (500 g l^{-1}) so as to avoid periods of glucose limitation. The dissolved oxygen was kept at least 20% of saturated level for avoiding oxygen limitation by increasing in air flow rate and agitation all over the culture.

For studying the effect of temperature on fluidity of cell wall and specific glutamate production rates, batch cultures were performed with the same condition of fed-batch culture. To avoid the effect of product inhibition, a small amount of inoculum was used to inoculate the bioreactor for obtaining an OD_{570} of 0.4 at the beginning of the diluted culture. The culture temperature was set at 33°C for 4 hours to reach the exponential phase of growth and was then changed to 33, 36, 38 or 39°C to induce glutamate excretion.

2.3. Analytical methods

During the fermentations, samples were collected to determine biomass, glucose and glutamate concentrations. The cell concentration was determined by absorbance at 570 nm (Spectrophotometer) and by a direct gravimetric method. After centrifugation of the sample (13,000 RPM, 5 min, Microfuge lite, Beckman), the amount of glutamate and glucose were enzymatically determined on the supernatant (Roche, Germany).

2.4. Fluorescence measurements of bacterial cell wall

Fluorescence intensity and anisotropy

Fluorescence intensity (arbitrary unit) and anisotropy measurements of cells and cells labeled with 1-(4-(Trimethylammonium)-phenyl)-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH) were carried out with Fluofluidimeter (AFFIBIO, France) based on Kuhry et al. methods (1983 and 1985). Samples collected from the culture was diluted in a buffer consisting of: Na_2HPO_4 (3 g l^{-1}), KH_2PO_4 (6 g l^{-1}), NaCl (2 g l^{-1}) and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (8 g l^{-1}), $\text{pH} = 7.6$ to obtain cell optic density of 1. Diluted cell suspension of 3 ml was labeled with $3 \mu\text{l}$ of TMA-DPH solution (prepared in N,N dimethylformamide, 2 mM) for 5 min. Excitation and emission wavelengths were respectively 365 and 425 nm. The temperature of labeled and blank samples was rigorously controlled during the

measurement and the anisotropy was measured at the culture temperature. Five measurements were taken for each sample. The steady state fluorescence intensity was determined according to $FI = ((I_{//} - g I_{\perp}) / (I_{//} + g I_{\perp}))$, where g is an instrumental correction factor accounting for the photomultiplier's balance, and $I_{//}$ and I_{\perp} are the emission intensities of the labeled sample, subtracted from the blank sample, with polarizers respectively parallel and perpendicular to the direction of the vertically polarized excitation light. The steady state fluorescence anisotropy (r) was defined as a reciprocal measure of fluorophore mobility in the cell membrane; a higher anisotropy reflects a lower mobility of the labeled environment. The fluorescence anisotropy (r) was calculated by $(r) = (I_{//} - g I_{\perp}) / (I_{//} + 2 g I_{\perp})$. The reproducibility of the anisotropy measurement within a given fivefold determination of 5 independent samples was ± 0.002 .

Fluorescence lifetime

TMA-DPH fluorescence lifetime (τ_f) was determined on similarly prepared samples with SLM 48000 phase and modulation spectrofluorimeter (SLM 48000, USA) equipped with a 450 W xenon lamp as a light source. The modulation frequencies of the exciting light classically ranged from 5 to 90 MHz. The mobility of TMA-DPH in the lipid media which represents the fluidity of cell wall, according to Perrin equation, is dependent on the fluorescence anisotropy and lifetime of the probe.

3. Results

3.1. TMA-DPH staining and fluorescence anisotropy measurement

TMA-DPH at a concentration of 2 μM was used to stain *Corynebacteria* samples with an OD_{570} of 1. The measured fluorescence intensities of the samples are reported in figure 1. Due to the chemical characteristics of TMA-DPH and the biochemical structure *Corynebacteria* cell wall, we suggest that this probe remains anchored to the mycolic acid layer and can not reach the cytoplasmic membrane. Whatever the temperature tested, for staining durations below 5 min, the fluorescence varies with time, whereas at higher incubation time it remains constant for more than 25 min. These

results are in accordance with data presented by Kuhry et al. (1983). Thus staining of the cells was performed during 5 min in presence of TMA-DPH. Fluorescence intensity of TMA-DPH stained *Corynebacteria* was shown to vary with the temperature of the assay : respectively 1150 and 1000 AU at 33 and 39°C. The decrease in fluorescence intensity at 39°C, compared to 33°C, was due to the higher fluorochrome mobility at higher temperature.

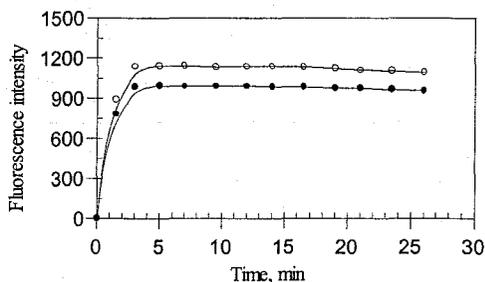


Figure 1: incorporation kinetics of TMA-DPH into the cell wall of *C. glutamicum* 2262 at 33 (o) and 39°C (●).

In order to test the effect of the incubation temperature on the measured anisotropy, anisotropy of stained cells was determined at 33 and 39°C. It appeared that a 6°C increase in incubation temperature led to a 0.01 decrease in anisotropy value.

	Anisotropy determined at	
	33°C	39°C
Cells cultured at 33°C (growth exponential phase)	0.213 +/- 0.002	0.200 +/- 0.002
Cells cultured at 39°C for 4 h	0.195 +/- 0.002	0.187 +/- 0.002

Table 1: effect of temperature on anisotropy measurement of *C. glutamicum* 2262 cultured at 33 and 39°C.

Besides, we observed that an increase in culture temperature significantly decreased the fluorescence anisotropy though the measurements were carried out at 33 or 39°C (Table 1). Therefore, staining of the cells and fluorescence anisotropy measurement were performed at a temperature identical to the culture temperature.

3.2. *C. glutamicum* 2262 kinetics and cell wall fluidity in glutamate producing fed-batch culture

When *C. glutamicum* was cultivated at 33°C, the specific growth rate increased rapidly and attained a maximum value of 0.58 h⁻¹ after 4 h of culture (fig. 2).

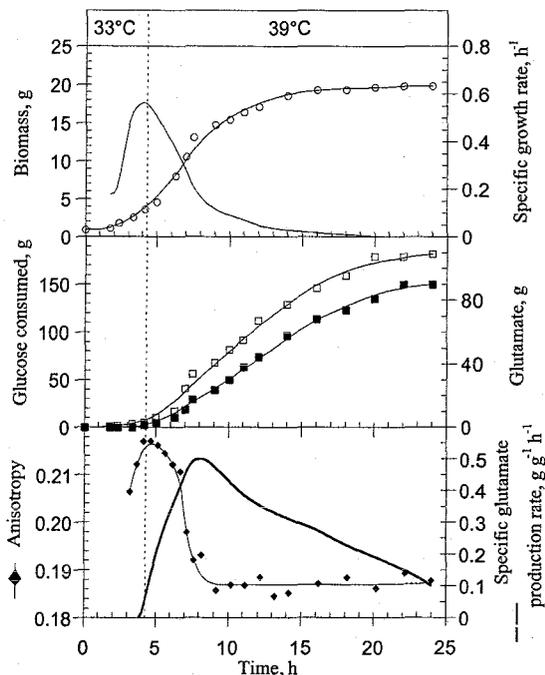


Figure 2: kinetics of *C. glutamicum* 2262 of fed-batch culture: biomass (○), glucose (□), glutamate (■), anisotropy (◆), specific growth (—) and glutamate production rate (—). The vertical dashed line indicates the time when the temperature is increased from 33°C to 39°C.

During this period, glutamate was not produced and fluidity remained at a low level, corresponding to the highest anisotropy value measured ($r = 0.21$). When the temperature of the fed-batch was kept at 33°C all over the process, the biomass increased rapidly till the oxygen was limiting in the culture vessel. For those culture conditions, glutamate production was not observed and the fluorescence anisotropy remained constant at about 0.21 during the whole culture (data not shown). On the other hand, when, after a 4 h period, the temperature was increased from 33 to 39°C to induce the glutamate production, growth was rapidly reduced and practically abolished between 15 and 24 h of culture; glutamate was excreted and attained a final amount of 90 g, corresponding to 180 g of glucose consumed after 24 h of culture. The specific glutamate production rate increased sharply to its maximum level ($0.55 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) after 4 h of culture at 39°C; this parameter then decreased gradually to reach $0.1 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at the end of the culture. Though the culture temperature was increased from 33 to 39°C, no decrease in fluorescence anisotropy was measured during at least 1 h upon temperature change. Then, after 5h of culture, the fluorescence anisotropy of the cell wall decreased from the maximum value of 0.215 to 0.186 and was then maintained at this low level until the end of the culture. Because the anisotropy value can be affected by the probe lifetime (according to Perrin's equation), fluorescence lifetime of TMA-DPH was measured all over the fermentation. In fact, the same fluorescence lifetime (2.95 ns) was measured all over the process indicating that the fluorescence anisotropy reflected directly the fluidity of the cell wall.

Cells collected at	Glutamate excretion activities after 4 h of culture at 39°C
6 h	100%
9 h	100%
18 h	106%

Table 2: specific glutamate production rate of cells collected from the fed-batch culture at different culture times and submitted to diluted culture at 39°C with fresh medium.

It is important to note that the decrease in specific glutamate production rate for the period between 8 and 24 h of culture, while a constant fluorescence anisotropy was measured, was mainly

due to an inhibition by extracellular glutamate (Lapujade, 2000; Nunheimer et al., 1970) as cells collected at 6, 9 and 18 h of the culture exhibited the same rate of glutamate excretion when incubated in a fresh medium (Table 2).

3.3. Effect of culture temperature on cell wall fluidity

In order to assess the relation existing between the fluidity of the cell wall, the temperature of the process and the specific glutamate production rate, *C. glutamicum* 2262 was cultivated in batch process at 33, 36, 38 and 39°C. The cultures were initiated at 33°C by inoculating small amount of seed in order to avoid the inhibitory effect of extracellular glutamate on glutamate excretion (see in the materials and methods section).

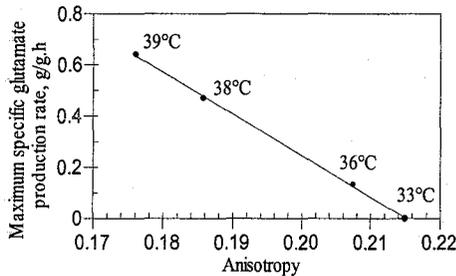


Figure 3: relation of fluorescence anisotropy of cell wall and maximum specific glutamate production rate of *C. glutamicum* 2262 cultivated at 33, 36, 38 and 39°C.

When the maximum specific growth rate was reached, 4 h after cell inoculation, the temperature was set at 33, 36, 38 or 39°C. Cell growth and glutamate production were followed during 10 h. The maximum specific glutamate production rates were measured approximately 4 h upon temperature shift and remained stable for several hours (data not shown). It appeared that the highest specific glutamate production rate correlated with the highest temperature and the highest cell wall fluidity (corresponding the lowest anisotropy value). When the maximum specific glutamate production rate of these cultures was plotted against the fluorescence anisotropy, a linear relationship was observed (fig. 3).

4. Discussion

Fluorescence anisotropy measured with TMA-DPH (that might remain in the outer mycolic acid layer) shall not necessarily correlate with plasma membrane fluidity. In fact, an increase in the saturated/insaturated fatty acid ratio observed in *C. glutamicum* 2262 (Gourdon, 1999) might decrease the fluidity whereas the temperature *per se* should increase that parameter. In *Escherichia coli* or *Oenococcus oeni*, a temperature increase (from 30 to 45°C for *E. coli* and from 30 to 42°C for *O. oeni*) of the medium, might have provoked an immediate increase in membrane fluidity, which was then restored to the initial value after a few hours of heat exposure (Mejia et al., 1999; Tourdot-Maréchal et al., 2000).

It appeared that mycolic acid bilayer fluidity that determines the global cell wall fluidity in *Mycobacterium* (Liu et al. 1996) increases after several hours of temperature up-shock during the temperature triggered glutamate producing fed-batch process. Contrary to the data shown in Fig. 1 or Table 1, no decrease in fluorescence anisotropy was measured during at least 2 hours upon temperature change. In fact, Corynebacteria might be capable to quickly adapt to the temperature change through enzymes activation phenomenon involving enzymes responsible for the saturation or *cis/trans* isomerization (Cronan, 2002) of the corynomycolates. Then, after 2 hours of culture at 39°C, cell wall fluidity increases probably as a consequence of the modification of the corynomycolate bilayer composition.

Cell wall fluidity increased dramatically to attain a maximum and stable value 4 h after the temperature up-shift, when the highest specific glutamate excretion rate was measured. The specific glutamate production rate then decreased as a consequence of extracellular metabolite accumulation such as glutamate (Lapujade, 2000; Nunheimer et al., 1970). Besides, an increase in the specific glutamate production rate was measured as *C. glutamicum* 2262 cell wall fluidity rose for the different temperatures tested from 33 to 39°C. Those results are in agreement with the data of Hirasawa et al. (2000) who measured a significant production of glutamate by a temperature sensitive mutant of *C. glutamicum* mutated in *ltsA*, a gene probably involved in cell wall fluidity regulation.

Thus, though, the cytoplasmic membrane, *via* a modification of the composition of that bilayer (Marquet et al., 1986; Clément et al., 1984; Clément and Lanéelle, 1986; Huchencq et al.,

1984; Hoischen and Krämer, 1990) or an activation of activities of the glutamate biosynthesis pathway (Kimura, 2002), or the modification of the arabinogalactan-peptidoglycan layer (Eggeling et al., 2001; Shibukawa et al., 1968) might be involved in the glutamate excretion by *C. glutamicum* 2262, the modification of cell wall fluidity seems to play an important role in glutamate excretion.

A deeper insight into corynomycolate composition of *C. glutamicum* 2262 as well as a better understanding of their synthesis mechanism and a modification of the corynomycolate layer (using drugs such as isonicotinic acid hydrazide (INH)) should give clues regarding the effect of the temperature on the cell wall during the temperature triggered process.

Acknowledgements

The authors thank Mohamed Younsi for helpful discussions.

References

- Börmann-El Kholy, E.R., Eikmanns, B.J., Gutmann, M., Sahn, H., 1993. Glutamate dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2329-2331.
- Clément, Y., Escoffier, B., Trombe, M.C., Lanéelle, G., 1984. Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. J. General Microbiol. 130, 2589-2594.
- Clément, Y., Lanéelle, G., 1986. Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. J. General Microbiol. 132, 925-929.
- Cronan, J.E. Jr., 2002. Phospholipid modifications in bacteria. Current Opinion Microbiol. 5, 202-205.

Delaunay, S., Gourdon, P., Lapujade, P., Mailly, E., Oriol, E., Engasser, J.M., Lindley, N.D., Goergen, J.L., 1999. An improved temperature triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme Microbial. Technol.* 25, 762-768.

Demain, A.L., Birnbaum, J., 1968. Alteration of permeability for the release of metabolites from microbial cell. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 46, 1-25.

Eggeling, L., Krumbach, K., Sahm, H., 2001. L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or tween addition doing the same? *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 67-68.

Gourdon, P., 1999. Etude physiologique d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* productrice d'acide glutamique: quantification des flux métaboliques et des contraintes biochimiques en phase de production. Ph.D. Thesis, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.

Gutmann, M., Hoischen, C., Krämer, R., 1992. Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* 1112, 115-123.

Hirasawa, T., Wachi, M., Nagai, K., 2000. A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* *ilsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. *J. Bacteriol.* 182, 2696-2701.

Hoischen, C., Krämer, R., 1990. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 172, 3409-3416.

Hucheng, A., Marquet, M., Welby, M., Montrozier, H., Coma, G., Lanéelle, G., 1984. Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol.* 135, 53-67.

Kimura E., 2002. Triggering mechanism of L-glutamate overproduction by *dtsR1* in coryneform bacteria. *J. Biosci. and Bioeng.* 94, 545-551.

Kuhry J.G., Duportail G., Bronner C., Laustriat G., 1985. Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene. *Biochim. Biophys. Acta* 845, 60-67.

Kuhry, J.G., Fonteneau, P., Duportail, G., Maechling, C., Laustriat, G., 1983. TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophysics* 5, 129-140.

Lambert, C., Erdmann, A., Eikmanns, M., Krämer, R., 1995. Triggering glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulating the membrane state with local anesthetics and osmotic gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4334-4342.

Lapujade, P., Goergen, J.L., Engasser, J.M., 1999. Glutamate excretion as a major kinetic bottleneck for the thermally triggered production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 1, 255-261.

Lapujade, P., 2000. Etude cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate: importance du contenu cellulaire et de l'étape d'excrétion de glutamate. Ph.D. thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

Liu, J., Barry, C.E., Besra, G.S., Nikaido, H., 1996. Mycolic acid structure determines the fluidity of the Mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* 271, 29545-29551.

Marquet, M., Uribelarrea, J.L., Hucheng, A., Lanéeelle, G., Goma, G., 1986. Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum*: a study of glutamate accumulation during a fermentation course. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 220-223.

Mejía, R., Gómez-Eichelmann, M.C., Fernández, M.S., 1999. *Escherichia coli* membrane fluidity as detected by excimerization of dipyrrenylpropane : sensitivity to the bacterial fatty acid profile. Arch. Biochem. Biophys. 368, 156-160.

Neubeck, M., Prenner, E., Horvat, P., Bona, R., Hermetter, A., Moser, A., 1993. Membrane fluidity in glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium* sp. ATCC 13869. Arch. Microbiol. 160, 101-107.

Nunheimer, T.D., Birbaum, J., Ihnen, E.D., Demain, A.L., 1970. Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. Appl. Microbiol. 20, 215-217.

Sekine, H., Shimada, T., Hayashi, C., Ishiguro, A., Tomita, F., Yokota, A. 2001. H⁺-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolished glutamic acid production with enhancement of glucose production rate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 534-540.

Shibukawa, M., Ohsawa, T., 1966. L- glutamic acid fermentation with molasses. Part VI. Effect of the saturated-unsaturated fatty acid ratio in the cell membrane fraction on the extracellular accumulation of L-glutamate. Agric. Biol. Chem. 30, 750-758.

Shibukawa, M., Kurima, M., Okabe, S., Ohsawa, T., 1968. L- glutamic acid fermentation with molasses. Part X. On the difference in mechanisms for the bacterial extracellular accumulation of L- glutamate between fatty acid derivative and penicillin. Agric. Biol. Chem. 32, 641-645.

Tourdot-Maréchal, R., Gaboriau, D., Beney, L., Diviès, C., 2000. Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus Oeni*. Intern. J. Food Microbiol. 55, 269-273.

Von der Osten, C.H., Gioannetti, C., Sinskey, A.J., 1989. Design of a defined for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. Biotechnol. Lett. 11, 11-16.

Wijayarathna, C.D., Wachi, M., Nagai, K., 2001. Isolation of *fsl* and *murE* genes involved in peptidoglycane synthesis from *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55, 466-470.

V.3. Discussion

L'excrétion de glutamate est considérée comme une étape clé, probablement l'une des plus limitantes pour la production de glutamate (Lapujade et al., 1999). Il est admis que cette étape est effectuée par un transporteur spécifique dépendant de l'énergie cellulaire (ATP) mais indépendant du potentiel membranaire (Duperay et al., 1992 ; Gutmann et al., 1992 ; Hoischen et Krämer, 1989 ; Krämer, 1994 ; Lapujade, 1999 ; Sekine et al., 2001). Ce système permet de pomper le glutamate intracellulaire vers le milieu extracellulaire contre le gradient de glutamate entre les deux compartiments. Toutefois, le gène de l'exporteur de glutamate n'a pas encore été cloné. Alors que le procédé de production de glutamate est extrêmement bien contrôlé, les mécanismes physiologiques et métaboliques responsables de l'excrétion commencent seulement à être identifiés. Le mécanisme d'activation du transporteur lui-même reste encore inconnu.

Le transporteur à glutamate, enchâssé dans la membrane plasmique est activé après choc température. Nous avons l'évidence que le choc de température inactive la synthèse de l'oléate nécessaire pour la croissance. Ceci provoque une augmentation du rapport d'acides gras saturés/insaturés observé par Gourdon (1999). Il est très probable que la température inactive le système FAS-I-A responsable de la synthèse des acides gras insaturés, car l'activité de ce système est inactivée, *in vitro*, par une élévation de la température (Kawaguchi et al., 1979 ; Stuible et al., 1996 ; Stuible et al., 1997). Nous avons recrée cette situation en ajoutant du palmitate dans le milieu des cultures discontinuée à 39°C, ce qui a permis d'augmenter la production de glutamate.

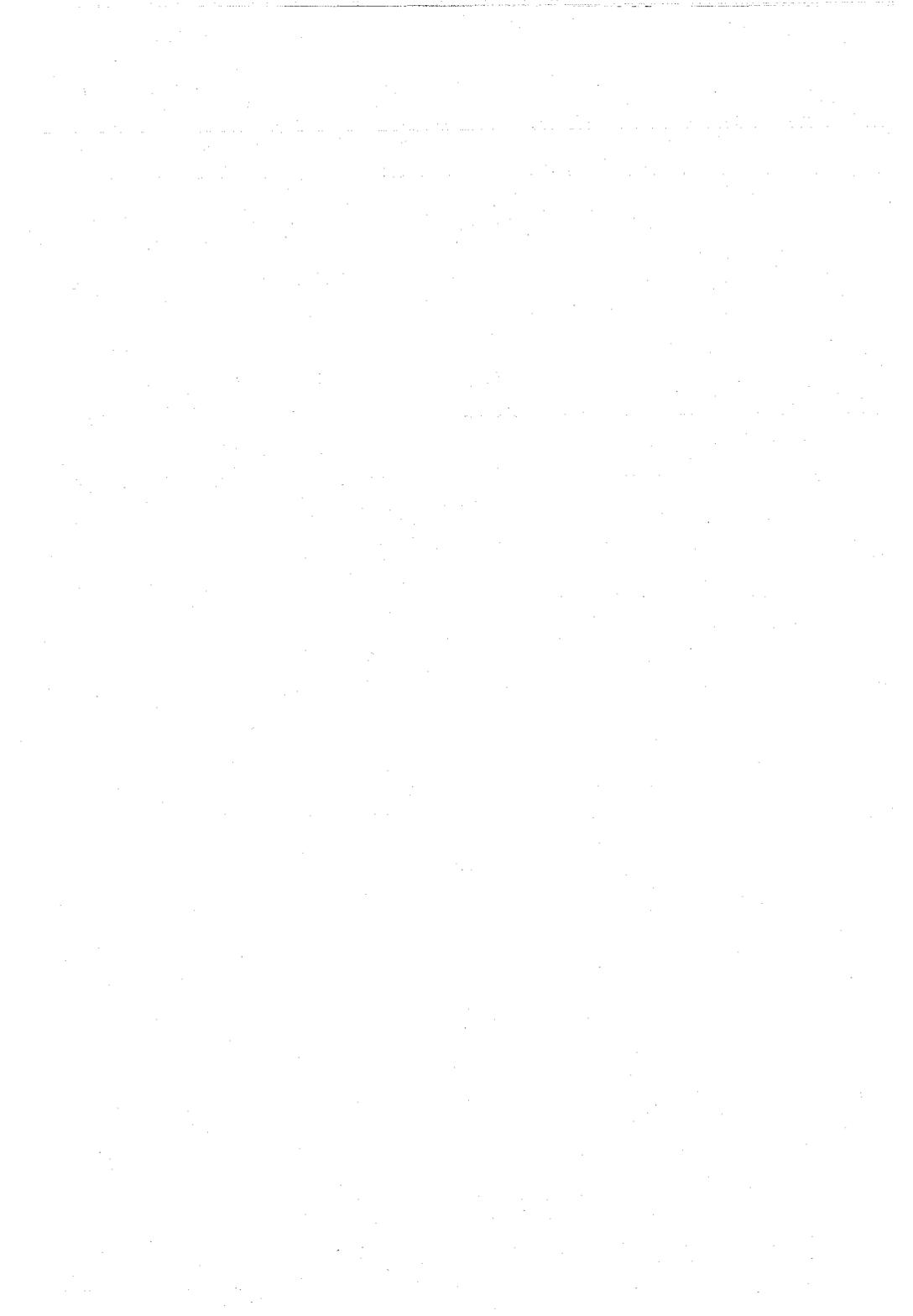
Le réseau d'arabinogalactane-peptidoglycane n'a pas été étudié lors de cette étude, mais nous pouvons estimer que cette couche est modifiée par le choc de température chez *C. glutamicum* 2262, car nous avons observé une réduction de la taille cellulaire pendant la phase d'excrétion de glutamate. Le phénomène observé est très différent de celui constaté lors des procédés utilisant une limitation de biotine (Kinoshita, 1985) ou ajout de pénicilline (Shibukawa et al., 1968) puisque dans

leurs cas, un gonflement cellulaire a été observé. En effet, le pénicilline peut jouer un rôle inhibiteur de la formation du réseau d'arabinogalactane-peptidoglycane, car l'activité de septum-peptidoglycane synthase peut être inactivée par la pénicilline (Wijayarathna et al., 2001). Par ailleurs, quand le gène *atr* est inactivé (gène codant pour D-alanine racemase qui fournit du D-alanine nécessaire pour la synthèse du réseau d'arabinogalactane-peptidoglycane), le glutamate peut être excrété lors de la culture en limitation de D-alanine (Eggeling et al., 2001). Bien que nous n'ayons à l'heure actuelle pas d'explications claires sur le rôle de cette structure dans l'excrétion de glutamate par *C. glutamicum* 2262, ces données suggèrent que la modification du réseau d'arabinogalactane-peptidoglycane pourrait être un facteur important.

La paroi des Corynébactéries est constituée d'une deuxième bicouche lipidique, la couche de corynomycolates. De nombreux travaux ont contribué à la compréhension du rôle de cette couche chez *Mycobacterium* (Liu et al., 1996 ; Minikin et al., 2002). Cette couche sert notamment de barrière contre les antibiotiques et des modifications de sa structure la rendent encore imperméable. Celle-ci est responsable de la fluidité de la paroi cellulaire (Liu et al., 1996). Lorsque le TMA-DPH a été utilisé pour mesurer la fluidité de la paroi cellulaire de *C. glutamicum* 2262, il est apparu que l'augmentation de la fluidité de la paroi cellulaire coïncide avec l'augmentation de la température de culture et une élévation de la vitesse spécifique de production de glutamate. Toutefois, l'augmentation de la fluidité de la paroi cellulaire n'est pas due à l'effet physique de la température mais serait fortement liée à la modification de la structure de la bicouche de corynomycolates dans laquelle le TMA-DPH va se fixer. Puisque la sonde TMA-DPH est chargée positivement et la valeur de fluorescence est stable pendant 25 min après le marquage, nous suggérons que cette sonde reste dans la couche d'acides mycoliques et ne peut pas marquer la membrane cytoplasmique (phospholipides) pendant la mesure de la valeur d'anisotropie. Cette hypothèse est en accord avec les rapports de Kuhry et al. (1983) qui ont observé que cette sonde ne peut traverser dans la couche lipidique à l'intérieur de la paroi cellulaire qu'après 30 min de marquage. L'augmentation de la fluidité de la paroi mesurée par TMA-DPH n'est donc pas en désaccord avec l'augmentation du rapport acides gras saturés/insaturés mesuré pendant la phase de production de la fermentation glutamique (Gourdon, 1999).

Chez *E. coli*, le choc de température augmente immédiatement la fluidité membranaire, mais les bactéries restaurent la fluidité initiale après quelque heures de culture (Mejià et al., 1999). Ce phénomène probablement bénéfique pour la production de glutamate, n'est pas observé chez *C. glutamicum* 2262. Récemment, lorsque le gène *ltsA* (gène codant pour une protéine qui participe probablement à la régulation de la rigidité de la paroi cellulaire) est inactivé chez *C. glutamicum*, le glutamate peut être excrété efficacement après le choc de température (Hirasawa et al., 2000).

Etant donnée que des liens physiologiques étroits existent entre les différentes couches de la paroi de *C. glutamicum* (membrane plasmique, arabinogalactane-peptidoglycane, bicouche d'acides mycoliques) (Eggeling and Sahm, 2001), la modification d'une couche peut perturber l'ensemble des autres couches de la paroi. C'est ainsi qu'une modification de la composition ou de l'état de la couche de corynomycolates peut affecter la fluidité de la membrane plasmique et par conséquent affecter les enzymes liées à la membrane telle que l'exporteur de glutamate ou les activités PDH et ODHC.



CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le comportement cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture continue et de le comparer à celui mesuré en culture semi-continue, d'étudier les modifications métaboliques et physiologiques des voies de biosynthèse du glutamate suite à une augmentation de température, et d'étudier les modifications de la paroi cellulaire de *C. glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique.

• Qu'apportent les études cinétiques en culture continue ?

□ Etudes cinétiques en croissance

Pendant la croissance à 33, 37 et 39°C (pour les cellules sélectionnées), le glucose est métabolisé pour être transformé principalement en biomasse. En conditions optimales de croissance, la vitesse spécifique de croissance de *C. glutamicum* 2262 peut atteindre $0,6 \text{ h}^{-1}$ à 33°C. En culture continue à 33 et à 37°C, la vitesse spécifique de croissance, la concentration de biomasse et le rendement de conversion de glucose en biomasse augmentent avec le taux de dilution.

La consommation de glucose augmente avec le taux de dilution lors de cultures à l'état stationnaire à 33 et à 37°C. La vitesse spécifique de consommation de glucose pour la maintenance, à l'état stationnaire à 33, 37 et à 39°C pour les cellules sélectionnées, sont respectivement de 0,06 ; 0,085 et 0,15 g/g.h. La consommation de glucose pour la maintenance provoque une diminution du rendement de conversion de glucose en biomasse pour les faibles taux de croissance de chaque température. Par ailleurs, l'augmentation de la vitesse spécifique de consommation de glucose pour la maintenance, due à l'augmentation de la température de culture, provoque une chute du rendement de conversion de glucose en biomasse pour un même taux de croissance. Toutefois, les cellules productrices de glutamate à 39°C ne consomment pas de glucose pour la maintenance à cette température puisque la croissance cellulaire est arrêtée.

□ Comportement cinétique de *C. glutamicum* 2262 en culture continue à 39°C

En fermentation continue à 39°C et à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, la croissance est rapidement inhibée après le choc de température ; les cellules passent d'un état de croissance à un état de production de

glutamate. Les cellules productrices de glutamate ont leur taille plus petite. Ceci est probablement dû à la modification de la couche arabinogalactane-peptidoglycane qui détermine la forme septum des bactéries. Une production de glutamate peut être obtenue tant que les cellules productrices ne sont pas été complètement lessivées du réacteur (150 h à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$). Ensuite, une sélection des cellules qui résistent à la température de 39°C , et qui possèdent une croissance et une taille plus élevée s'installent et prédominent ensuite dans la cuve.

Les données des fermentations continues nous permettent de confirmer les résultats observés par Lapujade (2000) concernant l'effet de la température sur la croissance et la production de glutamate et également de préciser le comportement de la production de lactate et de tréhalose (figure 1).

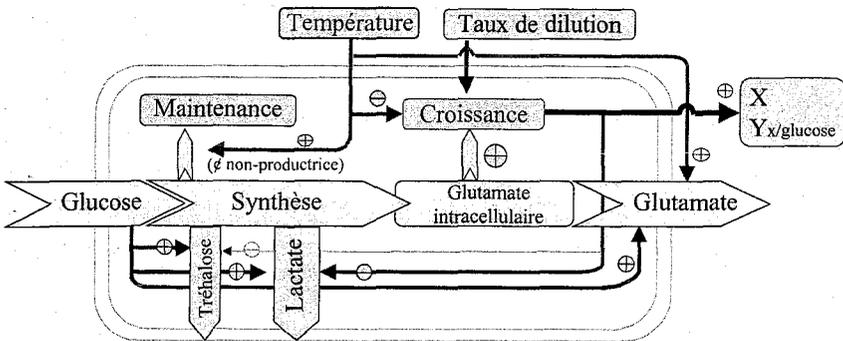


Figure 1 : effet de la température et du glucose sur le comportement macrocinétique de *C. glutamicum* 2262.

Comparée avec la fermentation semi-continue, la production de glutamate en fermentation continue peut être réalisée plus longtemps, car le glutamate s'accumule faiblement dans le milieu de culture ; la vitesse spécifique maximale de production de glutamate en fermentation continue est de $0,4 \text{ g/g.h}$ contre $0,6 \text{ g/g.h}$ en fermentation semi-continue et $0,8 \text{ g/g.h}$ en fermentation discontinue. Ceci est très probablement dû à la limitation de glucose nécessaire pour générer de l'énergie cellulaire pour le transporteur de glutamate durant les premières heures de la culture continue à 39°C , $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, mais aussi à l'augmentation de la population de cellules sélectionnées qui ne produisent pas ou quasiment pas de glutamate en présence d'un excès de glucose dans le milieu de culture. Cependant le rendement de conversion de glucose en

glutamate en fermentation continue à 39°C, $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ (de l'ordre de 0,5 g/g) reste assez comparable avec celui en fermentation semi-continue à 39°C.

La production de lactate en présence d'une concentration importante de glucose est liée à la chute de la croissance. Or la diminution de la croissance entraîne une chute de l'oxydation du NADH (Cocaign-Bousquet et al., 1996). Nous avons mis en évidence une forte diminution de la respiration pendant la phase de production de glutamate lorsque la croissance est fortement réduite ; ceci provoque probablement l'accumulation intracellulaire du NADH. Par ailleurs, nous avons observé une forte chute de l'activité PDH pendant la phase de production de glutamate. Ceci provoque probablement une accumulation du pyruvate simultanément à l'accumulation de NADH, et par voie de conséquence la formation de lactate. La coïncidence de la chute de respiration et de l'activité PDH peut être expliquée par le fait que la 3^{ème} sous-unité de PDH participe à la fois à la formation du complexe pyruvate déshydrogénase et au transfert des électrons vers la chaîne de respiratoire.

La production de tréhalose apparaît pendant la phase de production de glutamate. La vitesse spécifique de production de tréhalose est élevée lorsque la concentration de glucose dans le milieu de culture est élevée. Une forte concentration de glucose dans le milieu de culture provoque probablement l'accumulation du glucose-6P, précurseur de tréhalose. Le contrôle de la concentration de glucose est donc nécessaire pour la fermentation glutamique.

• **Quelles sont les modifications métaboliques et physiologiques au cours de la fermentation glutamique ?**

□ **Glutamate intracellulaire**

Le contenu en glutamate intracellulaire reste à une valeur supérieure à 50 mg/g PS lorsque les cellules sont en phase de croissance, quelque soit la température de culture. En revanche ce niveau chute pendant la phase d'excrétion de glutamate (inférieure à 40 mg/g PS) lorsque la croissance est complètement inhibée. Ceci suggère que cette souche exige un niveau de glutamate intracellulaire élevé pour la croissance. Lorsque le glutamate intracellulaire chute pendant la phase de production de glutamate, nous pouvons émettre l'hypothèse que le choc de température provoque premièrement une excrétion de glutamate et la chute du niveau de glutamate intracellulaire est la conséquence de l'excrétion. Une autre hypothèse émise par

Kimura (2002) consiste à dire que l'excrétion de glutamate est liée à la chute de l'ODHC qui va permettre le basculement du flux carboné vers la synthèse de glutamate.

□ **Enzymes de la synthèse de glutamate**

Lors des cultures sous différents modes, les cellules en culture à 39°C présentent une activité PEPC plus élevée qu'à 33°C. Cette augmentation est due à la chute du niveau de glutamate intracellulaire pendant la phase de production de glutamate à 39°C, car cette enzyme est réprimée par le niveau de glutamate intracellulaire. Les activités de l'ICDH et de la GDH présentent des niveaux élevés et ne sont pas modifiées quelle que soit la température de culture, le mode de culture et la vitesse de croissance cellulaire. Nous avons également pu mettre au point le dosage des activités PDH et ODHC au cours de la fermentation glutamique. La PDH diminue pendant la phase de production de glutamate, tandis que l'activité ODHC diminue juste après le choc de température et est complètement inactivée après environ 5 h de culture à 39°C. La modification du niveau de ces deux enzymes pourrait être due à la baisse du niveau de glutamate intracellulaire qui joue un rôle activateur de l'expression de ces deux enzymes. C'est pourquoi les cellules cultivées en milieu contenant du glutamate comme seule source carbonée, présentent un niveau élevé à la fois en glutamate intracellulaire et en ces deux enzymes. Il est également possible que la baisse du niveau intracellulaire de ces deux enzymes soit due à la modification de l'enveloppe cellulaire après l'induction ; en effet, une grande partie de l'activité de ces deux enzymes peut être retrouvée dans les débris de l'enveloppe cellulaire et la mesure de l'activité de ces deux enzymes nécessite une forte concentration en glycérol dans le teste enzymatique, qui permet de recréer un environnement lipidique.

□ **Relation entre le niveau enzymatique et la synthèse de glutamate**

L'augmentation de la PEPC pendant la phase de production de glutamate des cultures en mode discontinu, semi-continu (Deiaunay et al., 1999 ; Gourdon et Lindley, 1999) ou continu présente un effet positif sur la synthèse de glutamate. Cependant, la chute de la PDH pendant la phase de production de glutamate à 39°C peut être une étape limitante pour la synthèse de glutamate. Cette baisse peut être également à l'origine de la chute de la respiration qui entraîne probablement une accumulation de NADH et de pyruvate intracellulaire. Ces accumulations provoquent ensuite la formation de lactate. Au contraire, l'inactivation de l'ODHC pendant la phase de production de glutamate favorise la synthèse de glutamate en déviant le flux carboné au

niveau de l' α -cétoglutarate vers le glutamate. C'est pourquoi, la vitesse spécifique de synthèse de glutamate pendant la phase de production à 39°C est bien supérieure à celle mesurée en croissance rapide à 33°C.

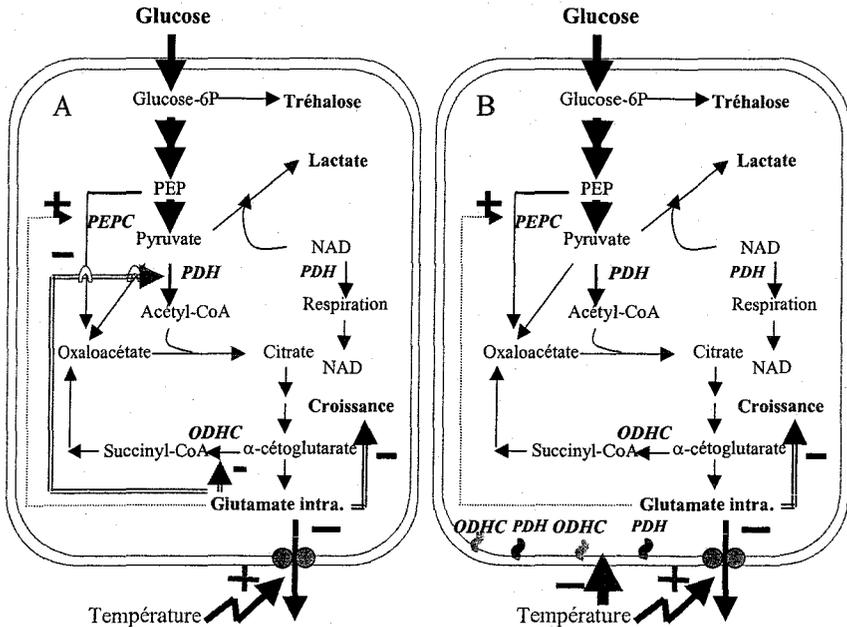


Figure 2 : effet du choc de température sur les régulations métaboliques de *C. glutamicum* 2262. Hypothèse A : le glutamate intracellulaire joue un rôle central des régulations et hypothèse B : la modification de la membrane est l'origine des régulations.

La figure 2 résume l'effet du choc de température sur les modifications métaboliques de *C. glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique. Deux hypothèses, dont la première est basée sur le rôle central du glutamate et la deuxième sur la modification de la membrane qui perturbe probablement les enzymes membranaires, peuvent donc expliquer ces modifications.

□ Potentiel membranaire

Quelle que soit la température et le mode de culture utilisés, le potentiel membranaire augmente avec la vitesse spécifique de croissance. Lors de la phase de production de glutamate, la chute du potentiel membranaire a déjà été observée (Duperray et al., 1992 ; Lapujade, 2000) ; cependant,

bien que cette chute n'est pas liée avec à la surproduction de glutamate (Gutmann et al., 1992), nous n'avons pas identifié la cause de cette chute en culture discontinue ou semi-continue.

• **Quelles sont les effets de la température sur l'enveloppe cellulaire de *C. glutamicum* 2262 au cours de fermentation glutamique ?**

□ **Effet de la température sur le métabolisme des acides gras**

Lors de l'étude de l'effet d'acides gras sur la croissance et la production de glutamate à 33 et à 39°C, nous avons conclu que le choc de température limite la synthèse des acides gras nécessaires pour la croissance de *C. glutamicum* 2262 : le choc de température inhibe notamment fortement la synthèse de l'oléate (figure 3).

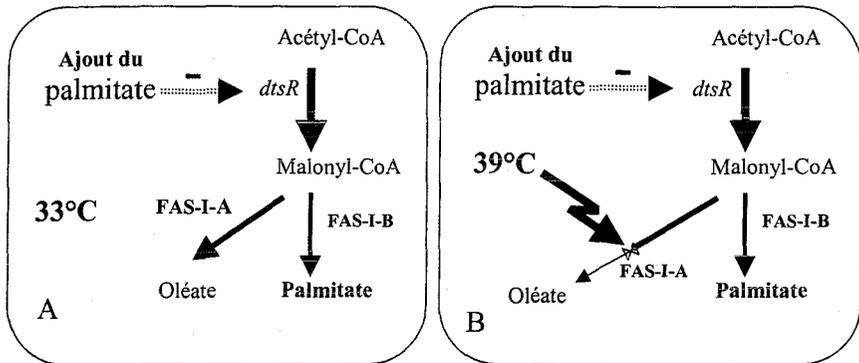


Figure 3 : effet du palmitate et de la température sur la voie biosynthèse des acides gras chez *C. glutamicum* 2262 à 33°C (A), et à 39°C (B).

Ce résultat est en accord avec ceux de Gourdon (1999). En effet, l'augmentation de la température inhibe, *in vitro*, la synthèse des acides gras insaturés (Kawaguchi et al. 1979) qui est effectuée par le système FAS-I-A (Stuible et al. 1996 ; Stuible et al., 1997). D'autre part, l'apport du palmitate dans le milieu de culture permet de maintenir la vitesse spécifique de production de glutamate plus longtemps, ce qui permet d'une augmentation de la production de glutamate en fermentation semi-continue à 39°C. Le palmitate pourrait jouer un rôle répressif sur l'expression d'enzymes à la synthèse des acides gras. En effet, le tensioactif tween 40, dérivé du palmitate réprime l'expression du gène *dtsR* codant probablement pour une sous-unité de l'enzyme

responsable pour la synthèse du malonyl-CoA, précurseur de la synthèse des acides gras (Kimura et al., 1999 ; Kimura et al., 2002). L'ajout de palmitate à 39°C permet donc d'amplifier l'augmentation du rapport acides gras saturés/insaturés.

□ Effet de la température sur la fluidité de l'enveloppe cellulaire et l'activité de l'excrétion de glutamate

Le choc de température provoque une augmentation de la fluidité de l'enveloppe cellulaire. Lorsque les cellules sont cultivées à différentes températures (33, 36, 38 et 39°C), la fluidité de l'enveloppe cellulaire augmente de façon linéaire avec l'augmentation de la température. Toutefois, cette augmentation n'est pas due à l'effet physique de la température, mais à une modification de la composition de l'enveloppe cellulaire, puisque la fluidité mesurée juste après le choc de température n'est pas significativement modifiée.

L'augmentation de la fluidité de l'enveloppe cellulaire n'est pas en accord avec l'augmentation de la teneur en acides gras saturés observée par Gourdon (1999) : en effet, la sonde TMA-DPH, chargée positivement, reste probablement localisée au niveau de la couche d'acides mycoliques et ne parvient pas à marquer la membrane plasmique. Cette hypothèse peut être étayée par le fait que la fluidité de la paroi des mycobactéries est due à la fluidité de la couche d'acides mycoliques (Liu et al., 1996). L'augmentation de la fluidité de cette bicouche lipidique coïncide avec l'augmentation de la vitesse spécifique de production de glutamate, les variations de la composition vont être très importantes pour l'excrétion de glutamate lors de la fermentation glutamique.

PERSPECTIVES

Afin de compléter nos connaissances sur le métabolisme de *C. glutamicum*, nous proposons à court ou moyen terme les travaux suivants :

- L'étude de l'application de différents profils thermiques sur les principales cinétiques de la fermentation glutamique. Ces études permettront de caractériser l'adaptation des cellules au stress thermique. Des conséquences importantes peuvent être attendues sur les performances de la fermentations.
- L'amplification de l'activité PDH, dont la séquence est actuellement disponible dans la littérature, puisque l'activité de cette enzyme chute pendant la phase de production de la fermentation glutamique. L'amplification de la PDH devrait permettre de réduire la formation de lactate et de produire plus de glutamate pendant la fermentation glutamique.
- Identification des sous unités de la PDH et l'ODHC pendant la fermentation glutamique. Ceci permet d'identifier précisément si la chute de ces deux enzymes est due à la modification de la membrane ou à la chute du niveau de glutamate intracellulaire.
- Etudier le métabolisme des lipides : caractérisation des enzymes responsables à la transition de la phase de croissance à la phase de production de glutamate et également à la résistance au choc de température.
- Identifier les acides mycoliques responsables de la modification de la fluidité de la couche d'acides mycoliques lors de la phase de production et déterminer leur rôle dans le processus d'excrétion de glutamate.
- Identifier l'exporteur de glutamate et étudier son rôle dans le processus de production du glutamate par surexpression du gène correspondant.
- Identifier les facteurs responsables de l'arrêt de la production de glutamate en fermentation glutamique. Ceci amène à identifier les gènes ou les protéines qui sont réprimés, inactivées ou activées par le choc de température.
- Identifier les conditions optimales de production de glutamate lors du procédé combiné "température et ajout de palmitate". La concentration précise de palmitate, le moment de l'ajout de palmitate ainsi que la température de la fermentation sont les paramètres à optimiser.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adam A.

Etude et importance de la phosphoénolpyruvate carboxylase chez *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate. Rapport de stage, ENSAIA-INPL, Nancy, 1997.

Amin G., Shahaby A.F., Allah K.

Glutamic acid and by-product synthesis by immobilized cells of the bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol. Lett. 1993, 15, 1123-1128.

Asakura Y., Usuda Y., Tsujimoto N., Kimura E., Abe C., Kawahara Y., Nakamatsu T., Kurahashi O.

Alpha-ketoglutarate dehydrogenase gene. U.S. Patent 5 977 331, 1999.

Attwood P.V.

The structure and the mechanism of action of pyruvate carboxylase. Intern. J. Biochem. Cell. Biol. 1995, 27, 231-249.

Azuma T., Nakanishi T., Sugimoto M.

Isolation and characterization of a stable L-arginine producer from continuous culture broth of *Corynebacterium acetoacidophilum*. J. Ferment. Technol. 1988, 66, 279-284.

Bai C., Fernandez E., Yang H., Chen R.

Purification and stabilization of a monomeric isocitrate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*. Prot. Express. Purif. 1999, 15, 344-348.

Barry III C.E., Lee R.E., Mdluli K., Sampson A.E., Schroeder B.G., Slayden R.A., Yuan Y.
Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological function. Prog. Lipid Res. 1998, 37, 143-179.

Beckers G., Nolden L., Burkovski A.

Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status. Microbiology 2001, 147, 2961-2970.

Börmann-El Kholy E.R., Eikmanns B.J., Gutmann M., Sahn H.

Glutamate dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol. 1993, 59, 2329-2331.

Bokas D.

Etude de la fluidité membranaire de *Corynebacterium glutamicum* au cours du procédé de production de glutamate. DEA INPL, Nancy, 2002.

Bona R., Moser A.

Modelling of L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. Bioproc. Eng. 1997, 17, 139-142.

Bradford M.M.

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.

Bröer S., Krämer R.

Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. I. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur. J. Biochem.* 1991a, 15, 131-135.

Bröer S., Krämer R.

Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. II. Energetics and mechanism of the transport system. *Eur. J. Biochem.* 1991b, 15, 137-143.

Büchs J., Mozes N., Wandey C., Rouxhet P.G.

Cell adsorption control by culture conditions: influence of phosphate on surface properties, flocculation and adsorption behaviour of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988, 29, 119-128.

Burkovski A., Krämer R.

Bacterial Amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 58, 265-274.

Chami M., Bayan N., Peyret J.L., Gulik-Krzywicki T., Leblon G., Shechter E.

The S-layer protein of *Corynebacterium glutamicum* is anchored to the cell wall by C-terminal hydrophobic domain. *Mol. Microbiol.* 1997, 23, 483-492.

Choi Y.J., Tribe D.E.

Continuous production of phenylalanine using an *Escherichia coli* regulatory mutant. *Biotechnol. Lett.* 1982, 4, 223-228.

Clément Y., Escoffier B., Trombe M.C., Lanéeille G.

Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. *J. General Microbiol.* 1984, 130, 2589-2594.

Clément Y., Lanéeille G.

Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. *J. General Microbiol.* 1986, 132, 925-929.

Cocaign-Bousquet M., Guyonvarch A., Lindley N.D.

Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 429-436.

Cocaign-Bousquet M., Lindley N.D.

Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enz. Microbial Technol.* 1995, 17, 260-267.

Cocaign-Bousquet M., Monnet C., Lindley N.D.

Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use of substrates mixtures to localise bottlenecks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 40, 526-530.

Coello M.N., Hadjsassi A., Lebeault J.M.

Effect of the growth rate on the enzymatic activities of L-lysine-producing cells of *Corynebacterium glutamicum*. World J. Microbiol. Biotechnol. 2001, 17, 337-341.

Coello N., Pan J.G., Lebeault J.M.

Corynebacterium glutamicum: morphological and ultrastructural changes of L-lysine producing cells in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992a, 38, 34-38.

Coello N., Pan J.G., Lebeault J.M.

Physiological aspects of L-lysine production: effect of nutritional limitations on a producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992b, 38, 259-262.

Collin M.D., Goodfellow M., Minnikin D.E.

Fatty acid composition of some mycolic acid containing coryneform bacteria. J. General Microbiol. 1982, 128, 2503-2509.

Cronan, J.E. Jr.

Phospholipid modifications in bacteria. Current Opinion Microbiol. 2002, 5, 202-205.

Crueger W., Crueger A.

Amino acids. In Brock T.D. (ed.), Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. Madison : Science Tech, Inc. 1984, pp. 127-147.

Daran-Lapujade P., Leyval D., Debay F., Goergen J.L., Engasser J.M.

Flow cytometric monitoring of the physiological response of *Corynebacterium glutamicum* during glutamate producing processes. 2003, Submitted for publication.

Das K., Anis M., Mohd-Azemi B.M.N., Ismail N.

Fermentation and recovery of glutamic acid from palm waste hydrolysate by ion-exchange resin column. Biotechnol. Bioeng. 1995, 48, 551-555.

Debay F.

Etude cinétique de la fermentation glutamique par *Corynebacterium glutamicum* et caractérisation physiologique par cytométrie en flux. Thèse INPL, Nancy, 1997.

Delaunay S.

Etude et modification du métabolisme central de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate. Thèse INPL, Nancy, 1999.

Delaunay S., Gourdon P., Lapujade P., Mailly E., Oriol E., Engasser J.M., Lindley N.D., Goergen J.L.

An improved temperature triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. Enzyme Microbial. Technol. 1999a, 25, 762-768.

Delaunay S., Lapujade P., Engasser J.M., Goergen J.L.

Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002, 28, 333-337.

Delaunay S., Uy D., Baucher M.F., Engasser J.M., Guyonvarch A., Goergen J.L.
Importance of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation. *Metab. Eng.* 1999b, 1, 334-343.

Demain A.L., Birnbaum J.

Alteration of permeability for the release of metabolites from microbial cell. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 1968, 46, 1-25.

Domingez H., Nezondet C., Lindley N.D. Coccagn M.

Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. *Biotechnol. Lett.* 1993, 15, 449-454.

Dominguez H., Rollin C., Guyonvarch A., Guerquin-Kern J.L., Coccagn-Bousquet Lindley N.D.

Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur. J. Biochem.* 1998, 254, 96-102.

Duperray F., Jezequel D., Ghazi A., Letellier L., Shechter E.

Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1303, 250-258.

Ebbighausen H., Weil B., Krämer R.

Transport branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 1989, 151, 238-244.

Eggeling L., Krämer R., Vrljic M., Kronenmeyer H., Sahn H.

Transport mutants and transport genes of *Corynebacterium glutamicum*. *Ann. NY Acad. Sciences*: 1996, 782, 191-201.

Eggeling L., Krumbach K., Sahn H.

L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or tween addition doing the same? *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 3, 67-68.

Eggeling L., Sahn H.

L-glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 52, 146-153.

Eggeling L., Sahn H.

The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosc. Bioeng.* 2001, 92, 201-213.

Eikmanns B.J.

Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the 3 glycolytic enzymes glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosphosphate isomerase. *J. Bacteriol.* 1992, 174, 6076-6086.

Eikmanns B.J., Rittmann D., Sahn H.

Cloning sequence analysis and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* 1995, 177, 774-782.

Ertan H.

Some property of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. Arch. Microbiol. 1992, 158, 35-41.

Funabashi H., Kawaguchi A., Tomada H., Omura S., Okuda S., Iwasaki S.

Binding site of cerulenine in fatty acid synthetase. J. Biochem. 1989, 105, 751-755.

Garrigues C., Loubiere P., Lindley N.D., Coccain-Bousquet M.

Control of the shift from homolactic to mixed acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH:NAD ratio. J. Bacteriol. 1997, 179, 5282-5287.

Glover R.E., Smith R.R., Jones M.V., Jackson S.K., Rowlands C.

An EPR investigation of surfactant action on bacterial membrane. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 177, 57-62.

Godel H., Seitz P., Verhoef M.

Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. LC GC Int 1992, 5, 44-49.

Goergen J.L., Debay F., Engasser J.M.

Contraintes physiologiques favorables à la surproduction d'acide glutamique par corynébactéries. In Physiologie microbienne et procédés industrielles, Société Française de Microbiologie, Paris, 1997, 105-114.

Gourdon P.

Etude physiologique d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* productrice d'acide glutamique: quantification des flux métaboliques et des contraintes biochimiques en phase de production. Thèse INSA, Toulouse, 1999.

Gourdon P., Lindley N.D.

Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. Metab. Eng. 1999, 1, 224-231.

Gubler M., Jetten M.S.M., Lee S.H., Sinskey A.J.

Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of *pyk* in a lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. Appl. Environ. Microbiol. 1994a, 60, 2494-2500.

Gubler M., Park S.M., Jetten M., Stephanopoulos G., Sinskey A.J.

Effects of phosphoenolpyruvate carboxylase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. : 1994b, 40, 857-863.

Guillouet S., Engasser J.M.

Kinetics of volume variation of *Corynebacterium glutamicum* following saline osmotic upshifts. Biotechnol. Lett. 1996, 18, 145-148.

Guillouet S., Jo Y.B., Lessard P., Shaver X., Willis L., Stephanopoulos G., Sinskey A.J.

Manipulation of carbon central metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. Proceedings of the Metabolic Engineering II meeting, Schloss Elmau-Germany, 1998.

Gutmann M., Hoischen C., Krämer R.

Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1112, 115-123.

Hermann T., Finkemeier M., Pfefferle W., Wersch G., Krämer R., Burkovski A.

Two-dimensional electrophoretic analysis of *Corynebacterium glutamicum* membrane fraction and surface proteins. *Electrophoresis* 2000, 21, 654-659.

Hermann T., Krämer R.

Mechanism and regulation of L-isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 3238-3244.

Hertz P.F.

Chaîne respiratoire et déshydrogénases flaviniques chez *Corynebacterium glutamicum* melassecola ATCC 17965 : Contribution à l'étude des voies d'utilisation de coenzymes intervenant dans les réactions d'oxydo-réduction. Thèse, Orsay, 1998.

Hinman L.M., Blass J.P.

An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crude tissue homogenates. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 6583-6586.

Hirao T., Nakano T., Azuma T., Sugimoto M., Nakanishi T.

L-lysine production in continuous culture of an L-lysine hyperproducing mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989, 32, 269-273.

Hirasawa T., Wachi M., Nagai K.

A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* *itsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 2696-2701.

Hirasawa T., Wachi M., Nagai K.

L-glutamate production by lysozyme-sensitive *Corynebacterium glutamicum* *ItsA* mutant strains. *BMC Biotechnol.* 2001, 1, 9-13.

Hirose Y., Okada H.

Microbial production of amino acids. In Peppler H.J., Perlman D. (eds). *Microbial Technol.* New York, Academic Press, 1979, pp. 211-240.

Hoischen C., Krämer R.

Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 1989, 151, 342-347.

Hoischen C., Krämer R.

Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 1990, 172, 3409-3416.

Hucheq A., Marquet M., Welby M., Montrozier H., Goma G., Lanéelle G.

Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol.* 1984, 135, 53-67.

Hunter S.W., Brennan P.J.

Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 9272-9279.

Hunter S.W., Gaylord H., Brennan P.J.

Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 12345-12351.

Ikeda M., Nakanishi K., Kino K., Katsumata R.

Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994, 58, 674-678.

Ikeda M., Okamoto K.

A transcétolase mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 50, 375-378.

Ikeda M., Okamoto K., Katsumata R.

Cloning the transcétolase gene and the effect of its dosage on aromatic amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 51, 201-206.

Ishizaki A., Takasaki S., Furuta Y.

Cell-recycled fermentation of glutamate using a novel cross-flow filtration system with constant air supply. *J. Ferment. Bioeng.* 1993, 76, 316-320.

Ishizaki A., Yamamoto K., Furuta Y.

A new method for the accurate and rapid determination of the concentrations of intracellular metabolites in cells during fermentation. *Biotechnol. Tech.* 1995, 9, 409-412.

Jäger W., Peters-Wendisch P.G., Kalinowski J. and Pühler A.

A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins. *Arch. Microbiol.* 1996, 166, 76-82.

Jang K., Pierotti D., Kemp G.W., Brest G.R., Britz M.L.

Mycolic acid composition of *Corynebacterium glutamicum* and its cell surface mutants: effect of growth with glycine and isonicotilinic acid hydrazide. *Microbiology* 1997, 143, 3209-3321.

Jetten M.S.M., Gubler M.E., Lee S.H., Sinskey A.J.

Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994a, 60, 2501-2507.

Jetten M.S.M., Pitoc G.A., Folletie M.T., Sinskey A.J.

Regulation of phosphoenolpyruvate and oxaloacetate-converting enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994b, 41, 47-52.

Jetten M.S.M., Sinskey A.J.

Characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993, 111, 183-188.

Jourd'hui D., Meddings J.B.

Oxidative and drug-induced alterations in brush border membrane hemileaflet fluidity, functional consequences for glucose transport. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1510, 342-353.

Kanno S., Kimura E., Matsu K., Kurahashi O., Horino I., Nakamatsu T.

Method for producing L-glutamic acid by fermentation. European Patent 1010755 A1, 2000.

Kanzaki T., Okazaki H., Sugawara A., Fukuda H.

"L-glutamic acid fermentation. Part IV. The relation between the cellular fatty acid contents and the productivity of L-glutamic acid". *Agric. Biol. Chem.* 1967,31, 1416-1420.

Kawaguchi A., Seyama Y., Sasaki K., Okuda S., Yamakawa T.

Thermal regulation of fatty acid synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Biochem.* 1979, 85, 865-869.

Kawahara Y., Takahashi-Fuke K., Shimizu E., Nakamatsu T., Nakamori S.

Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1997, 61, 1109-1112.

Kawahara Y., Yoshihara Y., Ikeda S., Hirose Y.

Effect of glycine betaine, an osmoprotective compound on the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990, 33, 574-577.

Kelle R., Laufer B., Brunzema C., weuster-Botz D., Krämer R., Wandrey C.

Reaction engineering analysis of L-lysine transport by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 51, 40-50.

Kijima N., Goyal., Takada A., Wachi M., Nagai K.

Introduction of only limited elongation instead of filamentation by inhibition of cell division in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 50, 227-232.

Kimura E.

Triggering mechanism of L-glutamate overproduction by *dtsRI* in coryneform bacteria. *J. Biosci. and Bioeng.* 2002, 94, 545-551.

Kimura E., Abe C., Kawahara Y., Nakamatsu T.

Molecular cloning of a novel gene, *dtsR*, which recues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, 60, 1565-1570.

Kimura E., Kawahara Y., Nakamatsu T.

Studies of L-glutamate production in coryneform bacteria by using metabolic-flux analysis. 7th International conference on computer applications in Biotechnology, Osaka, Japan, 1998.

Kimura E., Yagoshi C., Kawahara Y., Ohsumi T., Nakamatsu T., Tokuda H.

Glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* triggered by a decrease in the level of a complex comprising DtsR and a biotin-containing subunit. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1999, 63, 1274-1278.

Kinoshita S.

Glutamic acid bacteria. In: Demain, A.L., Solomon, N.A., (Eds.), Biology of Industrial Microorganisms. London: Benjamin / Cummings. 1985, pp. 115-142.

Kinoshita S., Nakayama K.

Amino acid. In: Rose A.H. (ed.), Primary products of metabolism. London, Academic Press, 1978, 209-261.

Kinoshita S., Udaka S., Shimono M.

Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. 1957, 3, 193-205.

Kiss R.D., Stephanopoulos G.

Metabolic characterization of a L-lysine-producing strain by continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 1992a, 39, 565-574.

Kiss R.D., Stephanopoulos G.

Culture instability of auxotrophic amino acid producers. Biotechnol. Bioeng. 1992b, 40, 75-85.

Kitano K., Sugiyama Y., Kanzaki T.

L-glutamate fermentation with acetic acid by an oleic requiring mutant. II. Inhibitory factors against the extracellular accumulation of L-glutamate. J. Ferment. Technol. 1972, 50, 183-191.

Krämer R.

Secretion of amino acids by bacteria: physiology and mechanism. FEMS Microbiol. Rev. 1994, 13, 75-94.

Kuehm N.

Modélisation cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum*: croissance et production de glutamate sous stress osmotique. Thèse INPL, Nancy, 1996.

Kuhry J.G., Duportail G., Bronner C., Laustriat G.

Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene. Biochim. Biophys. Acta 1985, 845, 60-67.

Kuhry J.G., Fonteneau P., Duportail G., Maechling C., Laustriat G.

TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. Cell Biophysics 1983, 5, 129-140.

Lambert C., Erdmann A., Eikmanns M., Krämer R.

Triggering glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulating the membrane state with local anesthetics and osmotic gradients. Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61, 4334-4342.

Lapujade P.

Etude cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate: importance de contenu cellulaire et l'étape d'excrétion de glutamate. Ph.D. thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 2000.

Lapujade P., Goergen J.L., Engasser J.M.

Glutamate excretion as a major kinetic bottleneck for the thermally triggered production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 1999, 1, 255-261.

Lederer E., Adam A., Ciobaru R., Petit J., Wietzerbin J.

Cell walls of mycobacteria and related organisms, chemistry and immunomodulant properties. *Mol. Cell Biochem.* 1975, 7, 87-104.

Leffeld B., Keweloh H.

Cis/trans isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8. *Lipids* 1996, 31, 811-815.

Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W., Schleifer K.H.

Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, *Brevibacterium flavum* DSM 20411, *Brevibacterium lactofermentum* DSM20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA restriction patterns. *International J. System. Bacteriol.* 1991, 41, 255-260.

Liebl W., Klamer R., Schleifer K.H.

Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989, 32, 205-210.

Liu J., Barry C.E., Besra G.S., Nikaido H.

Mycolic acid structure determines the fluidity of the Mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 29545-29551.

Magin R.L., Niesman M.R., Bacic G.

Influence of fluidity on membrane permeability correspondence between studies of membrane models and simple biological systems. *Adv. Membr. Fluid.* 1990, 4, 221-239.

Malathi K.C., Wachi M., Nagai K.

Isolation of the *murI* gene from *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 encoding D-glutamate racemase. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 175, 193-196.

Marienfeld S., Uhlemann E.M., Schmid R., Krämer R., Burkovski A.

Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1997, 72, 291-297.

Marquet M., Uribelarrea J.L., Hucheq A., Lanéelle G., Goma G.

Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum*: a study of glutamate accumulation during a fermentation course. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986, 25, 220-223.

Matsushita K., Yamamoto T., Toyama H. Adachi O.

NADPH oxidase system as a superoxide-generating cyanide-resistant pathway in the respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62, 1968-1977.

Mejià R., Gómez-Eichelmann M.C., Fernández M.S.

Escherichia coli membrane fluidity as detected by excimerization of dipiryrenylpropane: sensitivity to the bacterial fatty acid profile. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 368, 156-160.

Meers J.L., Tempest D.W., Brown C.M.

Glutamine (amide)-2-oxoglutarate-amidotransferase oxidoreductase (NADP) an enzyme involved in the synthesis of glutamate in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1970, 64, 187-194.

Miescher G.M.

U.S. patent 3 929 575, 1975.

Minnikin D.E., Goodfellow M., Collins M.D.

Lipid composition in the classification and identification of Coryneform and relating taxa. In Bousfield I.J., Calley A.G. (eds). *Coryneform bacteria*. Academic Press, London, 1978, 85-159.

Minikin D.E., Kremer L., Dover L.G., Besra G.S.

The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* 2002, 9, 545-553.

Molenaar D., Van Der Rest M.E., Petrović S.

Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* 1998, 254, 395-403.

Momose H., Takagi T.

Glutamic acid production in biotin-rich media by temperature sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a novel fermentation process. *Agric. Biol. Chem.* 1978, 42, 1911-1917.

Mori M., Shii I.

Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant. *J. Biochem.* 1985a, 97, 1119-1128.

Mori M., Shii I.

Synergistic inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by aspartate and 2-oxoglutarate in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* 1985b, 98, 1621-1630.

Mori M., Shii I.

Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems and sugar metabolism in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 1987, 51, 2671-2678.

Moritz B., Striegel K., De Graaf A.D., Sahn H.

Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 3442-3452.

Naji B., Géhin G., Bonaly R.

Structure of surfactants and glutamate efflux by *Corynebacterium glutamicum*. *Process Biochem.* 2000, 35, 759-764.

Nakayama K., Sato Z., Tanaka H., Kinoshita S.

Growth of a glutamic acid producing bacterium and related bacteria. II Effect of chelating agent and its relation to inorganic salt. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1964, 10, 181-199.

Nakazawa H., Kawashiwa H., Oyama I., Ishii K., Kawahara Y.

Method of producing L-glutamic acid by fermentation. U.S. Patent 5 492 818, 1996.

Nampoothiri K.M., Hoischen C., Bathe B., Möckel B., Pfefferle W., Krumbach K., Sahn H., Eggeling L.

Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002, 58, 89-96.

Nampoothiri M., Pandey A.

Immobilization of *Brevibacterium* cells for the production of L-glutamic acid. Biores. Technol. 1998, 63, 101-106.

Nedwell D.B.

Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. FEMS Microbiol. Ecol. 1999, 30, 101-111.

Neubeck M., Prenner E., Horvat P., Bona R., Hermetter A., Moser A.

Membrane fluidity in glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium* sp. ATCC 13869. Arch. Microbiol. 1993, 160, 101-107.

Niebsch A., Bott Michael

Molecular analysis of the cytochrome bc₁-aa₃ branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome c₁. Arch. Microbiol. 2001, 175, 282-294.

Nikaido H., Kim S., Rosenberg E.Y.

Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. Mol. Microbiol. 1993, 8, 1025-1030.

Nunheimer T.D., Birnbaum J., Ihnen E.D., Demain A.L.

Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. Appl. Microbiol. 1970, 20, 215-217.

Oh N.S., Sernetz M.

Turnover characteristics in continuous L-lysine fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993, 39, 691-695.

Oshima K., Tanaka T., Kinoshita S.

Studies on L-glutamic acid fermentation. Part XI. Purification and properties of L-glutamic acid dehydrogenase from *Micrococcus glutamicus*. Agric. Biol. Chem. 1964, 28, 714-722.

Otsuka S.I., Shio I.

Fatty acid composition of cell wall cell membrane fraction from *Brevibacterium flavum*. J. Gen. Appl. Microbiol. 1968, 14, 135-146.

Ozaki H., Shio I.

Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. I. Inhibition of isocitrate lyase and isocitrate dehydrogenase by organic acids related to the TCA and glyoxylate cycles. J. Biochem. 1968, 64, 355-363.

Ozaki H., Shiio I.

Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. II. Regulation of phosphoenolpyruvate and pyruvate kinase. J. Biochem. 1969, 66, 297-311.

Ozaki H., Shiio I.

Production of lysine by pyruvate kinase mutants of *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 1983, 47, 1569-1576.

Palmieri L., Berns D., Krämer R., Eikmanns B.J.

Treonine diffusion and treonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in treonine production. Arch. Microbiol. 1996, 165, 48-54.

Parish T., Liu J., Nikaido H., Stoker N.G.

A *Mycobacterium smegmatis* mutant with a defective inositol monophosphate phosphatase gene homolog has altered cell envelope permeability. J. Bacteriol. 1997, 179, 7827-7833.

Park S.Y., Kim H.K., Yoo S.K., Oh T.K. Lee J.K.

Characterization of *glk*, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. 2000, 188, 209-215.

Perters-Wendisch P.G., Eikmanns B.J., Thierbach G., Bachmann B., Sahn H.

Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. FEMS Microbiol. Lett. 1993, 112, 269-274.

Peters-Wendisch P.G., Kreutzer C., Kalinowski J., Patek M., Sahn H., Eikmanns B.J.

Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene. Microbiology 1998, 144, 915-927.

Peters-Wendisch P.G., Schiel B., Wendisch V.F., Katsoulidis E., Mökel B., Sahn H., Eikmanns B.J.

Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2001, 3, 295-300.

Peters-Wendisch P.G., Wendisch V.F., Paul S., Eikmanns B.J. and Sahn H.

Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. Microbiology 1997, 143, 1095-1103.

Pignot R.

Etude de l'influence de la biotine et la température sur la production d'acide glutamique chez une souche thermosensible de *Corynebacterium glutamicum*. DEA INPL, Nancy, 1996.

Pilch P.F., Thompson P.A., Czech M.P.

Coordinate modulation of D-glucose transport activity and bilayer fluidity in plasma membranes derived from control insulin-treated adipocytes. Proceed. National Acad. Sci. U.S.A. 1980, 77, 915-918.

Pons B.J., Duchiron F., Duperray F., Guyonvarch A., Melaouene S. et More J.

Les corynébactéries. In Leveau J.Y., Bouix M. (eds). Microbiologie industrielle. Paris : Tec & Doc-Lavoisier et Apria, 1993, pp. 393-421.

Puech V., Chami M., Lemassu A., Laneele M.A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R., Daffé M.

Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* 2001, 35, 1026-1041.

Reinscheid D.J., Eikmanns B.J., Sahn H.

Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J. Bacteriol.* 1994, 176, 3474-3483.

Richter W., Hänel F., Hilliger M.

Freeze-fracture observations of *Corynebacterium glutamicum*: the occurrence of an outer membrane-like structure and the influence of the temperature on the cytoplasmic membrane. *J. Basis Microbiol.* 1985, 25, 527-536.

Riedel C., Rittmann D., Dangel P., Mökel B., Persen S., Sahn H., Eikmanns B.J.

Characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 3, 573-583.

Rollin C., Morgant V., Guyonvarch A.

¹³C NMR studies of *Corynebacterium melassecola* metabolic pathways. *Eur. J. Biochem. Sc.* 1995, 227, 488-493.

Ruklish M.P., Duntse M.E., Levane V.A., Kalnanya R.B.

Characteristics of the operation of the tricarboxylic acid cycle in *Brevibacterium flavum* and *Micrococcus glutamicus*. *Mikrobiol.* 1987, 56, 759-763.

Russell N.J.

Cold adaptation of microorganisms. *Phil. Trans R. Soc. Lond. B* 1990, 326, 595-611.

Russell N.J.

Psychrophilic microorganisms. In Herbert R.A., Sharp R.S. (eds), *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. 1992, pp. 203-224.

Schulz A.A., Collett H.J., Reid S.J.

Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, 205, 361-367.

Schwinde J.W., Hertz P.F., Sahn H., Eikmanns B.J., Guyonvarch A.

Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: molecular and physiological analysis of the *lpd* gene and characterization of the enzyme. *Microbiology* 2001, 147, 2223-2231.

Sekine, H., Shimada, T., Hayashi, C., Ishiguro, A., Tomita, F., Yokota, A.

H⁺-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolished glutamic acid production with enhancement of glucose production rate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 57, 534-540.

Shibukawa M., Kurima M., Oruchi S.

L-glutamic acid fermentation with molasses. XII. Relationship between the kind of phospholipids and their fatty acid composition in the mechanism of extracellular accumulation of L-glutamate. *Agric. Biol. Chem.* 1970, 34, 1136-1141.

Shibukawa M., Kurima M., Okabe S., Ohsawa T.

L-glutamic acid fermentation with molasses. Part X. On the difference in mechanisms for the bacterial extracellular accumulation of L-glutamate between fatty acid derivative and penicillin. *Agric. Biol. Chem.* 1968, 32, 641-645.

Shibukawa M., Ohsawa T.

L-glutamic acid fermentation with molasses. Part VI. Effect of the saturated-unsaturated fatty acid ratio in the cell membrane fraction on the extracellular accumulation of L-glutamate. *Agric. Biol. Chem.* 1966, 30, 750-758.

Shiio I., Otsuka S.I., Takanashi M.

Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* 1962, 51, 56-62.

Shiio I., Otsuka S.I., Tsunoda T.

Glutamic acid formation from glucose by bacteria. I. Enzymes of the Embden-Meyerhof-Panass pathway, the Krebs cycle, and the glyoxylate bypass in cell extracts of *Brevibacterium flavum* N° 2247. *J. Biochem.* 1959, 46, 1303-1311.

Shiio I., Otsuka S.I., Tsunoda T.

Glutamic acid formation from glucose by bacteria. III. On the pathway of pyruvate formation in *Brevibacterium flavum* N° 2247. *J. Biochem.* 1960, 47, 414-421.

Shiio I., Ozaki H.

Concerted inhibition of isocitrate dehydrogenase by glyoxylate plus oxaloacetate. *J. Biochem.* 1968, 64, 45-53.

Shiio I., Ozaki H.

Regulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate producing Bacterium. *J. Biochem.* 1970, 68, 633-647.

Shiio I., Ozaki H., Mori M.

Glutamate metabolism in a glutamate producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 1982, 46, 493-450.

Shiio I., Ozaki H., Ujigawa K.

Regulation of citrate synthase in *Brevibacterium flavum*, a glutamate producing bacterium. *J. Biochem.* 1977, 82, 395-405.

Shiio I., Sugimoto S., Kawamura K.

Effect of carbon source of the yield of amino acid production and sucrose metabolism in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 1990, 54, 1513-1519.

Shiio I., Ujigawa K.

Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. J. Biochem. 1978, 84, 647-657.

Shiio I., Ujigawa K.

Presence and relation of α -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 1980, 44, 1897-1904.

Shimakata T., Minatogawa Y.

Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*. Arch. Biochem. Biophys. 2000, 380, 331-338.

Shiratsuchi M., Kunonuma H., Kawahara Y., Yoshihara Y., Miwa H., Nakamori S.

Simultaneous and high fermentative production of L-lysine and L-glutamic acid using a strain of *Brevibacterium lactofermentum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995, 59, 83-86.

Shvinka, J.E., Viestur U.E., Toma M.K.

Alternative pathways of oxydation in the respiratory chain of *Brevibacterium flavum*. Mikrobiologiya 1979, 48, 10-16.

Simic P., Sahn H., Eggeling L.

L-treonine export: use of peptide to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 2001, 183, 5317-5324.

Snoep J.L., Teixeira De Matos M.J., Posma P.W., Neijssel O.M.

Involvement of pyruvate dehydrogenase in product formation in pyruvate-limited anaerobic chemostat cultures of *Euterooccus faecalis* NCTC 775. Arch. Microbiol. 1990, 154, 50-55.

Sommerson N.L., Phillips T.

U.S. Patent, 3 080 297, 1962.

Sonntag K., Schwinde J., Graaf A.A.de, Marx A., Eikmanns B.J., Wiechert W., Sahn H.

¹³C NMR Studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995, 44, 489-495.

Stuible H.P., Meier S., Schweizer E.

Identification, isolation and biochemical characterization of a phosphopantetheine: proteine transferase that activates the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*. J. Biochem. 1997, 248, 481-487.

Stuible H.P., Wagner C., Andreou I., Huter G., Haselmann J., Schweizer E.

Identification and functional differentiation of two type I fatty acid synthases in *Brevibacterium ammoniagenes*. J. Bacteriol. 1996, 178, 4787-4793.

Sugimoto S.I., Shiio I.

Relation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 1987a, 51, 101-108.

Sugimoto S.I., Shii I.

Relation of 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 1987b, 51, 1257-1263.

Sugimoto S.I., Shii I.

Fructose metabolism and regulation of 1-phosphofructose kinase and 6-phosphofructose kinase in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 1989a, 53, 1261-1268.

Sugimoto S.I., Shii I.

Regulation of enzymes for erythrose 4-phosphate synthesis in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 1989b, 53, 2080-2087.

Sun Z., Yu Z., Yang Y., Jin H., Yan H.

Fermentation production of L-glutamic acid from rice hydrolysate by temperature-sensitive mutant *Corynebacterium crenatum* N 1. Gongye Weishengwu 1989, 19, 9-14.

Sung H.C., Tachiki T., Kumagai H., Toshikura T.

Production and preparation of glutamate synthase from *Brevibacterium flavum*. J. Ferment. Technol. 1984, 62, 371-376.

Takinami K., Yamada Y. Odaka H.

Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. Agric. Biol. Chem. 1966, 30, 674-682.

Takinami K., Yoshii H., Tsuru H., Odaka H.

Biochemical effect of fatty acid and its derivatives on glutamic acid fermentation. III. Biotin-tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. Agric. Biol. Chem. 1965, 29, 351-359.

Takinami K., Yoshii H., Yamada Y., Odaka H., Kinoshita K.

Control of L-glutamic acid fermentation by Biotin and fatty acid. Amino Acid Nucl. Acid 1968, 18, 120-160.

Tanaka K. Iwasaki T., Kinoshita S.

J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 1960, 34, 593.

Tauch A., Götter S., Pühler A., Kalinowski J., Thierbach G.

The alanine racémase gene *alr* in an alternative to antibiotic resistance genes in cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains. J. Biotechnol. 2002, 99, 79-91.

Tesch M., De Graaf A.A., Sahn H.

In vivo fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied ¹⁵N Nuclear magnetic resonance. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65, 1099-1109.

Tesch M., Eikmanns. B.J., De Graaf A.A., Sahn H.

Ammonia assimilation in *Corynebacterium glutamicum* and a glutamate dehydrogenase-deficient mutant. Biotechnol. Lett. 1998, 20, 953-957.

Tourdot-Maréchal R., Gaboriau D., Beney L., Diviès C.

Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus Oeni*. Intern. J. Food Microbiol. 2000, 55, 269-273.

Tosaka O., Morioka H., Takinami K.

The role of biotin-dependent pyruvate carboxylase in L-lysine production. Agric. Biol. Chem. 1979, 43, 1519-1519.

Tosaka O., Takinami K.

Pathway and regulation of lysine biosynthesis in *Brevibacterium lactofermentum*. Agric. Biol. Chem. 1978, 42, 95-101.

Trutko S.M., Kuznetsova N.N., Balitskaya R.M., Akimenko V.K.

Effect of supersynthesis of glutamic acid on development of cyanide-resistant respiration in the bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Biochimia 1982, 26, 1608-1616.

Ueda K.

Continuous fermentation. In: Yamada, S., Kinishita, S., Tsunoda, T., Aida, K., (Eds.), The microbial production of amino acids. New York: Wiley. 1972, pp. 181-201.

Usuda Y., Tujimoto N., Abe C., Asakura Y., Kimura E., Kawahara Y., Kurahashi O., Matsui H.

Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase Microbiology 1996, 142, 3347-3354.

Uy D., Delaunay S., Engasser J.M., Goergen J.L.

A method for the determination of pyruvate carboxylase activity during the glutamic acid fermentation with *Corynebacterium glutamicum*. J. Microbiol. Meth. 1999, 39, 91-96.

Vallino J.J., Stephanopoulos G.

Metabolic distribution in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine over production. Biotechnol. Bioeng. 1993, 41, 633-646

Vallino J.J., Stephanopoulos G.

Carbon flux distributions at the pyruvate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. Biotechnol. Prog. 1994, 10, 320-326.

Vandecasteele J.P., Lemal J., Coudert M.

Pathways and regulation of glutamate synthesis in a *Corynebacterium* sp. Overproducing glutamate. J. General. Microbiol. 1975, 90, 178-180.

Vigh L., Maresca B., Harwood J.L.

Does the membranes physical state control the expression of heat shock and other genes? Trends Biochem. Sci. 1998, 23, 369-374.

Von der Osten C.H., Barbas C.F., Wong C.H., Sinskey A.J.

Molecular cloning, nucleotide sequence and fine-structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *fldA* gene: structural comparison of *C. glutamicum* fructose-1,6-biphosphate aldolase to class I and class II aldolases. Mol. Microbiol. 1989a, 3, 1625-1637.

Von der Osten C.H., Gioannetti C., Sinskey A.J.

Design of a defined for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. Biotechnol. Lett. 1989b, 11, 11-16.

Vrljić M., Sahn H., Eggeling L.

A new type of transporter with a new type of cellular function. Mol. Microbiol. 1996, 22, 815-826.

Wachi M., Wijayarathna C.D., Teraoka H., Nagai K.

A *murC* gene from coryneform bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999, 51, 223-228.

Wehrmann A., Philipp B., Sahn H., Eggeling L.

Different modes of diaminopimelate synthesis and their role in cell wall integrity: a study with *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 1998, 180, 3159-3165.

Wendisch V.F., Graaf A.A.D., Sahn H., Eikmanns B.J.

Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. J. Bacteriol. 2000, 182, 3088-3096.

Wendisch V.F., Spies M., Reinscheid D.J., Schnicke S., Sahn H., Eikmanns B.J.

Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. Arch. Microbiol. 1997, 168, 262-269.

Wijayarathna C.D., Wachi M., Nagai K.

Isolation of *ftsI* and *murE* genes involved in peptidoglycane synthesis from *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001, 55, 466-470.

Yoshioka T., Ishii T., Kawahara Y., Koyama Y., Shimizu R.

Method for producing L-glutamic acid by continuous fermentation. U.S. patent 5 869 300, 1999.

Zhao Y., Lin Y.H.

The effect of growth rates on the recovery of amino acids. Biotechnol. Lett. 2001, 23, 1043-1046.

Zhao Y., Lin Y.H.

Flux distribution and partitioning in *Corynebacterium glutamicum* grown at different specific growth rates. Process Biochem. 2002, 37, 775-785.

Zittrich S., Krämer R.

Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 1994, 176, 6892-6899.



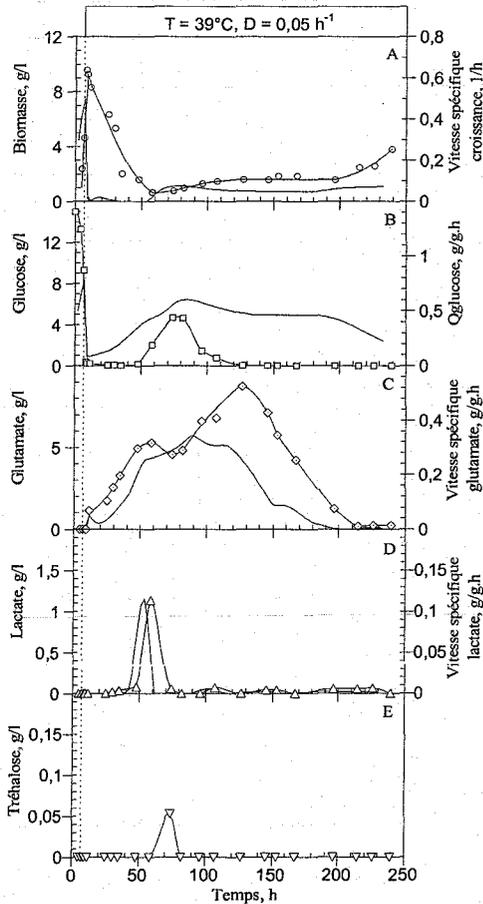
ANNEXES

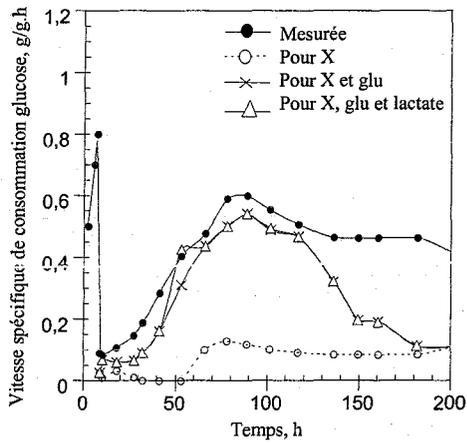
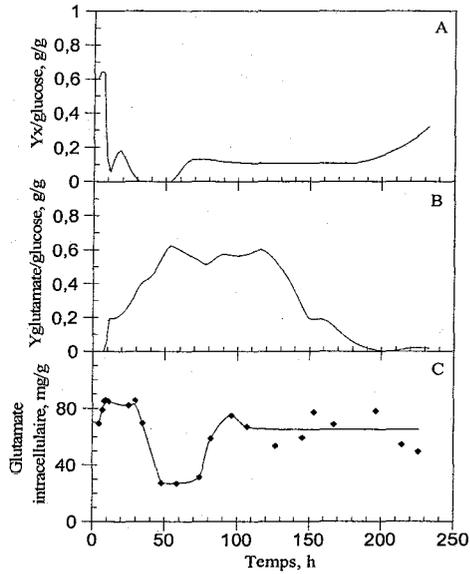
ANNEXES

ANNEXE 1 : Cinétique de la fermentation continue à 39°C et à taux de dilution de 0,05 h⁻¹

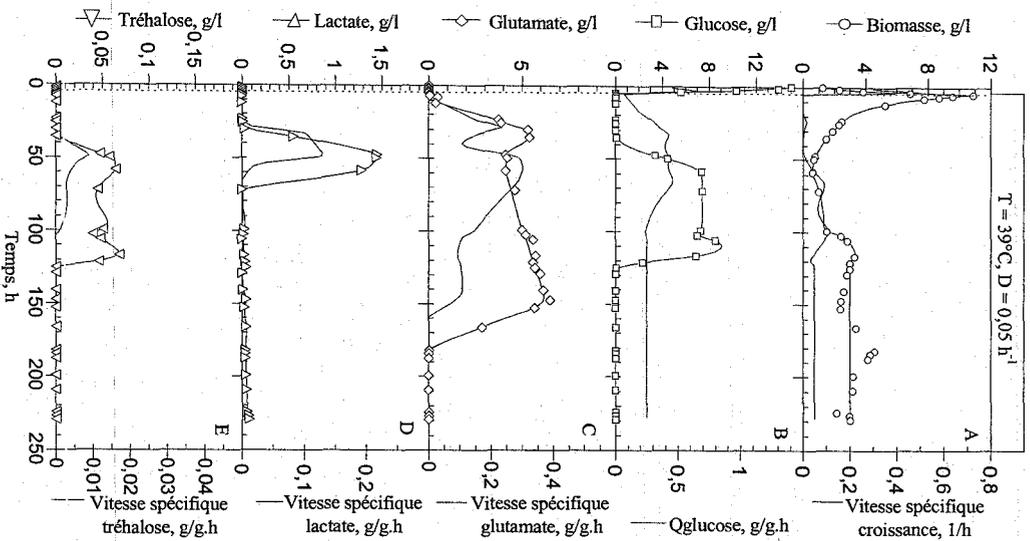
Deux fermentations supplémentaires ont été réalisées afin de valider les résultats cinétiques obtenus dans le chapitre III. Ces deux fermentations présentent leur comportement cinétique similitude de celui obtenu dans le chapitre III.

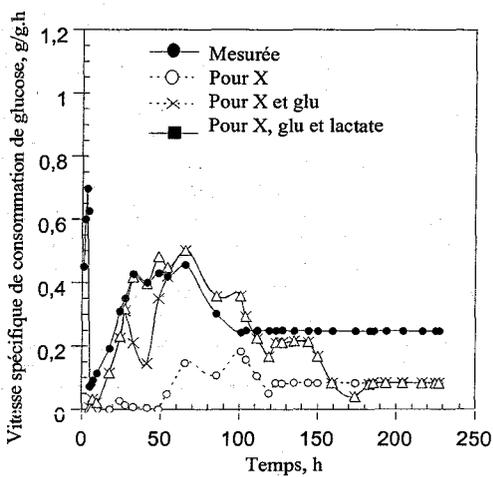
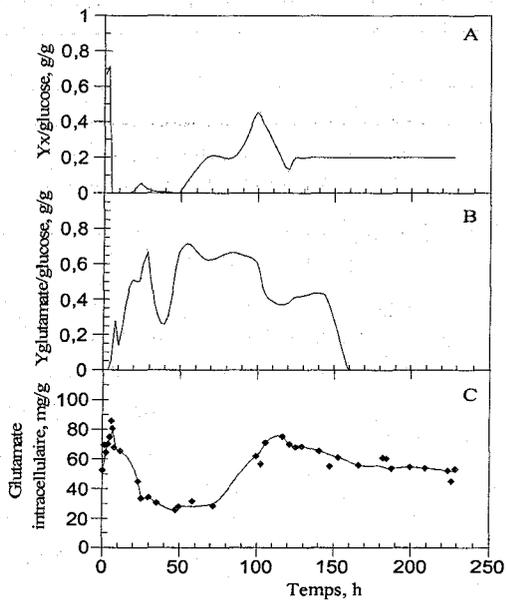
• Fermentation 1





• Fermentation 2





**ANNEXE 2 : Etude de la production de glutamate par *C. glutamicum* 2262 en fermentation
continue**

Instability of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in continuous culture using the temperature-triggered process

Davin Uy^a, Stéphane Delaunay^b, Pierre Germain^b, Jean-Marc Engasser^b and Jean-Louis Goergen^{a,*}

^a Laboratoire des Sciences du Génie Chimique - CNRS and ^b Laboratoire Bioprocédés Agro-alimentaires - ENSAIA. Institut National Polytechnique de Lorraine - 2, Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

* Corresponding author. Tel.: +33-3-8359-5844; fax: +33-3-8359-5804. E-mail address: Jean-Louis.Goergen@ensaia.inpl-nancy.fr

Article : accepté dans le journal "Journal of Biotechnology".

Abstract: Kinetics and physiology of *Corynebacterium glutamicum* 2262 cultured for extended periods in continuous mode were investigated at 33, 39 and 41°C. At 33°C no glutamate production occurred whatever the dilution rates tested (ranging between 0.05 and 0.5 h⁻¹). When the continuous culture was performed at 39°C and D = 0.05 h⁻¹, the glutamate was actively produced, while the activities of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) and pyruvate dehydrogenase (PDH) were respectively completely inhibited and 35 % decreased. Simultaneously, the intracellular glutamate was 62% reduced compared to the level found at 33°C and the co-metabolites lactate and trehalose were excreted. The decrease in PDH activity during the glutamate production was suggested to be responsible for the accumulation of by-products and for limiting the carbon flux required for glutamate synthesis. When the culture was prolonged for more than 100 hours, a cell selection occurred, in favor of growth and to the detriment of glutamate production. In fact, these selected cells presented high levels of ODHC and PDH activities even at 39°C, resulting in a complete inhibition of the glutamate production after 150 hours of culture. A further temperature increase till 41°C restored the glutamate production and abolished the ODHC activity of these selected cells.

Keywords: glutamate, continuous culture, temperature, *Corynebacterium glutamicum*, ODHC, PDH.

1. Introduction

Corynebacterium glutamicum and related organisms are used since 1957 for the production of glutamate (Kinoshita, 1985) to meet today an annual demand of approximately 1,000,000 tons. The glutamate is mainly used as a flavor agent and can be produced by cultivating the bacteria in a biotin deficient medium (Shiio et al., 1962), or upon an addition of surfactants (Takinami et al., 1965) or antibiotics in the culture medium (Nunheimer et al., 1970) or at last, by a temperature up-shift of the culture broth (Delaunay et al., 1999a; Momose and Takagi, 1978; Sun et al., 1989). During these processes, the first phase corresponds to the growth

of bacteria while the second phase is the glutamate production period. Though we can induce the glutamate excretion, up to now the precise metabolic mechanisms involved in the glutamate excretion remain unclear.

To further improve the performances of the glutamate producing process, a deeper insight into the cellular physiology and metabolism during both growth and glutamate production phases is essential. For this purpose, continuous mode appears to be an interesting tool, as one can partially dissociate the effects of different factors on one parameter. Number of papers have contributed to the understanding of the cellular metabolism of amino acids producing bacteria in growth or production conditions in continuous cultures (Azuma et al., 1988; Choi and Tribe, 1982; Coello et al., 1992a, 1992b & 2001; Coccagn-Bousquet et al., 1996; Hirao et al., 1989; Kiss et al., 1992a & 1992b; Oh et al., 1993). However in glutamate producing conditions, very few data are available (Ueda, 1972).

When corynebacteria were submitted to a temperature stress to excrete glutamate, carbon flux accumulated in EMP (Sonntag et al., 1995) and caused the extracellular accumulation of by-products such as trehalose and lactate in fed-batch culture (Gourdon and Lindley, 1999). This suggested that one or more enzymatic reactions downstream in the glutamate biosynthetic pathway or responsible for its excretion were limiting during the production phase (Lapujade et al., 1999; Lapujade, 2000). However, activities of the main anaplerotic enzymes in *C. glutamicum*, phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) or pyruvate carboxylase (PC), replenishing the TCA cycle with oxaloacetate, increase during the active glutamate production phase in fed-batch culture (Delaunay et al., 1999b); in addition, amplification of PEPC or PC activity did not improve respectively glutamate or lysine production of overproducing strain of *C. glutamicum* (Delaunay et al., 1999b; Guillouet et al., 1998). On the other hand, amplification of pyruvate dehydrogenase (PDH) activity in coryneform bacteria, supplying acetyl-CoA for fatty acids synthesis and the TCA cycle, led to an increase in glutamate yield (Kanno et al., 2000). Another essential enzymatic activity during the glutamate producing process is the activity generated by the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC). Upon biotin limitation, addition of surfactants or addition of antibiotics in batch culture, this enzyme activity was strongly reduced in *B. lactofermentum* leading to a carbon overflow towards glutamate synthesis at the 2-oxoglutarate branch point (Kawahara et al., 1997). The measure of this enzyme activity would then be of high interest during the glutamate producing process submitted to a temperature increase.

In the present work, we investigated the regulation of the *C. glutamicum* metabolism in continuous culture, in biotin rich medium at different temperatures, in growth and glutamate producing conditions. The metabolic phenomena linked to the glutamate production instability and by-products accumulation were assessed in prolonged continuous culture at 33, 39 and 41°C.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and medium composition

The strain used throughout this study was *Corynebacterium glutamicum* 2262, provided by Orsan-Amylum SA. The composition of the culture medium was based on MCGC medium (Von der Osten et al., 1989) in which the citrate was replaced by deferroxamine. In order to reduce precipitates formation during the sterilization, the culture medium was divided in two solutions. The solution A consisted of: glucose (15 g l⁻¹), Na₂HPO₄ (6 g l⁻¹), KH₂PO₄ (12 g l⁻¹), NaCl (4 g l⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (16 g l⁻¹), biotin (4 mg l⁻¹), thiamine (40 mg l⁻¹), deferroxamine (6 mg l⁻¹), glycine betaine (4 g l⁻¹). The solution B consisted of: glucose (15 g l⁻¹), CaCl₂ (168 mg l⁻¹), MgSO₄ · 7 H₂O (0.8 g l⁻¹), FeSO₄ · 7 H₂O (80 mg l⁻¹), FeCl₃ (8 mg l⁻¹), ZnSO₄ · 7 H₂O (2 mg l⁻¹), CuCl₂ · H₂O (0.8 mg l⁻¹), MnSO₄ · H₂O (8 mg l⁻¹), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O (0.4 mg l⁻¹), Na₂B₄O₇ · 10 H₂O (0.8 mg l⁻¹). Salts and glucose were sterilized at 120°C for 20 minutes whereas vitamins

and CaCl_2 were added after sterilization by filtration ($0.22 \mu\text{m}$). The medium was reconstituted in the bioreactor by mixing one volume of solution A with one volume of solution B. Polypropylene glycol (1.3 g l^{-1}) was used as antifoaming agent.

2.2. Fermentation conditions

The inoculum was grown in shake-flask culture at 33°C in modified MCGC medium, supplemented with NaHPO_4 (3.8 g l^{-1}) and urea (0.39 mg l^{-1}). Glucose concentration was increased up to 34 g l^{-1} and pH was set at 7.6 with NaOH.

For continuous culture, 50 ml of this overnight culture of *C. glutamicum* were used to inoculate a 3 liters bioreactor (APPLIKON, Holland) containing 1.5 liters of modified MCGC. When glucose was exhausted, the culture was supplemented continuously with modified MCGC (simultaneously one volume of solution A and one volume of solution B). The increase in the culture temperature (from 33°C to 39°C) was performed when the supplementation was started. When glucose was independently added to the bioreactor, the temperature of the glucose solution was previously heated to 39°C to avoid a change of the temperature in the culture medium. The pH set point was 7.6, regulated with NH_3 12 N. The agitation was set at 1200 RPM to avoid oxygen limitation.

2.3. Analytical methods

During cultivation, samples were collected to determine biomass, glucose, glutamate, lactate and trehalose concentrations. The cell concentration was determined by absorbance at 570 nm (spectrophotometer) and by a direct gravimetric method for avoiding the overestimation due to changes in cell morphology during the cultivation. After centrifugation of the sample (13,000 RPM, 5 min, Microfuge lite, Beckman), the amount of glutamate and glucose were enzymatically determined on the supernatant (Roche, Germany). Lactate and trehalose analysis were performed on the supernatant by HPLC (Waters Model 712, St Quentin, France) using a Brownlee Polypore H column, operated at 65°C and H_2SO_4 (0.02 M) elution, UV and RI as detectors respectively.

2.4. Intracellular glutamate

Cells of a $500 \mu\text{l}$ sample were separated from the medium by centrifugation on $500 \mu\text{l}$ of a mixture of 1-bromo-hexadecan and 1-bromo-heptan (specific gravity, 1.07) as separation layer and $250 \mu\text{l}$ 21 % HClO_4 as acid fixation layer: $64,000 \text{ g}$, 5 min and 4°C (Ishizaki et al., 1995). The sedimented cells in the acid layer were further disrupted using three cycles of a freezing/thawing procedure; the resulting extracts were neutralized in the cold by adding 5 M KOH. The supernatant obtained by centrifugation ($32,000 \text{ g}$, 4°C) was used for intracellular glutamate determination.

After derivatization with o-phthalaldehyde, glutamate was analyzed by HPLC (Hewlett Packard model 1090, Les Ulis, France) using a Hewlett Packard C18 column (Godel et al., 1992). The reproducibility of the procedure within a given fivefold determination was $\pm 15 \%$.

2.5. Enzyme assays

Cells collected from the culture were washed twice in KCl (2 g l^{-1}), resuspended in Tris-tricarallylate buffer (15 mM, pH, 7.8) containing MgCl_2 (5 mM) and 20 % (v v^{-1}) glycerol and were stored at -80°C . Cells, kept in ice during the treatment, were disrupted by sonication (40 kHz, 8 cycles of 30 and 60 s spaced out). The cell debris were removed by centrifugation at 4°C for 15 min, at 10,000g. The supernatant was used for the assay of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), isocitrate dehydrogenase (ICDH) and glutamate dehydrogenase (GDH).

The cell-free extracts for pyruvate dehydrogenase (PDH) and 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) assays were prepared by the same method except that Tris-

tricarballilate buffer was replaced by N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid (TES)-NAOH buffer (100 mM, pH, 7.7) containing 30 % (v v⁻¹) glycerol. Therefore, a gel filtration was performed at 4°C on a PD10 column (LKB-Pharmacia).

PEPC, ICDH, GDH, PDH and ODHC were assayed at 30°C spectrophotometrically (Beckman DU 7500). Activities were determined by following appearance or disappearance of NADH or NADPH ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) at 340 nm (PEPC, ICDH and GDH), 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT-formazan, $\epsilon = 12.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), an artificial electron acceptor, at 500 nm (PDH) or 3-acetylpyridine adenine dinucleotide (APADH, $\epsilon = 9.02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) at 365 nm (ODHC). The protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford et al., 1976) using bovine serum albumin as standard.

PEPC was assayed according to a method based on Mori and Shiio protocol (1985). The reaction mixture (1 ml) contained 100 mM Tris/HCl, pH 7.8, 5 mM MnSO₄, 10 mM KHCO₃, 0.15 mM NADH, 0.1 mM acetyl-CoA, 10 µg of malate dehydrogenase, 2 mM phosphoenolpyruvate and appropriated quantity of cell-free extract. Endogenous oxidation of NADH was quantified without phosphoenolpyruvate to avoid PEPC overestimation. The reproducibility of the test within a given fivefold determination was ± 15 %.

ICDH was assayed using a method based on Shiio and Ozaki method (1968). The reaction mixture (1 ml) contained 12.5 mM Tris-tricarballilate buffer, pH 7.8, 0.45 mM MnCl₂, 2.27 mM isocitrate, 1 mM NADP and appropriated quantity of cell-free extract. Endogenous activity was quantified without isocitrate. The reproducibility of within a given fivefold determination was ± 10 %.

GDH was assayed using a protocol based on Meers et al. method (1970). The reaction mixture (1 ml) contained 12.5 mM Tris-tricarballilate buffer, pH 7.8, 37.5 mM NH₄Cl, 2.5 mM NADPH, 5 mM 2-oxoglutarate and appropriate quantity of cell-free extract. Endogenous activity was quantified without oxoglutarate. The reproducibility of the assay within a given fivefold determination was ± 15 %.

PDH was assayed according to Hinman and Blass method (1981). To avoid PDH overestimation, endogenous activity was quantified without pyruvate. The reproducibility of the assay within a given fivefold determination was ± 15 %.

ODHC was assayed by the method of Shiio and Ujigawa-Takeda (1980). Endogenous activity was quantified without oxoglutarate. The reproducibility of the test within a given fivefold determination was ± 20 %.

PC assay was performed according to Uy et al. (1999). Briefly, cells collected from cultures were washed and then permeabilized with 2.5% hexadecyltrimethylammonium bromide. The reaction mixture contained 100 mM Tris/HCl, pH 7.3, 25 mM NaHCO₃, 5 mM MgCl₂, 3 mM pyruvate and 4 mM ATP. This reaction was stopped by addition of 30% orthophosphoric acid at 30°C. Pyruvate consumption was then assessed by a fluorometric method involving the lactate dehydrogenase conversion of pyruvate and NADH into lactate and NAD⁺. Sample excitation was accomplished at 352 nm and fluorescence was collected at 464 nm. The precision of PC analysis was about 15%.

2.6. Cell size measurement by flow cytometry

Cell size was determined by forward angle light scattering using flow cytometry. Culture samples were directly diluted in a buffer consisting of: 3 g l⁻¹ Na₂HPO₄, 6 g l⁻¹ KH₂PO₄, 2 g l⁻¹ NaCl and 8 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, pH 7.6 to obtain cell density of 10⁶ bacteria/ml. Analysis were performed with a BRYTE cytometer (Bio-Rad, France) equipped with a 75 W mercury/xenon arc lamp as the excitation light source, photomultiplier detector to collect forward angle light scatter (FALS). Optical alignment of the cytometer was checked using a homogeneous suspension of 1.5 µm diameter beads (Bio-Rad, France). The sample rate was at 20 µl min⁻¹.

Approximately 10,000 events were measured and results were displayed as relative value histograms. The reproducibility of within a given threefold determination was $\pm 5\%$.

3. Results and discussion

3.1. Effect of dilution rate on *C. glutamicum* kinetics and physiology at 33°C

The growth of *C. glutamicum* 2262 was investigated in continuous culture at 33°C for dilution rates ranging between 0.05 and 0.5 h⁻¹ (Table 1).

	Dilution rate, h ⁻¹				
	0.05	0.1	0.15	0.3	0.5
Biomass, g l ⁻¹	5.8	6.7	7.3	8.5	10
PEPC, nmol min ⁻¹ (mg of protein) ⁻¹	170	190	215	120	112
PDH, nmol min ⁻¹ (mg of protein) ⁻¹	12.6	12	11.5	11.8	N.D.
ICDH, μ mol min ⁻¹ (mg of protein) ⁻¹	0.4	0.5	0.6	0.5	0.4
GDH, μ mol min ⁻¹ (mg of protein) ⁻¹	1.4	1.6	1.9	1.4	1.4
ODHC nmol min ⁻¹ (mg of protein) ⁻¹	1.8	3.3	4	3	2.5

N.D. stands for not determined.

Table 1: *C. glutamicum* 2262 concentration and activities of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), pyruvate dehydrogenase (PDH), isocitrate dehydrogenase (ICDH), glutamate dehydrogenase (GDH) and 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) at various dilution rates in continuous culture at 33°C.

Glucose, the sole carbon source, was consumed and maintained at limiting concentration all over the continuous cultures for all steady states. The biomass concentration increased with the dilution rate contrary to the results of Cöcaign-Bousquet et al. (1996) who used a low level of biotin in the medium (20 μ g l⁻¹). In the present synthetic defined medium, glutamate, lactate and trehalose productions were not observed all over the processes and the intracellular glutamate level remained constant around 65 mg g⁻¹, whatever the dilution rate used. *C. glutamicum* ATCC 21253 metabolism was different when a rich and complex medium was used since minute amounts of various amino acids, including glutamate, were found to be excreted (Zhao et al., 2001). As expected (Cöcaign-Bousquet et al., 1996), the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) level was lower at high dilution rates (0.3 and 0.5 h⁻¹). On the other hand, activities of isocitrate dehydrogenase (ICDH), glutamate dehydrogenase (GDH), pyruvate dehydrogenase (PDH) and 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) were not affected by the specific growth rate tested, since relatively high activities of approximately 0.5 and 1.5 μ mol min⁻¹ (mg of protein)⁻¹, 12 and 3 nmol min⁻¹ (mg of protein)⁻¹ were respectively measured all over the cultures.

3.2. *C. glutamicum* kinetics and physiology in continuous culture at 39°C

After an 5 hour batch period at 33°C, a continuous feeding, with the same medium (MCGC), was started while a temperature shift till 39°C was imposed (figure 1). As a consequence of the rapid inhibition of the bacterial growth, biomass concentration was dramatically reduced (90 % reduction compared to the continuous culture at 33°C), resulting in an incomplete glucose consumption. As expected, glutamate production started upon

temperature increase and the intracellular glutamate level decreased from 80 to a minimum of 35 mg (g DW)⁻¹ within 60 hours of culture.

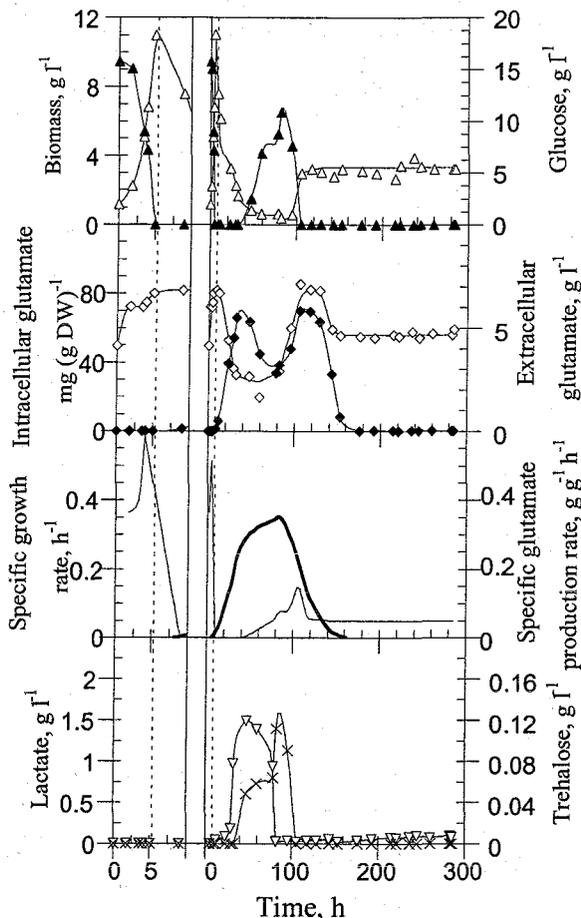


Figure 1: *C. glutamicum* 2262 continuous culture at 39°C, $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$: levels of (Δ) biomass, (\blacktriangle) glucose, (\diamond) intracellular or (\blacklozenge) extracellular glutamate, (∇) lactate and (\times) trehalose; specific rates of (—) growth and (—) glutamate production. The vertical dashed line indicates the time when both the continuous supplementation of medium and the temperature increase from 33°C to 39°C were imposed.

After 50 hours of culture, cell growth rate increased rapidly to reach 0.05 h^{-1} and the intracellular glutamate pool was restored to a constant level of $65 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ at steady state. Consequently, the glucose concentration in the culture medium returned to limiting concentration which provoked a stabilization of the biomass titer around 3.5 g l^{-1} . The specific glutamate production rate reached a maximal level within 4 days upon temperature shift ($0.35 \text{ g$

$\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$), followed by a decline phase and a complete inhibition after 150 hours of culture. It has to be noticed that glucose consumption remained constant even in glutamate non-producing conditions. Lactate and trehalose productions occurred during the first 100 hours of the culture. Lactate excretion stopped earlier, when growth was restored, whereas trehalose production was abolished simultaneously to the glucose exhaustion.

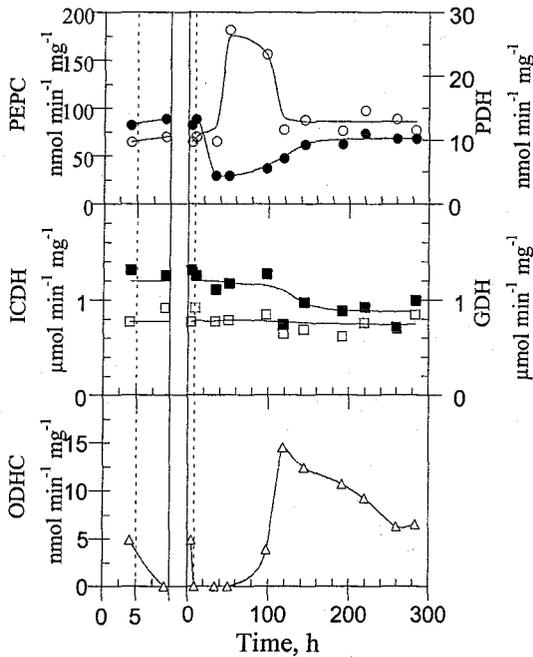


Figure 2: Evolution of *C. glutamicum* 2262 enzymatic activities in continuous culture at 39°C, $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$: (○) phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), (●) pyruvate dehydrogenase (PDH), (□) isocitrate dehydrogenase (ICDH), (■) glutamate dehydrogenase (GDH) and (Δ) 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC). The vertical dashed line indicates the time when both the continuous supplementation of medium and the temperature increase from 33°C to 39°C were imposed.

The specific activities of enzymes, representative of different pathways of the central metabolism, were assayed during the process (figure 2). Upon temperature increase, as for the continuous cultures realized at 33°C, PEPC activity reached its maximal value of $160 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg of protein})^{-1}$ while the specific growth rate was minimum. This phenomenon has already been reported and suggested that this anaplerotic enzyme is the major anaplerotic activity during the very first hours of the production phase of the glutamate producing fed-batch process (Delaunay et al., 1999b). In fact, the observed decrease in the intracellular glutamate level may be responsible for the increase in enzyme expression (Shiio and Ujigawa, 1978). The PEPC activity profile then returned to a stable value of $85 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg of protein})^{-1}$ for the remainder of the continuous process as the cells recovered a higher intracellular glutamate titer.

Pyruvate carboxylase level was maximum during the batch phase, around $14 \pm 2 \text{ nmol min}^{-1}$ (mg dry weight) $^{-1}$; this value is similar to values obtained during the growth phase of the glutamate producing fed-batch process using *C. glutamicum* 2262 (Delaunay et al., 1999b) and also similar to the ones measured in growing *C. glutamicum* ATCC 13032 (Peters-Wendisch et al., 2001). Then, during the continuous culture at 39°C and $D=0.05 \text{ h}^{-1}$, pyruvate carboxylase activity remained stable around $5 \pm 0.75 \text{ nmol min}^{-1}$ (mg dry weight) $^{-1}$ (data not shown).

The PDH activity was 65% reduced just after the increase in temperature from 33°C to 39°C and was thereafter restored and maintained at a constant level of 10 nmol min^{-1} (mg of protein) $^{-1}$. It can be assumed that this decrease was independent of the specific growth rate since no significant decrease was measured at 33°C, even for the lowest specific growth rate (table 1). Simultaneously to the PDH activity reduction, glucose, lactate and trehalose accumulated in the culture medium. In fact, the reduction in PDH activity could be responsible for the accumulation of NADH (one subunit might be involved in the reducing equivalent transport in the *C. glutamicum* membrane (Schwinde et al., 2001)) and glycolytic intermediates (e.g. pyruvate), that would favor the synthesis of lactate (Garrigues et al., 1997) and trehalose in presence of an excess of glucose. Besides, a limitation of the glutamate biosynthetic flux by this enzymatic activity might be responsible for the decrease in intracellular glutamate titer observed in figure 1. At last, the decrease in PDH activity could limit the amount of acetyl-CoA available for the fatty acids synthesis, and thus being responsible for a modification of the membrane composition observed during the temperature triggered glutamate fermentation (Gourdon, 1999).

Whereas ODHC displayed an activity around 5 nmol min^{-1} (mg of protein) $^{-1}$ at 33°C, no activity was measured upon temperature increase when glutamate was intensively excreted. This phenomenon was already reported for different glutamate producing batch cultures, using a biotin limitation or addition of surfactants or addition of antibiotics (Kawahara et al., 1997). Though the mechanism of glutamate excretion has not yet been identified, this phenomenon appears to be initiated by an imbalance in metabolites flux when the ODHC activity is abolished. Then, after 96 hours of culture, as glutamate production rate started to decrease, corynebacteria quickly recovered an ODHC activity that reached a maximum value of 15 nmol min^{-1} (mg of protein) $^{-1}$, and the intracellular glutamate titer was restored. The enzyme activity profile then stabilized around 6 nmol min^{-1} (mg of protein) $^{-1}$ during the last hours of the process when glutamate was no more produced.

The ICDH and the GDH activities were not significantly affected by the temperature increase nor by the cell growth rate at both 33°C and 39°C; ICDH and GDH activities remained at high levels throughout the continuous culture.

3.3. Glutamate production instability in prolonged continuous culture

In order to investigate the phenomena responsible for the loss of glutamate production in prolonged continuous culture ($T = 39^\circ\text{C}$, $D = 0.05\text{h}^{-1}$), a non-producing cell sample was taken from the reactor after 245 hours of culture and used to inoculate a batch culture set at 33°C. The batch mode was then turned to continuous procedure ($D = 0.05 \text{ h}^{-1}$) and the temperature was successively increased to 39°C and 41°C (figure 3).

After the temperature shift to 39°C, cell growth was quickly reduced, but much less strongly compared to the reference process presented in figure 1. As a consequence, the glucose titer was kept at a limiting level throughout the culture at 39°C. Then, after a 55 hour period, cell growth was restored resulting in a constant cell titer around 4 g l^{-1} . Interestingly, glutamate, lactate and trehalose, were not significantly produced in the culture medium during the steady state maintained at 39°C, meaning that the corynebacteria were no more able to excrete glutamate upon a temperature up-shock at 39°C. During the period at 39°C the PDH and ODHC activities remained very high, around 16 and 8 nmol min^{-1} (mg of protein) $^{-1}$, compared to the reference process, hampering as a consequence the excretion of glutamate, lactate and trehalose

(figure 4). PEPC, ICDH and GDH activities were maintained at constant high levels during the course of the cultivation. Intracellular glutamate level did not significantly change during the steady state at 39°C.

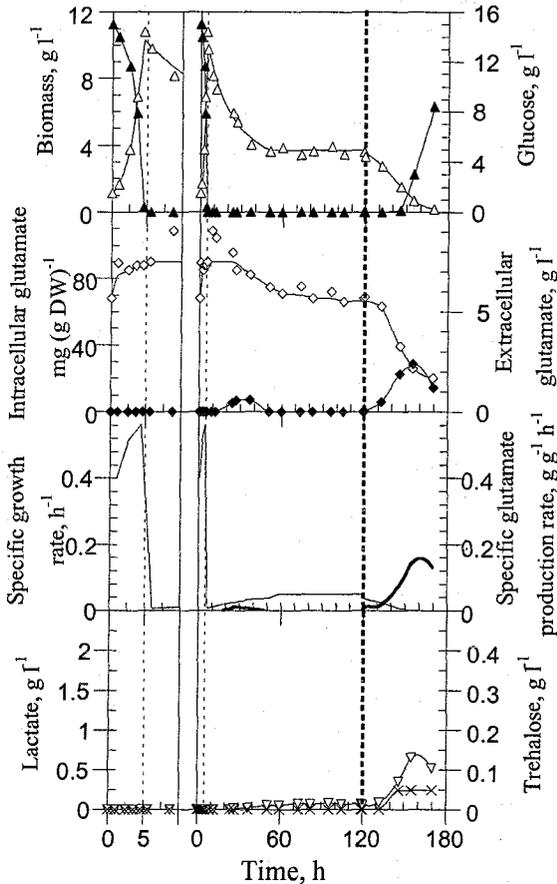


Figure 3: *C. glutamicum* 2262 continuous culture at 39 °C and 41°C, $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$ using glutamate-non producing cells grown for 247 hours in continuous procedure at 39°C, $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$: levels of (Δ) biomass, (▲) glucose, (◇) intracellular or (◆) extracellular glutamate, (∇) lactate and (×) trehalose; specific rates of (—) growth, and (—) glutamate production. The thin vertical dashed line indicates the time when both the continuous supplementation of medium was started and the temperature increase from 33°C to 39°C were imposed. The thick vertical dashed line indicates the time when the temperature was changed from 39°C to 41°C.

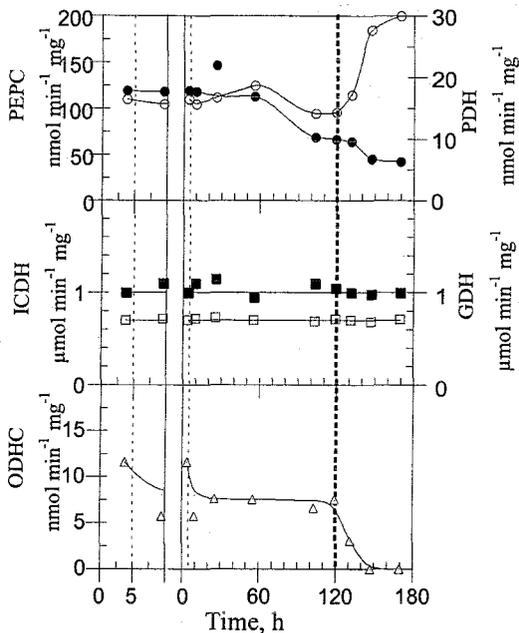


Figure 4: Evolution of enzyme activities *C. glutamicum* 2262 cultured for 247 hours in continuous process at 39°C, and then submitted to a batch (33°C) and a continuous culture at 39°C and 41°C, $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$: (○) phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), (●) pyruvate dehydrogenase (PDH), (□) isocitrate dehydrogenase (ICDH), (■) glutamate dehydrogenase (GDH) and (Δ) 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC). The thin vertical dashed line indicates the time when both the continuous procedure and the temperature increase from 33°C to 39°C were imposed. The thick vertical dashed line indicates the time when the temperature was changed from 39°C to 41°C.

When an additional temperature shift from 39 to 41°C was imposed after 120 hours of culture, cell growth was rapidly abolished and the corynebacteria produced again glutamate, as well as trehalose and lactate. ODHC activity was completely inhibited and PEPC activity reached its maximal level of $180 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg of protein})^{-1}$. In fact, the inhibition of the ODHC activity permitted the excretion of glutamate, and the decrease in PDH activity was probably responsible for the trehalose and lactate accumulation in the culture medium as well as the decrease in intracellular glutamate level, which in turn might be responsible for the increase in PEPC activity in the cells (Shiio and Ujigawa, 1978).

3.4. Effect of glucose addition on the metabolism of *C. glutamicum* in prolonged continuous process

Because glucose limitation could be responsible for the modification of the glutamate excretion, *C. glutamicum* grown in continuous prolonged culture at 39°C, was submitted to a glucose pulse in the culture medium. An identical continuous culture to that presented in figure 1 was performed during 247 hours. Similar kinetic profiles were obtained (data not shown).

Then, after 247 hours of culture, the continuous process was turned back to batch, and a glucose addition was performed to obtain 22 g l^{-1} in the culture broth (figure 5). In fact, the corynebacteria growth rate rapidly increased to the maximum value of 0.55 h^{-1} (the maximal growth rate at 33°C is 0.56 h^{-1} as well) and returned to zero when the glucose was totally consumed from the medium. It appeared that glucose was not the main limiting factor for the glutamate production since very few glutamate was produced upon glucose addition (the specific glutamate production rate reached a maximum of $0.04 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ only) resulting in an equivalent low decrease in intracellular glutamate level. Besides, contrary to the reference culture, no significant excretion of lactate or trehalose was measured during this culture period.

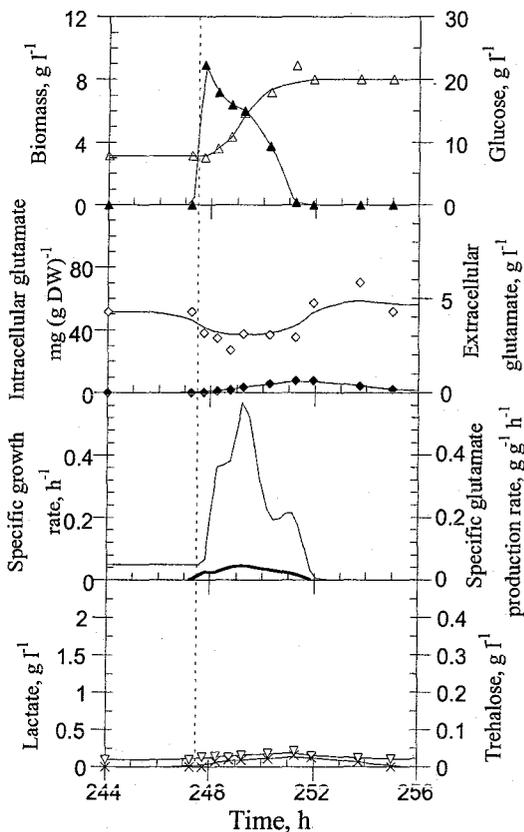


Figure 5: Effect of a glucose addition on the production of glutamate, lactate and trehalose at 39°C in batch mode, using *C. glutamicum* 2262 grown in continuous culture for 247 hours at 39°C , $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$: levels of (Δ) biomass, (\blacktriangle) glucose, (\diamond) intracellular or (\blacklozenge) extracellular glutamate, (\blacktriangledown) lactate and (\times) trehalose; specific rates of ($—$) growth, and ($—$) glutamate production. The vertical dashed line indicates the time when glucose is injected into the culture medium and the simultaneous change from continuous to batch procedure.

Then, the loss of glutamate production registered in this work is likely to be due to a selection/adaptation of bacteria capable to grow under a relatively high temperature to the detriment of glutamate production. A similar phenomenon of selection/adaptation has been reported by Ueda (1972) with corynebacteria grown in presence of antibiotics in continuous culture. In fact, a flow cytometric analysis of the corynebacteria cultivated in continuous culture submitted to a temperature of 39°C, showed a strong reduction in the cell size upon temperature up-shock (figure 6).

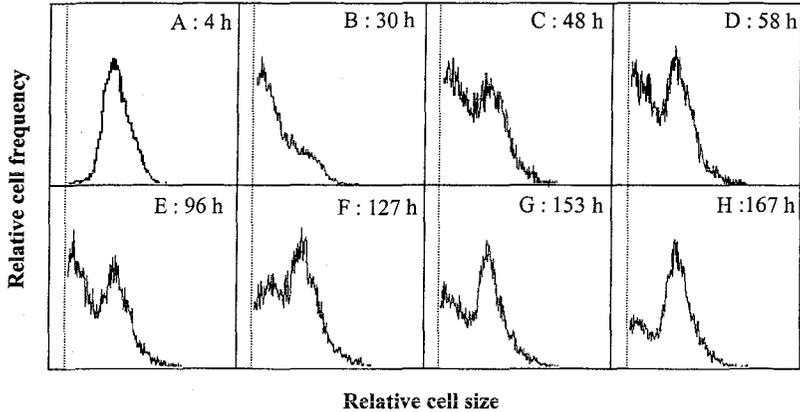


Figure 6: Cell size evolution of *C. glutamicum* 2262 cultured in continuous process. A: 33°C in batch mode; B, C, D, E, F, G and H: 39 °C and D = 0.05 h⁻¹ at different times of the continuous procedure.

Then, after 48 hours of culture, the proportion of larger cells started to increase as the specific glutamate production rate decreased. During the remainder of the culture course, large cells accumulated whereas small cells disappeared from the bioreactor. Thus, small corynebacteria might be non growing but producing cells, displaying negligible ODHC and reduced PDH activities, whereas larger cells represent the non-producing sub-population capable to grow at 39°C and displaying significantly higher ODHC and PDH activities. In fact, as suggested by the present results and previous works, loss of ODHC activity seems to be linked to the alteration of the corynebacteria membrane (Kimura et al., 1998; Kawahara et al., 1997). In addition, Schwinde et al. (2001) proposed that a subunit of the *C. glutamicum* PDH complex is involved in the transfer of electrons from NADH to various redox-active compounds and quinones; this enzyme activity might thus be linked to the membrane state as well. It was shown that upon temperature upshock the lipidic composition of the membrane of the corynebacteria is modified (Gourdon, 1999; Kawaguchi et al., 1979); this is probably to restore the initial membrane fluidity as reported by Mejià et al. (1999) for *Escherichia coli*. Thus, the study of the membrane fluidity regulation and genetic stability in *C. glutamicum* 2262 submitted to a temperature upshock, might give clues regarding the regulation of the ODHC and PDH activities and the stability of glutamate production.

Acknowledgements

The fellowship of D. Uy was financed by AUF (Agence Universitaire de la Francophonie, Paris, France). The authors thank Fabrice Blanchard for his help in technical analysis.

Nomenclature

D	dilution rate
DW	dry weight
EMP	Embden Meyerhof Pathway
GDH	glutamate dehydrogenase
ICDH	isocitrate dehydrogenase
NADH	reduced form of nicotinamide dinucleotide
ODHC	2-oxoglutarate dehydrogenase complex
PC	pyruvate carboxylase
PDH	pyruvate dehydrogenase
PEPC	phosphoenolpyruvate carboxylase
TCA	tricarboxylic acid cycle

References

- Azuma, T., Nakanishi, T., Sugimoto, M., 1988. Isolation and characterization of a stable L-arginine producer from continuous culture broth of *Corynebacterium acetoacidophilum*. J. Ferment. Technol. 66, 279-284.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Choi, Y.J., Tribe, D.E., 1982. Continuous production of phenylalanine using an *Escherichia coli* regulatory mutant. Biotechnol. Lett. 4, 223-228.
- Cocaign-Bousquet, M., Guyonvarch, A., Lindley, N.D., 1996. Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 429-436.
- Coello, N., Pan, J.G., Lebeault, J.M., 1992a. *Corynebacterium glutamicum*: morphological and ultrastructural changes of L-lysine producing cells in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 34-38.
- Coello, N., Pan, J.G., Lebeault, J.M., 1992b. Physiological aspects of L-lysine production: effect of nutritional limitations on a producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 259-262.
- Coello, M.N., Hadjsassi, A., Lebeault, J.M., 2001. Effect of the growth rate on the enzymatic activities of L-lysine-producing cells of *Corynebacterium glutamicum*. World J. Microbiol. Biotechnol. 17, 337-341.

- Delaunay, S., Gourdon, P., Lapujade, P., Mailly, E., Oriol, E., Engasser, J.M., Lindley, N.D., Goergen, J.L., 1999a. An improved temperature triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme Microbial. Technol.* 25, 762-768.
- Delaunay, S., Uy, D., Baucher, M.F., Engasser, J.M., Guyonvarch, A., Goergen, J.L., 1999b. Importance of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation. *Metab. Eng.* 1, 334-343.
- Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N.D., Coccagn-Bousquet, M., 1997. Control of the shift from homolactic to mixed acid fermentation in *Lactococcus lactis* : predominant role of the NADH:NAD ratio. *J. Bact.* 179, 5282-5287.
- Godel, H., Seitz, P., Verhoef, M., 1992. Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. *LC GC Int* 5, 44-49.
- Gourdon, P., 1999. Etude physiologique d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* productrice d'acide glutamique: quantification des flux métaboliques et des contraintes biochimiques en phase de production. Ph.D. Thesis, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.
- Gourdon, P., Lindley, N.D., 1999. Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 1, 224-231.
- Guillouet, S., Jo, Y.B., Lessard, P., Shaver, X., Willis, L., Stephanopoulos, G., Sinskey, A.J., 1998. Manipulation of carbon central metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. Proceedings of the Metabolic Engineering II meeting, Schloss Elmau-Germany.
- Hinman, L.M., Blass, J.P., 1981. An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crude tissue homogenates. *J. Biol. Chem.* 256, 6583-6586.
- Hirao, T., Nakano, T., Azuma, T., Sugimoto, M., Nakanishi, T., 1989. L-lysine production in continuous culture of an L-lysine hyperproducing mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 269-273.
- Ishizaki, A., Yamamoto, K., Furuta, Y., 1995. A new method for the accurate and rapid determination of the concentrations of intracellular metabolites in cells during fermentation. *Biotechnol. Tech.* 9, 409-412.
- Kanno, S., Kimura, E., Matsu, K., Kurahashi, O., Horino, I., Nakamatsu, T., 2000. Method for producing L-glutamic acid by fermentation. European Patent 1010755 A1.
- Kawaguchi, A., Seyama, Y., Sasaki, K., Okuda, S., Yamakawa, T., 1979. Thermal regulation of fatty acid synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Biochem.* 85, 865-869.
- Kawahara, Y., Takahashi-Fuke, K., Shimizu, E., Nakamatsu, T., Nakamori, S., 1997. Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1109-1112.

- Kimura, E., Kawahara, Y., Nakamatsu, T., 1998. Studies of L-glutamate production in coryneform bacteria by using metabolic-flux analysis. 7th International conference on computer applications in Biotechnology, Osaka, Japan.
- Kinoshita, S., 1985. Glutamic acid bacteria. In: Demain, A.L., Solomon, N.A., (Eds.), *Biology of Industrial Microorganisms*. London: Benjamin / Cummings. pp. 115-142.
- Kiss, R.D., Stephanopoulos, G., 1992a. Metabolic characterization of a L-lysine-producing strain by continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 565-574.
- Kiss, R.D., Stephanopoulos, G., 1992b. Culture instability of auxotrophic amino acid producers. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 75-85.
- Lapujade, P., Goergen, J.L., Engasser, J.M., 1999. Glutamate excretion as a major kinetic bottleneck for the thermally triggered production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 1, 255-261.
- Lapujade, P., 2000. Etude cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate : importance de contenu cellulaire et l'étape d'excrétion de glutamate. Ph.D. thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Mejià, R., Gómez-Eichelmann, M.C., Fernández, M.S., 1999. *Escherichia coli* membrane fluidity as detected by excimerization of dipyrrenylpropane : sensitivity to the bacterial fatty acid profile. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 156-160.
- Meers, J.L., Tempest, D.W., Brown, C.M., 1970. Glutamine (amide)-2-oxoglutarate-amidotransferase oxidoreductase (NADP) an enzyme involved in the synthesis of glutamate in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64, 187-194.
- Momose, H., Takagi, T., 1978. Glutamic acid production in biotin-rich media by temperature sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a novel fermentation process. *Agric. Biol. Chem.* 42, 1911-1917.
- Mori, M., Shiio, I., 1985. Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant. *J. Biochem.* 97, 1119-1128.
- Nunheimer, T.D., Birnbaum, J., Ihnen, E.D., Demain, A.L., 1970. Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl. Microbiol.* 20, 215-217.
- Oh, N.S., Sernetz, M., 1993. Turnover characteristics in continuous L-lysine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 691-695.
- Peters-Wendisch, P.G., Schiel, B., Wendisch, V.F., Katsoulidis, E., Mökel, B., Sahn, H., Eikmanns, B.J., 2001. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 295-300.
- Schwinde, J.W., Hertz, P.F., Sahn, H., Eikmanns, B.J., Guyonvarch, A., 2001. Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* : molecular and physiological analysis of the *lpd* gene and characterization of the enzyme. *Microbiology* 147, 2223-2231.

- Shiio, I., Otsuka, S.I., Takanashi, M., 1962. Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* 51, 56-62.
- Shiio, I., Ozaki, H., 1968. Concerted inhibition of isocitrate dehydrogenase by glyoxylate plus oxaloacetate. *J. Biochem.* 64, 45-53.
- Shiio, I., Ujigawa, K., 1978. Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* 84, 647-657.
- Shiio, I., Ujigawa-Takeda, K., 1980. Presence and relation of α -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1897-1904.
- Sonntag, K., Schwinde, J., Graaf, A.A.de, Marx, A., Eikmanns, B.J., Wiechert, W., Sahn, H., 1995. ^{13}C NMR Studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 489-495.
- Sun, Z., Yu, Z., Yang, Y., Jin, H., Yan, H., 1989. Fermentation production of L-glutamic acid from rice hydrolysate by temperature-sensitive mutant *Corynebacterium crenatum* N 1. *Gongye Weishengwu* 19, 9-14.
- Takinami, K., Yoshii, H., Tsuru, H., Odaka, H., 1965. Biochemical effect of fatty acid and its derivatives on glutamic acid fermentation. III. Biotin-tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 29, 351-359.
- Ueda, K., 1972. Continuous fermentation. In : Yamada, S., Kinoshita, S., Tsunoda, T., Aida, K., (Eds.), *The microbial production of amino acids*. New York: Wiley. pp. 181-201.
- Uy, D., Delaunay, S., Engasser, J.M., Goergen, J.L., 1999. A method for the determination of pyruvate carboxylase activity during the glutamic acid fermentation with *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Methods*, 39, 91-96.
- Von der Osten, C.H., Gioannetti, C., Sinskey, A.J., 1989. Design of a defined for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnol. Lett.* 11, 11-16.
- Zhao, Y., Lin, Y.H., 2001. The effect of growth rates on the recovery of amino acids. *Biotechnol. Lett.* 23, 1043-1046.

ANNEXE 3 : Etude de l'activité α -cétoglutarate déshydrogénase de *C. glutamicum* 2262 au cours de fermentation glutamique

Relation between the activity of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and the glutamate intracellular concentration in the glutamate-producing strain, *Corynebacterium glutamicum* 2262

Davin Uy^a, Stéphane Delaunay^b, Pierre Germain^b, Jean-Marc Engasser^b,
and Jean-Louis Goergen^{a*}

^a Laboratoire des Sciences du Génie Chimique - CNRS and ^b Laboratoire Bioprocédés Agro-alimentaires - ENSAIA. Institut National Polytechnique de Lorraine - 2, Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

* Corresponding author. Tel.: +33-3-8359-5844; fax: +33-3-8359-5804. E-mail address: Jean-Louis.Goergen@ensaia.inpl-nancy.fr

Projet de publication

Abstract: The activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) in the glutamate-producing strain, *Corynebacterium glutamicum* 2262, has been investigated during growth and glutamate production. During the growth in batch or continuous cultures at 33°C, the intracellular glutamate content was between 60 and 80 mg/g DW and the ODHC activity was between 2 and 6 nmol/min.mg protein. When the glutamate excretion was induced by an increase in the culture temperature from 33 to 39°C, the intracellular glutamate content decreased to 40 mg/g DW in batch culture and to 30 mg/g DW in continuous culture. At this low level of intracellular glutamate, no more ODHC activity was detected. When cells were cultivated in a medium containing glutamate as sole source carbon at 33°C, the maximum intracellular glutamate content, 110 mg/g DW, and ODHC activity, 34 nmol/min.mg protein, were determined. These results showed that the expression of the ODHC enzyme in *C. glutamicum* 2262 and the glutamate intracellular concentration were closely related. Two hypothesis are emitted to explain this relation.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, 2-oxoglutarate dehydrogenase, glutamate, temperature.

Introduction

Corynebacterium glutamicum and related organisms are used for the industrial production of amino-acids for five decades (Kinoshita et al. 1985). The glutamate excretion can be induced either by the cultivation of the bacteria in a biotin-deficient medium (Shiio et al. 1962) or, in a biotin-rich medium, by (i) the addition of surfactant (Takinami et al. 1965), (ii) of penicillin (Nunheimer et al. 1970), (iii) by an increase in the culture temperature (Momose and Takagi 1978; Delaunay et al. 1999). Though many investigations have been carried out, in particular on the modification of the membrane composition during the process, the precise mechanism of the glutamate excretion remains unclear. It has been suggested that the glutamate

would be excreted by a specific glutamate exporter using cellular energy. This exporter would be activated after the induction of the amino-acid excretion (Hoischen and Krämer 1989; Gutmann et al. 1992). However, so far, the glutamate exporter gene has not been identified.

Interestingly, in both biotin limitation and Tween 40 (surfactant) addition processes, the 2-oxoglutarate dehydrogenase (ODHC) activity is highly reduced during the glutamate excretion phase (Kawahara et al. 1997; Kimura et al. 1999). This decrease could be related to a modification in the fatty acids biosynthesis. Indeed, the biotin is a cofactor of the acetyl-CoA carboxylase (Jäger et al. 1996) and Tween 40 was supposed to repress the synthesis of a protein, encoded by *dtsR*, presenting some homologies with enzymes involved in the fatty acids synthesis (Kimura et al. 1999). Moreover a *dtsR*-disrupted mutant of *C. glutamicum* exhibiting a decrease in ODHC activity compared to the wild-type strain, became auxotroph for oleic acid and was able to produce 40 g/l glutamate even in presence of a non-limiting biotin concentration (Kimura et al. 1997). It was also shown that an ODHC-disrupted mutant was able to produce a high concentration of glutamate in biotin non-limiting condition. No modification of the fatty acids composition was determined in this mutant. This last data would suggest that the glutamate excretion could be due not to a modification in the cytoplasmic membrane composition, but to a decrease in the ODHC activity. Such a decrease would lead to a carbon overflow towards the glutamate synthesis at the 2-oxoglutarate branch point (Kimura 2002). To strengthen this hypothesis, the process in which the glutamate excretion is induced by an addition of penicillin, an antibiotic inhibiting the septum-peptidoglycan synthetase (Wijayarathna et al. 2001), has to be mentioned. During this process, allowing the excretion of large amounts of glutamate, the composition of the cytoplasmic membrane is not affected (Shibukawa et al. 1968) but the level of ODHC activity is also highly decreased (Kawahara et al. 1997).

The relation between cellular envelope composition, ODHC activity and glutamate excretion remains unclear. To obtain additional data, we investigated the ODHC expression during growth and glutamate production phases of temperature-triggered processes (in batch and continuous mode) with *C. glutamicum*. The relation between the level of ODHC activity and the intracellular glutamate content was analysed as well.

Materials and Methods

Bacterial strain, medium composition and culture conditions

The strain used throughout this study was *Corynebacterium glutamicum* 2262, provided by Orsan-Amylum SA. The composition of the culture medium was based on MCGC medium (Von der Osten et al. 1989) in which the citrate was replaced by deferroxamine. The medium contained 60 and 15 g/l glucose for, respectively, batch and continuous cultures. In the culture with glutamate as sole carbon source, glucose was replaced by 30 g/l of potassium glutamate. Polypropylene glycol was used as antifoaming agent.

The inoculum was grown in shake-flask culture at 33°C in modified MCGC, supplemented with NaHPO₄ (3.8 g/l) and urea (0.39 mg/l). Glucose concentration was 34 g/l and pH was set at 7.6 with NaOH. An overnight culture of *C. glutamicum* was used to inoculate a 3 liters bioreactor (APPLIKON, Holland) containing 1.5 litre of modified MCGC. In batch culture the culture temperature was increased from 33 to 39°C when cells were in the exponential growth phase (after 3.75 h of culture at 33°C). In continuous culture, when glucose was exhausted, the culture was fed with modified MCGC. The increase in the culture temperature from 33 to 39°C was performed when the supplementation was started. The pH set point was 7.6, regulated with NH₃ 12 N. The agitation was set at 1200 RPM to avoid oxygen limitation. In the culture with glutamate as sole carbon source, the temperature was maintained at 33°C, whereas the pH was regulated at 7.6 with H₂SO₄ 4 N.

Extracellular concentrations

During cultivation, samples were collected to determine biomass and glutamate concentration. The cell concentration was determined by absorbance at 570 nm (spectrophotometer) and by a direct gravimetric method to avoid the overestimation due to changes in cell morphology during the cultivation. After sample centrifugation (13,000 RPM, 5 min, Microfuge lite, Beckman), the glutamate concentration was enzymatically determined on the supernatant (Roche, Germany).

Intracellular glutamate concentration

Cells of a 500 µl sample were separated from the medium by centrifugation on 500 µl of a mixture of 1-bromo-hexadecan and 1-bromo-heptan (specific gravity, 1.07) as separation layer and 250 µl 21 % HClO₄ as acid fixation layer: 64,000 g, 5 min and 4°C (Ishizaki et al. 1995). The sedimented cells in the acid layer were further disrupted using three cycles of a freezing/thawing procedure; the resulting extracts were neutralised in the cold by adding 5 M KOH. The supernatant obtained by centrifugation (32,000 g, 4°C) was used for intracellular glutamate determination. After derivatization with o-phthalaldehyde, glutamate was analysed by HPLC (Hewlett Packard model 1090, Les Ulis, France) using a Hewlett Packard C18 column (Godel et al. 1992). The reproducibility of the procedure within a given fivefold determination was ± 15 %.

Enzyme assay

Cells collected from the culture were washed twice in KCl (2 g/l), resuspended in N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid (TES)-NAOH buffer (100 mM, pH 7.7) containing 30 % (v/v) glycerol. Cells, kept in ice during the treatment, were disrupted by sonication (40 kHz, 8 cycles of 30 and 60 s spaced out). Cell debris were removed by centrifugation at 4°C for 15 min, at 10,000g. The cell-free extracts were therefore filtrated on a gel PD10 column (LKB-Pharmacia). ODHC was assayed by the method of Shiio and Ujigawa-Takeda (1980). Endogenous activity was quantified without 2-oxoglutarate. The protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford et al. 1976) using bovine serum albumin as standard. The reproducibility of the test within a given fivefold determination was ± 20%.

Results

C. glutamicum kinetics in batch and continuous cultures

The variations in the glutamate production, glutamate intracellular concentration and the ODHC activity were investigated in both batch and continuous cultures. In batch culture, cells were first cultivated at 33°C and were switched to the glutamate production by an increase in the medium temperature to 39°C (Fig. 1A). The biomass concentration which increased rapidly during the growth phase, was gradually inhibited during the production phase. The final biomass concentration reached 4.2 g/l after a 23 h culture. At the end of the process, the glucose, initially 60 g/l, was exhausted and 20 g/l of glutamate were produced. The specific glutamate production rate reached its maximum, about 0.6 g/g.h, 3 h after the temperature increase. It then decreased progressively till the end of the culture.

In each continuous culture, glucose, the sole carbon source, was maintained at limiting concentration for all steady states. In the continuous culture performed at 33°C, for dilution rates

ranging between 0.05 and 0.5 h⁻¹, the biomass concentration increased with the dilution rate (table 1).

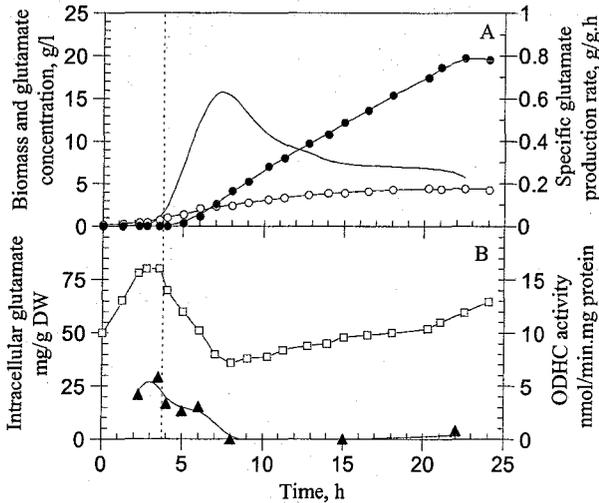


Figure 1: *C. glutamicum* 2262 batch culture performed at 39°C: (○) biomass, (●) glutamate concentration, (—) specific glutamate production rate, (□) glutamate intracellular concentration and (▲) 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) activity. The vertical dashed line indicated the time when the temperature was increased from 33 to 39°C.

	Dilution rate, h ⁻¹				
	0.05	0.1	0.15	0.3	0.5
Biomass, g/l	5.8	6.7	7.3	8.5	10
Intracellular glutamate, mg/g	65	62	58	65	55
ODHC nmol/min.mg of protein	1.8	3.3	4	3	2.5

Table 1: Biomass concentration, intracellular glutamate level and ODHC activity of *C. glutamicum* 2262 at various steady states of a continuous culture performed at 33°C.

No production of glutamate was observed during the different steady states. During the continuous culture at 39°C for a single dilution rate, 0.05 h⁻¹, the biomass concentration declined dramatically from 11 to 0.5 g/l between 5 and 90 h culture. The growth was thereafter restored and the final concentration attained 3.2 g/l (Fig 2A). The glutamate was produced for 150 h after the induction and its maximal concentration was 6 g/l. The decrease in the glutamate concentration between 50 h and 96 h culture has to be related to the decrease in the biomass concentration. During this period the glucose was not completely consumed. After a 150 h period, the glutamate excretion was abolished. These dramatic changes in the biomass and glutamate concentrations could be due a cell selection, in favor of growth and to the detriment of glutamate production (Uy et al. in press). A similar loss of the glutamate productivity was

previously observed during a continuous process in which the glutamate excretion was induced by an addition of penicillin (Ueda 1978).

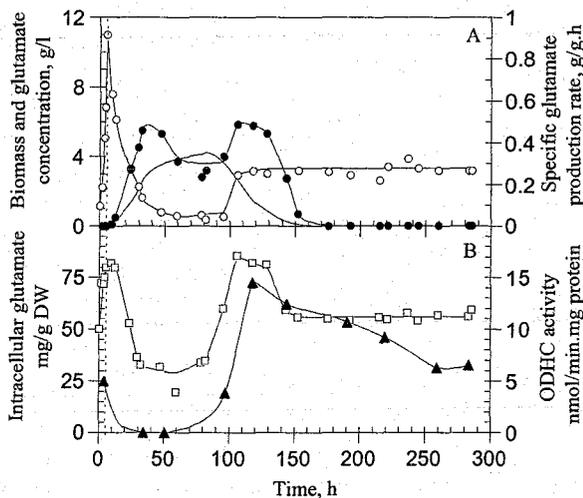


Figure 2: *C. glutamicum* 2262 continuous culture at 39°C, $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$: (○) biomass, (●) glutamate, (—) specific glutamate production rate, (□) intracellular glutamate and (▲) 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) activity. The vertical dashed line indicated the time when both the continuous supplementation of medium and the temperature increase from 33 to 39°C were imposed.

Glutamate intracellular concentration and ODHC activity during batch and continuous cultures

During the growth phase of the batch culture, whereas no excretion was measured, the internal concentration of glutamate reached 80 mg/g DW. In the same time, the ODHC activity was 6 nmol/min.mg protein (Fig. 1B). When the excretion started, the glutamate intracellular concentration immediately decreased. The lowest level of intracellular glutamate, *i.e.* 40 mg/g DW, was determined 3 hours after the temperature change when the highest value of specific glutamate production rate was attained. Thereafter, the internal concentration of glutamate increased slightly till the end of the culture. However, the initial level of intracellular glutamate was not restored. The ODHC activity decreased rapidly after the induction of the glutamate excretion and no more activity could be detected after 8 h culture.

For each steady state of the continuous culture at 33°C, whereas no glutamate was detected in the culture medium, the intracellular glutamate level was quite similar, about 60 mg/g DW (Table 1). In these culture conditions, low ODHC activities, between 2 and 4 nmol/min.mg protein, were determined.

During the continuous culture at 39°C, the profiles of glutamate intracellular concentration and ODHC activity were close to those observed during the batch culture (Fig. 2B). After the increase in the culture temperature, the glutamate was excreted and the glutamate intracellular concentration decreased from 80 to 32 mg/g DW. This low level was maintained up to 80 h culture. From 96 h culture, the glutamate intracellular concentration increased again to reach a maximum of 85 mg/g DW at 110 h. Then, the internal concentration declined to a value

of 58 mg/g DW and was maintained at this level for the remainder of the culture. At the lowest concentration of intracellular glutamate (32 mg/g DW), no ODHC activity was detected (Fig. 2A). On the contrary, during the initial batch phase and when the cells were losing their ability to produce glutamate (after 96h culture), an enzyme activity was measured.

Glutamate intracellular concentration and ODHC activity during batch culture with glutamate as sole carbon source

C. glutamicum 2262 was cultivated at 33°C in a medium containing 30 g/l of glutamate instead of glucose as sole carbon source in order to try to increase the glutamate intracellular concentration and then to correlate this concentration with the ODHC activity.

Carbon source	Intracellular glutamate (mg/g DW)	ODHC (nmol/min.mg protein)
Glucose	80	6
Glutamate	110	34

Table 2: Effect of carbon source on the glutamate intracellular content and the ODHC activity in *C. glutamicum* 2262.

It is important to note that till 30 g/l of glutamate in the culture medium, the measurement of intracellular glutamate content is not affected by extracellular glutamate (Lapujade 2000). In such a medium the highest level of intracellular glutamate we obtained in this study, 110 mg/g DW, was measured during the exponential growth phase. Concomitantly, the ODHC activity was 34 nmol/min.mg protein (table 2). This enzyme activity represented as well the highest activity that we determined in our experiments. Such an increase in ODHC activity was previously reported with *Brevibacterium flavum* cultivated in a medium containing monosodium glutamate (50 g/l) as sole carbon source compared to cultures with glucose or with a mixture of glucose and glutamate as carbon sources (Shiio and Ujigawa-Takeda 1980; Shiio et al. 1982).

Discussion

In bacteria, the ODHC enzyme is usually composed of 3 subunits, the 2-oxoglutarate dehydrogenase (E1 α), the dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 α) and the dihydrolipoamide dehydrogenase (E3). However, in *C. glutamicum*, the *odhA* gene might encode a bifunctional protein possessing both E1 α and E2 α activities (Usuda et al. 1996). The dihydrolipoamide dehydrogenase (E3), a common sub-unit with the pyruvate dehydrogenase complex, takes part in the electrons transfer within the respiratory chain (Schwinde et al. 2001). Since neither the glutamate exporter, nor the modification of the membrane composition responsible for glutamate excretion was still identified, Kimura (2002) suggested that the mechanism of glutamate production would be related to the decrease in ODHC activity. Very recently, the flux distribution at the 2-oxoglutarate branch point in *C. glutamicum* was investigated in detail (Shimizu et al. 2003). It was then shown that the factor with the greatest impact on glutamate production was the attenuation of ODHC activity. However, the relation between this enzyme activity modulation and the glutamate production remains unclear. The glutamate production can not be simply explained by a redirection of the carbon flux toward the glutamic acid synthesis due to the decrease in ODHC activity. Indeed, the glutamate synthesis rate (taking into account biomass formation, intracellular accumulation and excretion) was shown to be higher during the glutamate production phase than during the growth phase (Lapujade 2000).

Whatever the culture mode and the carbon source, we determined that, in *C. glutamicum* 2262, the glutamate intracellular concentration decreased after the induction of glutamate excretion. This phenomenon was previously observed during the process with biotin limitation (Hoischen and Krämer 1989). Moreover, in our study a close relation between glutamate production, ODHC activity and glutamate intracellular concentration was observed. High glutamate excretion rates coincided with the decrease in the glutamate intracellular titer and in the ODHC activity. When the concentration of the intracellular glutamate was lower than 40 mg/g DW, no ODHC activity was detected (Fig. 3). This attenuation in the ODHC activity during the amino-acid production phase was previously determined in some other processes (Kawahara et al. 1997; Kimura et al. 1999). These observations have also to be related to the report of Shiio et al. (1982) who observed the same level of glutamate production in an ODHC-disrupted mutant compared to its parent strain. It can be supposed that, in both strains, ODHC activity could not be detected during the glutamate production phase.

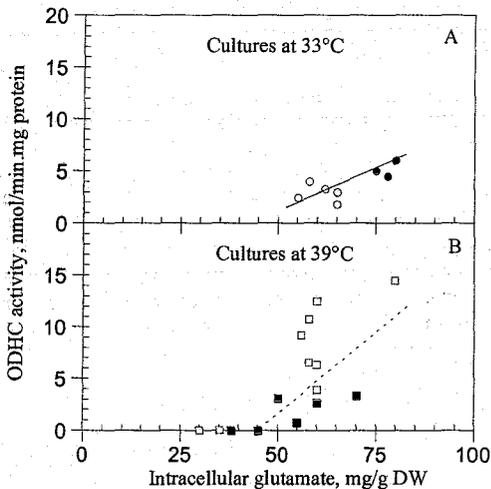


Figure 3: Relation between the intracellular glutamate level and the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) activity in *C. glutamicum* 2262 cultivated in (○) continuous culture at 33°C, (●) batch culture at 33°C, (□) continuous culture at 39°C, and (■) batch culture at 39°C.

To explain the concomitance between the decreases in glutamate intracellular concentration and ODHC activity, two hypothesis can be put forward. The first could be that the expression of the ODHC would be controlled by the glutamate intracellular titre. In the nitrogen metabolism, glutamate represents a key metabolite. With glutamine, this amino-acid is used as ammonia donor in a large number of amino and nucleic acids forming pathways. In fact, for the cell, the inactivation of ODHC expression would be a mechanism allowing the restoration of glutamate intracellular concentration which was diminished because of the excretion. On the contrary, the intracellular accumulation of glutamate would induce a high synthesis of OHDC, which would be necessary to control the intracellular glutamate level and the synthesis of co-factors *via* TCA cycle. Then, the sequence of events taking place after the increase in the temperature of the culture medium could be as follows. The temperature up-shift would rapidly

induce the excretion of glutamate by a still non-identified specific transporter. As a consequence, the glutamate intracellular concentration would decrease. Therefore, in order to restore the initial glutamate titre, the ODHC activity would diminish as well.

The second hypothesis is based on the potential cellular localisation of ODHC. It was previously suggested that the E3 sub-unit of this enzyme might be involved in reducing equivalent transport in the membrane of *C. glutamicum* (Schwinde et al. 2001). Following this hypothesis, it could be reasonable to assume that the ODHC activity would be dependant on the membrane state. Most of the processes and strain mutations allowing the production of glutamate can be classified in two categories: those provoking a modification in the lipidic composition of the cytoplasmic membrane and those inducing a change in the formation of the peptidoglycan-arabinogalactan layer. Biotin limitation, surfactant addition (Kimura et al. 1996; Kimura et al. 1999) and the temperature triggered process as well, belong to the first category. Indeed, it was previously shown that, in *C. glutamicum* 2262, the increase in the culture temperature modified the lipidic composition of the strain (Gourdon 1999). The changes in the membrane state due to the temperature up-shift might then provoke simultaneously a decrease in the ODHC activity and an induction of the glutamate excretion which would be responsible for the decrease in the glutamate intracellular concentration. The main process included in the second class is the penicillin addition. Due to the very close relations between the different layers of *C. glutamicum* cell envelope (Eggeling and Sahm 2001), the modification of the peptidoglycan-arabinogalactan layer following the antibiotic addition could be supposed to affect the structure and then the proprieties of the overall envelope. As said above, such changes could be supposed to affect simultaneously ODHC activity and glutamate intracellular concentration.

To select the more realistic hypothesis, a proteomic study of *C. glutamicum* 2262 during the temperature triggered process would be helpful. The presence of a non-active form of ODHC during the glutamate production phase would be in favour of the second hypothesis we emitted. On the contrary, the absence of the enzyme would strengthen the first.

Acknowledgements

The fellowship of D. Uy was financed by A.U.F. (Agence Universitaire de la Francophonie, Paris, France).

References

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Delauay S., Gourdon P., Lapujade P., Mailly E., Oriol E., Engasser J.-M., Lindley N. D. et Goergen J.-L. (1999) An improved temperature triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enz Microb Technol*, 25: 762-768.
- Eggeling L, Krumbach K, Sahm H (2001) L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or tween addition doing the same? *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 67-68.
- Godel H, Seitz P, Verhoef M (1992) Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. *LC GC Int* 5: 44-49.

Gourdon P (1999) Etude physiologique d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* productrice d'acide glutamique : quantification des flux métaboliques et des contraintes biochimiques en phase de production. Ph.D. thesis, INSA Toulouse, France.

Gutmann M, Hoischen C, Krämer R (1992) Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim Biophys Acta* 1112: 115-123.

Hoischen C, Krämer R (1989) Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* 151: 342-347.

Ishizaki A, Yamamoto K, Furuta Y (1995) A new method for the accurate and rapid determination of the concentrations of intracellular metabolites in cells during fermentation. *Biotechnol Tech* 9: 409-412.

Jäger W, Peters-Wendisch PG, Kalinowski J, Pühler A (1996) A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins. *Arch Microbiol* 166: 76-82.

Kawahara Y, Takahashi-Fuke K, Shimizu E, Nakamatsu T, Nakamori S (1997) Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci Biotech Biochem* 61: 1109-1112.

Kimura E (2002) Triggering mechanism of L-glutamate overproduction by *dtsR1* in coryneform bacteria. *J Biosci Bioeng* 94: 545-551.

Kimura E, Abe C, Kawahara Y, Nakamatsu T (1996) Molecular cloning of a novel gene, *dtsR*, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci Biotech Biochem* 60: 1565-1570.

Kimura E, Abe C, Kawahara Y, Nakamatsu T, Tokuda H. (1997) A *dtsR* gene-disrupted mutant of *Brevibacterium lactofermentum* requires fatty acids for growth and efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 157-61.

Kimura E, Yagoshi C, Kawahara Y, Ohsumi T, Nakamatsu T, Tokuda H (1999) Glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* triggered by a decrease in the level of a complex comprising *dtsR* and biotin-containing subunit. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 1274-1278.

Kinoshita S (1985) Glutamic acid bacteria. In: Demain AL, Solomon NA (eds) *Biology of Industrial Microorganisms*. London: Benjamin / Cummings, pp 115-142.

Lapujade P (2000) Etude cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* productrice de glutamate: importance de contenu cellulaire et l'étape d'excrétion de glutamate. Ph.D. thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

Momose H, Takagi T (1978) Glutamic acid production in biotin-rich media by temperature sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a novel fermentation process. *Agric Biol Chem* 42: 1911-1917.

- Nunheimer TD, Birnbaum J, Ihnen ED, Demain AL (1970) Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl Microbiol* 20: 215-217.
- Schwinde JW, Hertz PF, Sahn H, Eikmanns BJ, Guyonvarch A (2001) Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: molecular and physiological analysis of the *lpd* gene and characterization of the enzyme. *Microbiology* 147: 2223-2231.
- Shibukawa M, Kurima M, Okabe S, Ohsawa T (1968) L- glutamic acid fermentation with molasses. Part X. On the difference in mechanisms for the bacterial extracellular accumulation of L-glutamate between fatty acid derivative and penicillin. *Agric Biol Chem* 32: 641-645.
- Shiio I, Otsuka SI, Takanashi M (1962) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J Biochem* 51: 56-62.
- Shiio I, Ozaki H, Mori M (1982) Glutamate metabolism in a glutamate producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. 46: 493-450.
- Shiio I, Ujigawa-Takeda K (1980) Presence and relation of α -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric Biol Chem* 44, 1897-1904.
- Shimizu H, Tanaka H, Nakato A, Nagahisa K, Kimura E, Shioya S (2003) Effects of changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst Eng* 25, 291-298.
- Takinami K, Yoshii H, Tsuru H, Odaka H (1965) Biochemical effect of fatty acid and its derivatives on glutamic acid fermentation. III. Biotin-tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric Biol Chem* 29: 351-359.
- Ueda K (1972) Continuous fermentation. In: Yamada S, Kinoshita S, Tsunoda T, Aida K, (eds) *The microbial production of amino acids*. New York: Wiley, pp 181-201.
- Usuda Y, Tujimoto N, Abe C, Asakura Y, Kimura E, Kawahara Y, Kurahashi O, Matsui H (1996) Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase *Microbiology* 142: 3347-3354.
- Uy D, Delaunay S, Germain P, Engasser JM, Goergen JL (Article in press). Instability of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in continuous culture using the temperature-triggered process. *J Biotechnol*.
- Von der Osten CH, Gioannetti C, Sinskey AJ (1989) Design of a defined for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnol Lett* 11: 11-16.
- Wijayarathna CD, Wachi M, Nagai K (2001) Isolation of *fsl* and *murE* genes involved in peptidoglycane synthesis from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 466-470.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

000

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Gérard LEBLON, Professeur, Université Paris-Sud

Monsieur Jean-François CAVIN, Professeur, ENSBANA, Université de Bourgogne

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur UY Davin

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

« **Étude cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours de la
fermentation glutamique : instabilité de la production de glutamate en procédé continu
thermo-induit** ».

en vue de l'obtention du titre de :

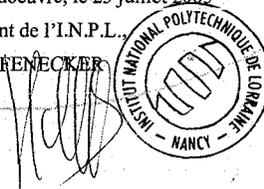
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 23 juillet 2003

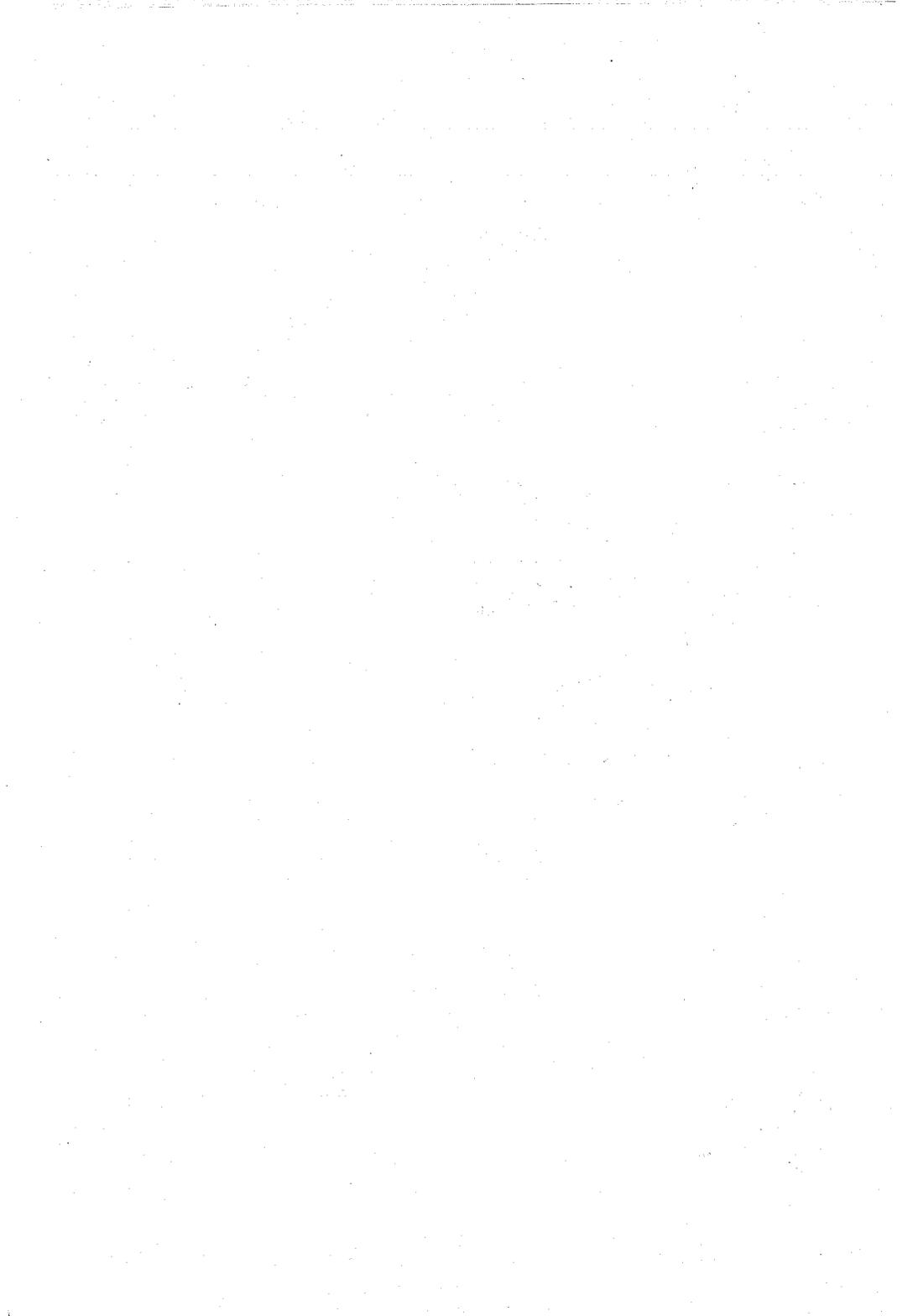
Le Président de l'I.N.P.L.

L. SCHUFRENECKER



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANCEUVRE CEDEX

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy - Brabois



Résumé : L'objectif général de ce travail est l'étude de la cinétique et du métabolisme de *Corynebacterium glutamicum* 2262 lors de la fermentation glutamique. L'excrétion de glutamate est induite par une élévation de la température de culture de 33 à 39°C qui permet d'orienter du métabolisme vers la synthèse et l'excrétion de glutamate au détriment de la croissance. En procédé continu à 39°C, $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, une production de glutamate sur une période de 150 h a été réalisée ; après cette période, les cellules ne sont plus capables de produire du glutamate mais capables de croître rapidement. Lorsque les cellules produisent du glutamate, les activités pyruvate déshydrogénase et α -cétoglutarate déshydrogénase sont respectivement réduite et absente. Les effets du choc de température à 39°C sur le métabolisme de l'oléate et du palmitate ainsi que sur la fluidité de la paroi cellulaire de cette bactérie ont également été étudiés pendant la fermentation glutamique.

Study of kinetic and metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262 during the glutamate fermentation : instability of the glutamate production in the continuous process

Abstract : The aim of this work is to study the kinetics and metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262 during the glutamate fermentation. The glutamate excretion is induced by an increase in culture temperature from 33 to 39°C. This treatment provokes a metabolic redirection via the glutamate synthesis and excretion followed by a growth abolition. In continuous fermentation at 39°C, the glutamate can be produced till producing cells, non growth cells, are washed from bioreactor (during 150 h for $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$). When cells produce the glutamate, the pyruvate dehydrogenase and the oxoglutarate dehydrogenase are respectively reduced and inactivated, which are probably due to a decrease in the intracellular glutamate or an alteration of the membrane. The effect of temperature shock on fatty acids synthesis and on *C. glutamicum* 2262 cell wall fluidity has also been investigated.

Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Mots-Clés : *Corynebacterium glutamicum*, Glutamate, Choc de température, Physiologie microbienne, Acides gras, Fluidité membranaire, Fermentation continue, Enzyme intracellulaire