

Étude du comportement physiologique d'une souche de Yarrowia lipolytica en croissance sur des co-produits industriels : production orientée de lipides cellulaires

Séraphim Papanikolaou

▶ **To cite this version:**

Séraphim Papanikolaou. Étude du comportement physiologique d'une souche de Yarrowia lipolytica en croissance sur des co-produits industriels : production orientée de lipides cellulaires. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1998. Français. NNT : 1998INPL134N . tel-01750878

HAL Id: tel-01750878
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750878

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

13600 49252
98 INPL 134N
(9) 1998 PAPANIKOLAOU S.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique

THESE

présentée en vue d'obtenir le titre de

DOCTEUR

de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Spécialité : **Biotechnologies et Industries Alimentaires**

par

Séraphim PAPANIKOLAOU

ETUDE DU COMPORTEMENT PHYSIOLOGIQUE D'UNE SOUCHE DE Yarrowia lipolytica EN CROISSANCE SUR DES CO-PRODUITS INDUSTRIELS : PRODUCTION ORIENTEE DES LIPIDES CELLULAIRES

Soutenue publiquement le 16 décembre 1998 devant la commission d'examen :

Président - Rapporteur :	**M. Pierre GERMAIN**
Rapporteurs :	**M. Jean Pierre RIBA**
	M. Georges AGGELIS
Examinateurs :	**Mme Isabelle CHEVALOT**
	M. Ivan MARC

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

AVANT PROPOS

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Sciences du Génie Chimique (L.S.G.C.) - Groupe de Génie de Procédés Biotechnologiques et Alimentaires (G.P.B.A.). Tous mes remerciements vont, avant tout, à la Fondation des Bourses d'Etat (I.K.Y.), Athènes - Grèce, pour la confiance qu'elle m'a témoignée en m'attribuant une bourse. Sans cette aide financière, ce travail n'aurait jamais été réalisé.

Je tiens à remercier pour leur acceuil le Dr. Hans-Günter LINTZ, Directeur du Laboratoire de Sciences du Génie Chimique (L.S.G.C.) et le Dr. Ivan MARC, Directeur de Recherche au C.N.R.S. et du Groupe de Génie de Procédés Biotechnologiques et Alimentaires (G.P.B.A.).

Je sais gré au Dr. Ivan MARC, Directeur de Recherche au C.N.R.S. et au Dr. Isabelle CHEVALOT, Maître de Conférences à l'E.N.S.A.I.A. pour leur encadrement et leur patience, leur encouragement et leur sympathie.

J'exprime tous mes remerciements au Dr. Georges AGGELIS, Professeur Assistant à l'Université Agronomique d'Athènes pour ces conseils précieux et son encouragement, ainsi que d'avoir accepté et pris le temps d'être rapporteur de ce travail.

Je tiens à remercier le Dr. Pierre GERMAIN, Professeur à l'E.N.S.A.I.A., pour ces conseils très utiles, ainsi que d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et président du jury.

Je remercie le Dr. Jean-Pierre RIBA, Professeur à l'E.N.S.I.G.C. de Toulouse d'être rapporteur de ce travail et de participer à ce jury de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Lionel MUNIGLIA pour la qualité de son travail de D.E.A.. Ma thèse doit beaucoup à son efficacité ainsi que sa gentillesse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Fabrice BLANCHARD pour son efficacité, sa disponibilité, son encouragement et sa gentillesse.

Je remercie très particulièrement Dominique STORCK pour son soutien, son encouragement et sa sympathie.

Tous mes remerciements vont aux personnes qui m'ont accompagné au cours de ces années difficiles :

les copains (docteurs et futurs docteurs) de la Halle de Bio et de P.R.A.B.I.L. Claude, Manu, Rémy, Riton, Silvère

les stagiaires Nath, Sophie B., Sophie V., Laurent J., Laurent B., Wolgang, Jörg, Isabelle S., Isabelle M., Anne-Lise

les "Prabilois" Bruno, Christelle, Jean-Sébastien, Laurence

les copains de l'E.N.S.A.I.A. Bernard, Marie-Thérèse, Evelyne, Catherine, Fabrice, Ali, Thierry, Zahy, Mariane, Hichem, Samia, Stéphane D., Pascale, Damien, Francois, Stéphane C., Véronique, Daniella.

Je ne peux pas oublier mes copains Pierre-Yves et Mohamed pour leur soutien dans les bons comme dans les mauvais moments, à qui j'exprime tous mes remerciements.

Je voudrais adresser un très grand merci à mes copains grecs Pinelopi, Panagiotis, Miltos et plus particulièrement Aliki et Eleni, qui m'ont énormément aidé lors de ces années difficiles.

Enfin, mes remerciements sont adressés plus particulièrement à ma famille, mes parents, mon frère, ma grand-mère et à Santy, qui ont su me soutenir, m'encourager, m'aider et me supporter tout au long de ces années.

Séraphim

PRESENTATION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE page 1-2

Chapitre 1. SYNTHESE BIBLIGRAPHIQUE page 3-46

I. LES MICROORGANISMES OLEAGINEUX page 3-13
I.1. Généralités page 3-4
I.2. Les bactéries oléagineuses page 4-6
I.3. Les algues oléagineuses page 6-7
I.4. Les levures oléagineuses - l'espèce Yarrowia lipolytica page 7-11
I.5. Les champignons oléagineux page 11-13

II. SUBSTRATS MICROBIENS POUR L'ACCUMULATION LIPIDIQUE page 14-27
II.1. Généralités page 14-15
II.2. Substrats de type osidique page 15-21
II.3. Substrats de type hydrocarbures page 21-24
II.4. Substrats de type lipidique page 24-27

III. LES HUILES D'ORGANISMES UNICELLULAIRES (H.O.U.) page 28-38
III.1. Généralités page 28
III.2. Paramètres influençant le processus d'accumulation lipidique page 28-30
III.3. Les acides gras polyinsaturés (A.G.P.I.) page 30-31
III.4. Les succédanés microbiens de beurre de cacao page 31-38

IV. MODELISATION DE LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES SYNTHETISANT D'ACIDE CITRIQUE ET DE LIPIDES CELLULAIRES page 39-44
IV.1. Modélisation de la production d'acide citrique page 39-40
IV.2. Modélisation de l'accumulation de lipides cellulaires page 41-44

V. CONSIDERATIONS ECONOMIQUES - PERSPECTIVES page 45-46

Chapitre 2. MATERIELS - METHODES page 47-64

I. MATERIELS page 47-49
I.1. Produits chimiques page 47-48
I.2. Matériels utilisés page 48-49

II. METHODES page 49-64
II.1. Matériel biologique page 49-50
II.2. Milieux de culture page 50-53
II.3. Conduite des cultures page 53
II.4. Détermination de la matière sèche page 53-54
II.5. Mesure des substrats résiduels page 55-58
II.6. Mesure des produits métaboliques page 58-60
II.7. Analyse de la matière grasse page 60-63
II.8. Exploitation cinétique des résultats page 63-64

Chapitre 3. RESULTATS - DISCUSSION page 65-152

I. CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR LA STEARINE : PRODUCTION ELEVEE DE LIPIDES CELLULAIRES page 65-75
I.1. Introduction page 66
I.2. Results page 66-72
I.3. Discussion page 72-74
I.4. Conclusion page 75

II. CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR DES MELANGES DE STEARINE ET D'HUILE DE COLZA HYDROLYSEE : PRODUCTION D'UN SUCCEDADE MICROBIEN DE BEURRE DE CACAO page 76-96
II.1. Introduction page 77-78
II.2. Results page 78-89
II.3. Discussion page 89-94
II.4. Conclusion page 95-96

III. CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR DES SUBSTRATS OSIDIQUES : PRODUCTION D'ACIDE CITRIQUE page 97-115
III.1. Introduction page 98-99

III.2. Results page 99-110
III.3. Discussion page 110-113
III.4. Conclusion page 114-115

IV. CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR DES MELANGES DE STEARINE ET D'OSES : PRODUCTION D'ACIDE CITRIQUE ET DE LIPIDES CELLULAIRES page 116-130
IV.1. Introduction page 117
IV.2. Results page 117-125
IV.3. Discussion page 125-129
IV.4. Conclusion page 130

V. MODELISATION DE LA CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR DE MELANGES LIPIDIQUES ET SUR GLYCEROL TECHNIQUE page 131-152
V.1. Modélisation d'accumulation et de dégradation des réserves lipidiques chez Yarrowia lipolytica utilisant des graisses industrielles comme seule source carbonée page 132-143
V.2. Modélisation de la production d'acide citrique à partir du glycérol technique chez Yarrowia lipolytica page 144-151
V.3. Conclusion page 152

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES page 153-157

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES page 158-172

NOMENCLATURE

RESUME

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Actuellement dominants dans les industries huilières, les procédés chimiques utilisés lors des différentes étapes de la production et du traitement de la matière grasse (hydrogénation, raffinage, hydrolyse alcaline des triglycérides...), ont tendance à céder la place aux procédés biotechnologiques. Ces derniers, plus délicats à mettre en œuvre et avec des productivités, généralement, plus faibles, présentent une spécificité bien supérieure aux procédés chimiques et des conditions de mise en œuvre plus douces.

De nos jours, la biolipochimie est associée à deux grands secteurs d'intérêt industriel et scientifique : la synthèse de molécules à haute valeur ajoutée par l'intermédiaire d'enzymes et la production d'huiles microbiennes. Les synthèses s'effectuent principalement par l'utilisation des lipases, estérases, protéases et glucosidases dans des milieux à faible teneur d'eau (catalyse dite "non-conventionelle"), afin de synthétiser, notamment, des tensioactifs de type alkyl-, acyl-glucoside... et des triglycérides.

Concernant la production de lipides microbiens (H.O.U. - Huiles d'Organismes Unicellulaires), il s'agit d'un domaine relativement nouveau qui présente de plus en plus d'intérêt aux niveaux scientifique, économique et industriel. Avec une augmentation annuelle de besoins nouveaux de matière grasse de l'ordre de 17%, l'utilisation des microorganismes oléagineux (microbes accumulant des quantités supérieures de 20% en masse de matière grasse rapportée à la matière sèche) devient intéressante, surtout en regard de graisses animales et végétales, peu valorisées actuellement, pour la production des lipides particuliers. De même, d'autres co-produits industriels tels le lactosérum et les mélasses, ou des produits caractérisés comme "polluants" tels l'acide acétique ou les hydrocarbures liquides, sont apparus pour être des substrats carbonés favorables à la croissance et à la production des lipides cellulaires par les microorganismes oléagineux.

Bien que la production des H.O.U. demeure plus chère comparativement à la production des graisses et huiles traditionnelles (puisque le coût de la fermentation et l'extraction subséquente est élevé), les lipides microbiens montrent toujours un intérêt industriel potentiel. Les microorganismes oléagineux peuvent, en effet, synthétiser des lipides riches en acides gras polyinsaturés, peu répandus dans la nature, tels les acides arachidonique et γ-linolénique. De même, les microorganismes oléagineux, dans des conditions opératoires appropriées, peuvent synthétiser au niveau intracellulaire des analogues des graisses végétales assez coûteuses comme, par exemple, l'huile de palme et le beurre de cacao. Ceci constitue le cadre général du présent travail, au cours duquel

une souche de Yarrowia lipolytica est utilisée, pour la synthèse de lipides microbiens. Il est à noter que peu de souches de cette espèce sont considérées comme oléagineuses. Par contre, l'espèce Yarrowia lipolytica (appelée aussi Candida, Saccharamycopsis et Endomycopsis lipolytica) est souvent considérée comme productrice potentielle, comme Aspergillus niger, d'acide citrique.

L'objectif global de ce travail est d'étudier, à partir des données cinétiques et biochimiques, le comportement bio-physiologique de la souche oléagineuse Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1, sur différents sources carbonées utilisées. Celles de nature lipidique sont la stéarine (dérivé industriel de graisse animale composé d'acides gras libres saturés) et l'huile de colza oléique, hydrolysée chimiquement (composée d'acides gras libres insaturés). Celles de nature osidique sont le glucose et le glycérol industriel, le principal sous-produit du procédé de formation des carburants de type ester.

Ainsi, l'orientation de ce travail est double :

- d'abord, identifier les potentialités biochimiques de la souche sur les substrats carbonés utilisés, qu'il s'agisse de l'accumulation des lipides intracellulaires ou de la production d'acides organiques (majoritairement du citrate).

- ensuite, à partir des résultats obtenus, utiliser les substrats carbonés disponibles de façon à orienter le métabolisme microbien vers la synthèse d'une graisse cellulaire dont la composition se rapprocherait de celle du beurre de cacao.

Après une présentation de l'état des connaissances acquises dans le cadre de cette étude et des matériels et méthodes utilisés, ce manuscrit décrit, dans un première temps, les potentialités métaboliques de la souche sur la stéarine. Dans un deuxième temps, l'accumulation des graisses cellulaires à partir de mélanges de stéarine et d'huile de colza oléique hydrolysée est étudiée et quantifiée. L'objectif de l'utilisation de ces mélanges est d'abord d'étudier la réponse biochimique de la souche sur ces graisses et ensuite d'orienter le métabolisme cellulaire vers la synthèse d'une graisse intracellulaire dont la composition ressemble au beurre de cacao. La partie suivante concerne l'étude du comportement physiologique de la souche utilisant des sources carbonées osidiques (glucose et/ou glycérol technique). Dans un quatrième temps, des mélanges contenant de la stéarine et des oses sont utilisés dans le but de déterminer les conditions expérimentales favorisant l'orientation du métabolisme cellulaire vers l'obtention de profils lipidiques intracellulaires caractéristiques, ressemblant au beurre de cacao. Enfin, une première approche de modélisation du comportement cinétique de la souche sur deux substrats industriels (stéarine en mélange avec l'huile de colza oléique hydrolysée et glycérol technique) est présentée.

Chapitre 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES MICROORGANISMES OLEAGINEUX

I.1. Généralités

Certains microorganismes dans la nature ont la capacité d'accumuler des quantités importantes en graisses intracellulaires, quand ils sont cultivés en milieux contenant comme source carbonée des oses, des lipides, des alcanes etc. Ces microorganismes, appelés oléagineux, en allant de la classe la plus simple (bactéries) à la classe la plus complexe (champignons), présentent un intérêt économique et technologique accru (Davies et Holdsworth, 1992). Bien que les lipides microbiens (huiles d'organismes unicellulaires - H.O.U.) ne puissent pas concurrencer la matière grasse conventionelle (huiles végétales et graisses animales), puisque le coût d'un procédé fermentaire est, en général, plus élevé, la potentialité des microorganismes oléagineux de pousser sur des substrats peu coûteux et de produire des lipides riches en acides gras polyinsaturés ou bien des succédanés des lipides peu répandus dans la nature (p. e. beurre de cacao, huile de baleine etc) rend leur étude très attractive (Ratledge, 1987; 1994).

Arbitrairement, on considère qu'un microorganisme est oléagineux s'il peut accumuler des quantités en lipides cellulaires, supérieures à 20% par rapport à sa matière sèche (Ratledge et Boulton, 1985; Ratledge, 1993; 1994). Ces microorganismes sont en général autotrophes (algues photosynthétiques, cyanobactéries) ou hétérotrophes (bactéries, levures, champignons).

Pour donner un ordre de grandeur, il existe plus de 590 espèces de levures répertoriées et seulement 25 d'entre elles sont connues pour accumuler plus de 20% de lipides. Il en est de même pour les champignons qui comprennent plus de 60000 espèces et dont seulement 50 à 60 accumulent 25% de lipides par rapport à leur matière sèche (Davies et Holdsworth, 1992; Ratledge, 1994).

Les microorganismes oléagineux ont été utilisés afin d'étudier les aspects les plus complexes de la biochimie des lipides (Ratledge, 1987). En fait, avec une vitesse de croissance élevée et une panoplie enzymatique très intéressante, les microorganismes réalisent de nombreuses biotransformations (dégradation des sucres, des alcools, des lipides, des hydrocarbures...) et constituent des modèles excellents pour ce type d'étude (Ratledge, 1987).

De surcroît, les microorganismes oléagineux peuvent être utilisés dans la production de lipides pour une consommation potentielle par l'homme ou par les animaux. Cette idée, loin d'être nouvelle (les premiers travaux ont été effectués en Allemagne dans les années 1914-18 par Lindner - Ratledge 1994), est devenue une

réalité, concernant la production dans une grande échelle (réacteurs de 250 m^3) des graisses peu habituelles en raison de leur coût de production élevé, comme les lipides dont le taux d'acide γ-linolénique est important, ou les succédanés de beurre de cacao.

I.2. Les bactéries oléagineuses

Peu de bactéries sont considerées comme oléagineuses et présentent, en général, un intérêt d'utilisation limité. Des bactéries du genre Nocardia sp., Rhodococcus sp. et Mycobacterium sp. peuvent contenir des pourcentages élevés en triglycérides intracellulaires (supérieurs de 50% en masse). Un inconvénient rendant presque impossible l'utilisation alimentaire de ces microorganismes, est qu'il n'existe pas de solvant sélectif pour l'extraction de ces lipides cellulaires. Ceci a comme résultat une co-extraction des substances qui existent sur les membranes bacteriennes et qui présentent de proprietés allérgeniques et antinutritionelles (Ratledge et Boulton, 1985).

Un exemple d'utilisation des bactéries en tant que microorganismes oléagineux, est la bactérie Arthrobacter AK 19 (Wayman et al., 1984 d'après Ratledge et Boulton, 1985). Ce microorganisme contient aux alentours de 80% (en masse) de lipides par rapport à sa matière sèche. Ces lipides sont majoritairement composés des triglycérides. Le seul inconvénient concernant l'utilisation de ce microorganisme en tant que source potentielle de lipides, est sa faible vitesse spécifique de croissance (Ratledge et Boulton, 1985; Ratledge, 1994). Les caractéristiques d'accumulation lipidique chez cette souche, sont données ci-dessous (Tableau I. 1).

Tableau I. 1
Accumulation lipidique chez la bactérie Artrobacter AK 19
(Wayman et al., 1984 d'après Ratledge et Boulton, 1985).

	Durée de la culture (jours)		
	3	8	13
Lipides (% matière sèche)	16.0	39.5	78.3
	Composition des triglycérides (% w/w)		
C16:0	36	24	30
C16:1	12	13	14
C18:0	8	5	6
C18:1	24	35	30

De surcroît, quelques bactéries marines sont connues pour être sources d'acides gras polyinsaturés (A.G.P.I.) comme l'acide eicosapentaénoïque (A.E.P). Il s'agit des bactéries appartenant aux genres Alteromonas sp., Shewanella sp., Flexibacter sp. et Vibrio sp. (Ringo et al., 1992; Ratledge, 1994). Ces microorganismes, cultivés en réacteurs conventionnels, peuvent contenir 10-15% (en masse) des lipides par rapport à leur matière sèche dont 40% d'A.E.P.

Récemment, des souches appartenant aux genres Rhodococcus sp. et Nocardia spp., capables de synthétiser en même temps des triglycérides et des polyhydroxy-alkanoates quand elles sont cultivées sur diverses sources carbonées, ont été isolées et étudiées (Alvarez et al., 1996; 1997). La composition lipidique de différentes souches se trouve dans le Tableau I. 2.

Tableau I. 2
Accumulation de triglycérides et de polyhydroxy-alkanoates chez différentes espèces de Rhodococcus et Nocardia cultivées sur diverses sources carbonées (d'après Alvarez et al., 1997).

Souches et source carbonée	PHA (%w/w)	TG (%w/w)	TG (% w/w)						
			C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1
Rhodococcus ruber									
Glucose	21	19	3	35	14	-	8	5	35
Hexadecane	-	26	12	66	12	-	-	-	-
Valerate	85	12	3	25	6.4	24	20	-	14
Rhodococcus opacus									
Glucose	1	48	2	26	9	8	18	7	33
Hexadecane	tr	43	8	49	41	-	-	-	-
Valerate	1	43	1	6	4	19	29	2	2
Noccardia corallina									
Glucose	3	10	9	34	tr	-	-	15	42
Hexadecane	-	13	13	46	41	-	-	-	-
Valerate	30	24	3	18	5	20	23	-	23

Plusieurs bactéries peuvent accumuler le polymère poly-β-hydroxybutyrate (PHB) comme réserve de stockage. Bien que le PHB ne soit pas une molécule qui contienne des acides gras, il est, néanmoins, classé comme lipide en raison de sa solubilité dans le chloroforme ou autres solvants organiques. Le microorganisme Alcaligenes eutrophus accumule ce biopolymère avec des pourcentages élevés (70-80%

en masse, King, 1982). Cette molécule, présentant un intérêt accru en tant que matériel d'emballage, est d'ores et déjà commercialisé sous le nom "Biopol" (I.C.I.) (Ratledge, 1994).

Une autre catégorie de lipides cellulaires rencontrés chez les bactéries, sont les cérides ($CH_3(CH_2)_xC(=O)\ OCH_2(CH_2)_yCH_3$) avec x et y égal à 14 ou 16 (Ratledge et Boulton, 1985). Des bactéries du genre Acinetobacter sp. peuvent accumuler des quantités importantes de ces produits. Elles peuvent également procéder à des désaturations au niveau des chaînes aliphatiques, conduisant ainsi la synthèse de cérides d'intérêt pharmaceutique. La souche Acinetobacter HO1 N, très étudiée en raison de sa capacité à accumuler des cérides en poussant sur des hydrocarbures (p. e. hexadecane), accumule des quantités de cérides supérieures de 15% (en masse) de sa matière sèche (Finnerty, 1984; Ratledge, 1994).

I.3. Les algues oléagineuses

Plusieurs micro-algues sont considerées comme des microorganismes oléagineux. Botryococcus braunii est une espèce très connue qui arrive à accumuler des quantités importantes de lipides. De pourcentages proches de 85% (en masse) en lipides cellulaires par rapport à la matière sèche ont été rapportés (Brown et al., 1969).

La matière grasse intracellulaire de cette algue est majoritairement l'hydrocarbure botryococcène (Figure I. 1), dont l'hydro-cracking aboutit à 67% de gasoline, 15% d'essence pour l'aviation, 15% de carburant de type ester et 3% d'huile résiduelle (Ratledge et Boulton, 1985).



Figure I. 1
Structure de la botryococcène, composant majoritaire de la matière grasse intracellulaire de Botryococcus braunii (d'après Ratledge, 1994).

Des algues avec des graisses cellulaires plus conventionelless (majoritairement des triglycérides) appartiennent à l'espèce Dunaliella salina (pourcentages en lipides de 47% en masse), aux genres Chlorella sp. (C. pyrenoidosa et C. vulgaris, pourcentages en lipides près de 40% en masse) et à l'espèce Spirulina platensis (environ 20% en masse de lipides). Le dernier cas, malgré le faible pourcentage en lipides, reste très intéressant de par le pourcentage élevé en acide γ-linolénique dans ses réserves

lipidiques. Des études ont été effectuées chez d'autres algues, également, afin de trouver des espèces pouvant synthétiser des A.G.P.I.. Il s'agit de l'algue rouge Porphyridium cruentum (dont les lipides cellulaires contiennent environ 60% en masse d'acide arachidonique) ou l'espèce Chlorella minutissima (dont les lipides contiennent 50% en masse d'acide eicosapentaénoïque). Malheureusement, ces algues n'accumulent que 5-8% de lipides w/w.

La composition en acides gras, des lipides cellulaires des algues les plus intéressantes est présentée ci-dessous (Tableau I. 3).

Tableau I. 3
Composition (% en masse) des lipides cellulaires de quelques algues oléagineuses (d'après Ratledge et Boulton, 1985).

Espèce	C16:0	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3 (α)	C18:3 (γ)
Spirulina platensis	43	3	6	22	-	18
Chlorella pyrenoidasa	21-34	2-8	0.5-3	20-30	8-26	-
Chlorella vulgaris	26	8	2	34	20	-
Dunaliella salina	23	45	3	-	-	-

Pour conclure, notons que l'intérêt des algues en tant que microorganismes oléagineux est limité, en raison du coût élevé de la culture dans des réacteurs stériles à luminosité contrôlée. De plus, le problème le plus épineux d'une éventuelle exploitation commerciale de ses lipides, est que les souches qui accumulent beacoup de lipides cellulaires contiennent peu d'A.G.P.I. et vice versa (Ratledge, 1994).

I.4. Les levures oléagineuses - l'espèce Yarrowia lipolytica

I.4.1. Eléments de classification des levures oléagineuses

La plupart des études biochimiques et physiologiques concernant le processus d'accumulation lipidique chez les microorganismes, ont été effectuées sur des levures qui sont considerées comme les microorganismes oléagineux les plus conventionels.

Le contenu des lipides totaux chez la majorité des levures est, en général, inférieure à 10% (w/w) (Rattray et al., 1975). Une classification à propos du contenu lipidique des levures a été proposée telle que :

i) levures à un taux lipidique faible (inférieure de 5%)

ii) levures à un taux lipidique moyen (pourcentage de 5-20% w/w)

iii) levures oléagineuses (pourcentage supérieure de 20%) (Rattray et al., 1975).

Cependant, ce taux lipidique est fortement dépendant des conditions de culture (p. e. utilisation du rapport molaire initial C/N). Aussi, une telle classification semble être erronée (Ratledge, 1994). De plus, beaucoup de levures présentent des lipides cellulaires proches du seuil de 20% (w/w) en matière sèche. Afin de s'affranchir de ce problème, Ratledge (1994), a proposé que les microorganismes soient considerés comme oléagineux seulement quand ils disposent de l'enzyme ATP-citrate lyase (l'enzyme clef de la biosynthèse *de novo* des lipides chez les microorganismes oléagineux).

I.4.2. Les lipides des levures oléagineuses

Les graisses accumulées des levures oléagineuses sont constituées, en général, des triglycérides (plus de 80% en masse de la matière grasse totale), composés d'acides gras C16 et C18 (Ratledge, 1994). L'acide palmitique (C16:0) est trouvé habituellement avec des pourcentages de 15-30% (en masse) des lipides totaux. L'acide palmitoléique (C16:1) est, en général, un constituant mineur (inférieur à 5%) et seulement dans quelques cas dépasse 10% (en masse) des lipides totaux (p. e. Hansenula saturnus et Hanseniospora sp., Ratledge, 1994). L'acide stéarique (C18:0) est, également, un constituant mineur (généralement moins de 10% des lipides totaux), ce qui est le facteur limitant la synthèse d'une graisse microbienne ayant une composition voisine de celle du beurre de cacao (Ratledge, 1987; 1993). Plusieurs stratégies ont été développées afin d'augmenter le pourcentage de cet acide gras (voir aussi "Les Huiles d'Organismes Unicellulaires H.O.U."). L'oléate (C18:1) constitue l'acide majoritaire avec des pourcentages parfois supérieures à 70% des lipides totaux alors que l'acide linoléique (C18:2) vient en deuxième position chez les levures oléagineuses (pourcentages jusqu'à 30% en masse) (Ratledge, 1993; 1994). Des acides gras aux chaînes aliphatiques moyennes (C12:0 - laurique et C14:0 - myristique), sont très peu rencontrés. De même, à part l'exemple de la levure Dipodascopsis uninucleata (Botha et al., 1992 d'après Ratledge, 1994), les levures oléagineuses n'accumulent pas d'A.G.P.I. (acide γ-linolénique, arachidonique, etc), qui sont surtout synthétisés par les champignons supérieurs. Les caractéristiques de quelques souches oléagineuses s'affichent ci-dessous (Tableau I. 4).

Tableau I. 4
Contenu lipidique et profil des lipides cellulaires chez quelques levures oléagineuses (d'après Ratledge, 1994).

Espèce	Lipides (% w/w)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
Candida curvata D	58	32	-	15	44	8
Candida curvata C	51	31	-	12	51	6
Cruptococcus albidus	65	12	1	8	73	12
Hansenula saturnus	28	16	16	-	45	16
Lipomyces starkeyi	63	34	6	5	51	3
Rhodotorula glutinis	72	37	1	3	47	8
Rhodotorula graminis	36	30	2	12	36	15
Trichosporon pullulans	65	15	-	2	57	24
Candida 107	42	44	5	8	31	9
Yarrowia lipolytica	36	11	6	1	28	51

Finalement, il apparaît que les levures oléagineuses sont intéressantes en tant qu'outils de compréhension de la biochimie des lipides. Par ailleurs, la possibilité d'utiliser ces levures en vue d'une alimentation animale ou humaine, ainsi que pour la production des succédanés de graisses coûteuses, semble attractive.

I.4.3. L'espèce Yarrowia lipolytica - Caractéristiques générales

La levure ascomycétale Yarrowia lipolytica (connue aussi comme Candida - Saccharomycopsis - Endomycopsis lipolytica) est une espèce dimorphique non-conventionnelle qui présente un intérêt accru tant pour la recherche fondamentale que pour ses applications biotechnologiques (Barth et Gaillardin, 1997). En ce qui concerne la production des H.O.U. à partir de cette espèce, peu de ses souches sont considerées comme oléagineuses, en raison de l' absence de l'enzyme ATP-citrate lyase (Ratledge, 1994). Cependant, les potantialités au moins pour quelques souches de Yarrowia

lipolytica d'accumuler des graisses à partir des milieux lipidiques est incontestable (Glatz et al., 1984; Montet et al., 1985; Aggelis et al., 1997).

A part le rôle de Y. lipolytica comme microorganisme oléagineux, de cellules de cette espèce ont été utilisées lors de plusieurs bioconversions comme la biosynthèse des composants aromatiques (γ-décalactone), l'excrétion de lipases et d'estérases et la production d'acides organiques (majoritairement de l'acide citrique) (Barth et Gaillardin, 1997).

L'utilisation des cellules de Y. lipolytica pour la production de γ-décalactone à partir de l'alkyl-rinoléate (une dérivée de l'huile de castor) est déjà brevetée et constitue un sujet de développement industriel (Barth et Gaillardin, 1997). La biotransformation de l'acide ricinoléique en γ-decalactone correspond à une β-oxydation, au niveau des péroxysomes (Pagot et Belin, 1996; Pagot et al., 1997). Cette oxydation est catalysée par une acyl-CoA synthetase II catabolique.

La biosynthèse *de novo* des lipides chez Y. lipolytica s'effectue par l'intermédiaire de l'acyl-CoA synthétase I anabolique, située au niveau des péroxysomes, des mitochondries et du cytosol. Chez une souche de Y. lipolytica, il a été montré qu'une présence d'acides gras exogènes à longue chaîne, même en faible concentration (p. e. 0,3% w/v), réprime complètement l'activité de ce système de biosynthèse (Meyer et Schweizer, 1976).

Y. lipolytica possède un système lipasique très actif, qui agit de façon préferentielle sur les positions sn1 et sn3 de la molécule du triglycéride (Barth et Gaillardin, 1997). L'activité lipasique ainsi que la purification des lipases est un sujet qui présente un intérêt scientifique et économique important. Des études relativement anciennes (Peters et Nelson, 1948 d'après Barth et Gaillardin, 1997) ont montré une seule activité lipasique, sujette à une répression catabolique par la présence du glucose dans le milieu de culture. D'autres études ont montré qu'il existe au moins une activité lipasique extracellulaire, en présence d'acide oléique jouant le rôle d'activateur-stabilisateur, et une activité lipasique intracellulaire, qui présentent des différences biochimiques, comme la masse moléculaire, le pH optimum etc (Barth et Gaillardin, 1997).

I.4.4. L'espèce Yarrowia lipolytica en tant que producteur d'acide citrique

Y. lipolytica est un producteur potentiel d'acide citrique. Avec une production de 400000 tn/an, cet acide est largement utilisé dans les industries pharmaceutiques, chimiques et alimentaires (Rane et Sims, 1993). Ce produit est synthétisé par une fermentation oxydative de surface ou submergée du champignon Aspergillus niger

(Milsom, 1987; Saha et Takahashi, 1996; Roukas et Kotzekidou, 1987; 1997) ou par une fermentation levurienne (surtout par Y. lipolytica) (Aiba et Matsuoka, 1979; Rane et Sims, 1993; 1994; 1995). Les levures présentent plusieurs avantages comparées à Aspergillus niger :

i) Y. lipolytica peut utiliser une grande varieté de substrats, qui peuvent être de nature osidique (glucose, mélasses), lipidique ou bien des n-parrafines (Briffaud et Engasser, 1979a; b; Glatz et al., 1984; Wojtacowicz et al., 1991)

ii) tolérance plus élevée vis-à-vis de fortes concentrations en substrat

iii) productivité plus élevée

iv) insensibilité vis-à-vis des ions métalliques, permettant l'utilisation des mélasses relativement peu purifiées

v) meilleur contrôle du procédé, dû à la nature unicellulaire de la levure.

Le seul inconvénient de l'utilisation de levures en tant que producteurs potentiels d'acide citrique, est la production simultanée d'acide iso-citrique (Rane et Sims, 1993).

La production de citrate à partir des milieux osidiques a lieu seulement quand le milieu de culture est limité en azote; ainsi l'utilisation de rapports molaires initiaux C/N élevés est obligatoire (Briffaud et Engasser, 1979a; Wojtacowicz et al., 1991; Rane et Sims, 1993). Dans une telle fermentation en mode discontinu, la production de citrate s'effectue lors de la phase stationnaire de croissance pendant la limitation en azote (appelée idiophase), alors que lors de la première phase de la croissance (appelée trophophase) la source carbonée est majoritairement utilisée pour la formation de biomasse (Moresi, 1994; Rane et Sims, 1993).

I.5. Les champignons oléagineux

Beaucoup d'études concernant l'accumulation lipidique ont été effectuées chez les champignons. Ratledge (1994) identifia 64 espèces de champignons capables d'accumuler des graisses intracellulaires avec un pourcentage supérieur à 25% (en masse), mais il existe, également, beaucoup d'espèces accumulant des lipides avec un pourcentage compris entre 20 et 25%, ce qui leur confère un caractère partiellement oléagineux. Les champignons accumulent, en général, des acides gras plus insaturés par rapport aux levures, c'est pourquoi les études sur l'accumulation lipidique chez ces microorganismes sont focalisées surtout sur la production des A.G.P.I..

L'étude des lipides cellulaires chez ces champignons montre une prédominance des acides gras de type C16 et C18. Seuls des champignons du genre Entomopthora sp.

biosynthétisent des quantités élevés en acides aux chaînes aliphatiques moyennes (C12:0 et C14:0). Plusieurs espèces des phycomycètes (appelés également champignons inférieurs, composés de deux sous-divisions, les Mastigomycotina et les Zygomycotina) biosynthétisent les A.G.P.I. de la série ω-6 (acide γ-linolénique-A.G.L. (18:3) et acide arachidonique-A.AR. (20:4), alors que les champignons supérieurs (ascomycètes et basidiomycètes) synthétisent les A.G.P.I. de la série ω-3 (acide α-linolénique) (Sajbidor et al., 1988; Aggelis et al., 1991; Ratledge, 1994). Les caractéristiques de quelques champignons oléagineux sont présentées ci-après (Tableau I. 5).

Tableau I. 5
Contenu lipidique et profil des lipides cellulaires chez quelques champignons oléagineux (d'après Ratledge, 1994).

Espèce	Lipides (%w/w)	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Autres
Entomopthorales								
Entomopthora coronata	43	31	9	2	14	2	1[a]	12:0 (40)
Entomopthora obscura	34	8	37	7	4	-	-	12:0 (40)
Mucorales								
Absidia corymbifera	27	1	24	7	46	8	10[a]	
Cunninghamella japonica	60	-	16	14	48	14	8[a]	
Ascomycetes								
Aspergillus terreus	57	2	23	-	14	40	21[b]	
Pellicularia practicola	39	-	8	2	11	72	2[b]	9

a. acide γ-linolénique
b. acide α-linolénique

Le processus biochimique de la formation des A.G.P.I. chez les champignons, se trouve résumé dans la Figure I. 2.

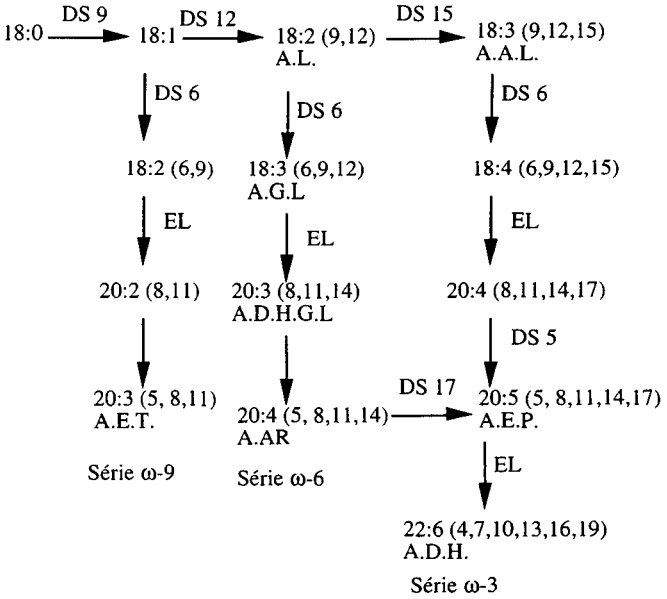


Figure I. 2
Voie biosynthétique des acides gras polyinsaturés chez les champignons.
DS-Désaturase (DS-17 trouvée seulement chez les champignons), EL-Elongase, A.L.-Acide linoléique, A.A.L.-Acide alpha-linolénique, A.G.L.-Acide gamma-linolénique, A.D.H.G.L.-Acide di-hommo-gamma-linolénique, A.AR.-Acide Arachidinique, A.E.T.-Acide Eicosatriénoique, A.E.P.-Acide Eicosapentaénoïque , A.D.H.-Acide Docosahexaénoïque (d'après Ratledge, 1994).

Les champignons oléagineux, ainsi, en tant que sources potentielles de lipides polyinsaturés, présentent un intérêt économique important, ce qui rend leur étude très attractive et intéressante.

II. SUBSTRATS MICROBIENS POUR L'ACCUMULATION LIPIDIQUE

II.1. Généralités

A l'exception du méthanol et de la cellulose, de nombreux substrats ont été utilisés par les microorganismes oléagineux, qu'il s'agisse des sucres, des graisses, des hydrocarbures etc (Ratledge et Boulton, 1985).

Les substrats osidiques ont été largement utilisés : il s'agit de sucres simples (comme le glucose), de lactose, de lactosérum, des mélasses, des jus de fruits etc (Gill et al., 1977; Ykema et al., 1989; 1990; Davies et al., 1990; Hamid et al., 1995; Aggelis et al., 1996). Le rendement en lipides cellulaires à partir des oses est aux alentours de 20-22% (en masse). L'utilisation de milieux osidiques plus complexes, tel que l'amidon, a été étudiée (Sajbidor et al., 1988; Davies et Holdsworth, 1992; Chen et Chang, 1996), en montrant de résultats légèrement différents (au niveau quantité et composition des lipides cellulaires) par rapport à l'utilisation des oses simples.

L'éthanol a été consideré comme source potentielle de production de lipides microbiens par un certain nombre d'auteurs (Yamauchi et al., 1983; Emelyanova, 1997). Il présente l'avantage d'être un substrat très propre. Un rendement théorique de 54% (en masse) semble très élevé, puisque les travaux effectués montrent des valeurs inférieures (21% avec Lipomyces starkeyi et 31% avec Cryptococcus albidus - Davies et Holdswoth, 1992).

Le glycérol, produit qui apparaît en quantités de plus en plus importantes dans le marché mondial, a été utilisé pour la production des H.O.U. (Sajbidor et al., 1988; Chen et Chang, 1996; Meesters et al., 1996a; b). En général, l'utilisation microbienne du glycérol a trait à la production du 1-3 propanediol sous anaérobiose (Homann et al., 1990; Biebl et al., 1992; Menzel et al., 1997). Dans quasiment tous les types de bioconversion à partir de ce substrat, le glycérol pur a été utilisé, car les sels et le méthanol existant dans le glycérol dit technique, issu des industries qui procèdent à la transestérification des huiles (formation des carburants de type ester) limitent la croissance cellulaire; seulement quelques souches de Clostridium butyricum ont été rapportées de pouvoir pousser sur le glycérol impur (Petitdemange et al., 1995).

Les acides organiques constituent des substrats potentiels pour la production des lipides microbiens, qu'il s'agisse de l'acide citrique (Aggelis, 1995) ou, surtout, de l'acide acétique (Hamid et al., 1995; Roux et al., 1995; Botha et al., 1997; Immelmann

et al., 1997). Ce dernier, étant consideré comme un polluant, les travaux portant sur son utilisation sont très intéressants (du Preez et al., 1997).

Des hydrocarbures ont été, également, utilisés comme substrats des microorganismes oléagineux. Le principal avantage d'utilisation de ces substrats est que la matière grasse intracellulaire peut avoir une composition "prédéterminée", en fonction des chaînes aliphatiques du substrat (Ratledge et Boulton, 1985; Davies et Holdsworth, 1992).

Des graisses (huiles d'origine végétale, acides gras libres, savons, esters méthyliques etc) ont été utilisées par des microorganismes oléagineux, qui accumulent et en même temps modifient le substrat carboné disponible (Matsuo et al., 1981; Radwan et Soliman, 1988; Samelis et al., 1993; Aggelis et al., 1995b; 1997), en permettant l'obtention de profils lipidiques intéressants (p. e. production des succédanés de beurre de cacao, synthèse des lipides avec un taux élevé en A.G.P.I.).

II.2. Substrats de type osidique

II.2.1. Biosynthèse des acides gras cellulaires

Biosynthèse *de novo* des lipides est une voie métabolique où par une série des réactions (inversion de la β-oxydation) l'acétyl-coenzyme A donnera naissance aux acides gras cellulaires. Ces acides seront estérifiés par le glycérol intracellulaire, afin de synthétiser les lipides structuraux (phospolipides, glycolipides, etc) et les triglycérides de réserve. Tous les microorganismes dans la nature procèdent à cette synthèse biochimique mais ce sont seulement les microorganismes oléagineux qui arrivent à accumuler des quantités significatives de lipides (supérieures à 20% en masse). Dans une première série d'investigations - comparaison de la synthèse chez les microorganismes oléagineux et non oléagineux - il a été démontré que les premiers ne possèdent pas un système hyperactif de synthèse des acides gras, mais ils sont capables de produire en quantité importante l'acétyl-coenzyme A, qui constitue l'unité de base pour la biosynthèse des lipides (Ratledge, 1987; 1994). Aussi, l'étude de l'accumulation lipidique va-t-elle être divisée en deux parties : le métabolisme cellulaire intermédiaire conduisant à la production de l'acétyl-coenzyme A et la biosynthèse des acides gras et des triglycérides.

II.2.2. Métabolisme cellulaire intermédiaire

La glycolyse ainsi que de la voie des pentose-phosphates conduisent à la production de l'acide pyruvique dans le cytoplasme, qui, ensuite, traverse la membrane

mitochondriale afin d'entrer dans la mitochondrie. L'action de la pyruvate-déshydrogénase, une enzyme qui n'est pas détectée dans le cytoplasme, catalyse la formation de l'acétyl-coenzyme A qui, soit, entre dans le cycle des acides tricarboxyliques (Krebs), soit, est transporté de nouveau dans le cytoplasme, pour entamer la biosynthèse des acides gras (Davies et Holdsworth, 1992). Toutefois, la membrane mitochondriale, n'est pas perméable à l'acétyl-coenzyme A. Le transfert de cet intermédiaire s'effectue sous forme d'acétyl-carnitine, catalysé par l'enzyme carnitine-acétyl-transferase (Ratledge, 1987; 1994). Or, le rôle primaire de cette enzyme est exactement l'inverse. En effet, ce rôle est le transport de l'acétyl-COSCoA, issu de la β-oxydation des acides gras, pour qu'il soit catabolisé par la suite à l'intérieur de la mitochondrie. De quantités minimes de l'acétyl-carnitine peuvent suivre le parcours inverse (c'est à dire le passage de la mitochondrie au cytoplasme), ceci étant le cas de l'amorce de la biosynthèse *de novo* de acides gras chez les microorganismes non-oléagineux (Davies et Holdsworth, 1992).

La "clef" de l'accumulation lipidique chez les microorganismes oléagineux, repose sur le changement de concentrations intracellulaires de plusieurs métabolites (Davies et Holdsworth, 1992), effectué après la limitation en azote du milieu de culture (Gill et al., 1977; Boulton et Ratledge, 1980; 1981). Cette limitation conduira à une diminution rapide de la concentration de l'AMP intracellulaire, suite de l'action de l'AMP désaminase, qui convertira l'AMP en IMP et ions NH_4^+ (source azotée supplémentaire pour le microorganisme) (Evans et Ratledge, 1985). La diminution excessive de la concentration intracellulaire de l'AMP, conduit à une perte significative de l'activité de l'enzyme $NADH^+$-isocitrate déshydrogénase (la deuxième enzyme du cycle de Krebs, sensée convertir l'acide iso-citrique en acide α-cétoglutarique), étant donné que l'AMP est son activateur allostérique (Ratledge, 1987; 1994). Le résultat de ce processus, est l'augmentation de la concentration intra-mitochondriale en acide iso-citrique, qui sera en équilibre avec l'acide citrique par le biais de l'acotinase (Davies et Holdsworth, 1992). Quand la concentration de l'acide citrique dépasse une certaine valeur critique, le citrate sort dans le cytoplasme en échange avec le malate (Evans et al., 1983). Ensuite, l'acide citrique est clivé par l'ATP-citrate lyase, enzyme-clef qui montre le caractère oléagineux des microorganismes, en acétyl-coenzyme A et oxaloacétate (Botham et Ratledge, 1979; Boulton et Ratledge, 1981).

Schématiquement, le métabolisme intermédiaire chez les microorganismes oléagineux se trouve Figure II. 1.

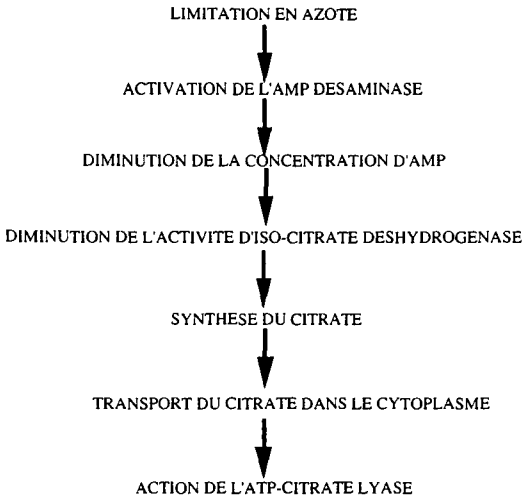
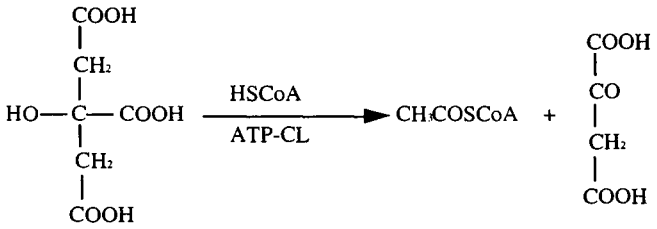


Figure II. 1
Etapes conduisant à la biosynthèse des lipides intracellulaires chez les microorganismes oléagineux (d'après Davies et Holdsworth, 1992).

La réaction catalysée par l'ATP-citrate lyase, se trouve ci-après (Ratledge, 1987).



Notons au passage que chez plusieurs microorganismes non-oléagineux, où l'enzyme ATP-citrate lyase n'existe pas, l'acide citrique sera accumulé au niveau du cytoplasme en provoquant une inhibition de la phospho-fructokinase, ayant comme résultat l'accumulation intracellulaire de polysaccharides basés sur le 6-phosphoglucose (cas de Aureobasidium pullulans - Evans et Ratledge, 1985; Galiotou-Panagiotou et al., 1998), ou il sera excreté dans le milieu de culture (cas de Aspergillus niger ou de Candida sp. - Milsom, 1987).

Le métabolisme du glucose et la biosynthèse des lipides chez les microorganismes oléagineux est décrit dans la Figure II. 2.

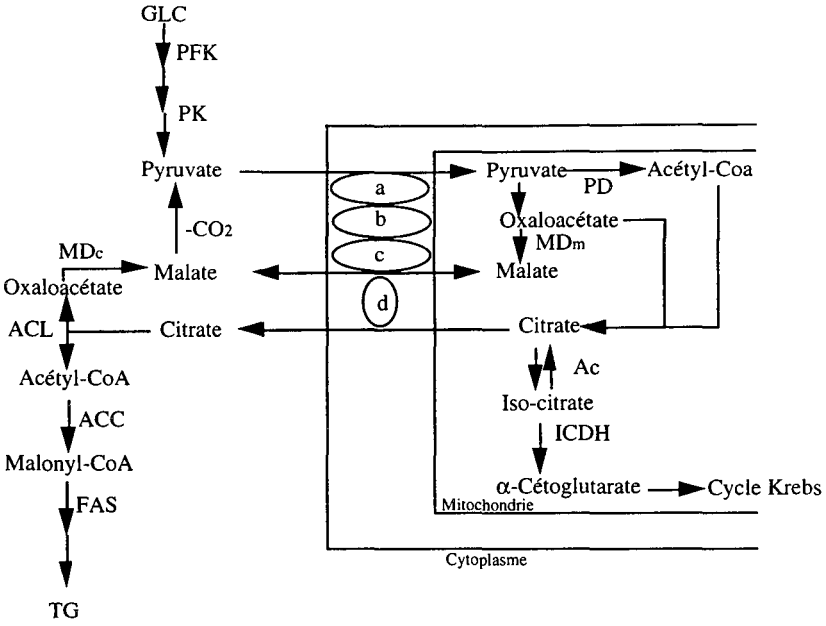
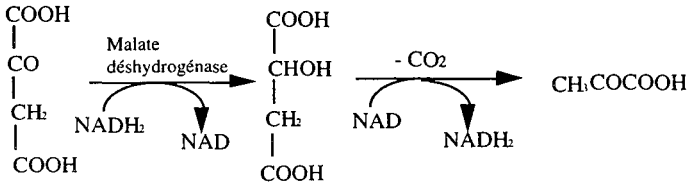


Figure II. 2

Métabolisme intermédiaire chez les microorganismes oléagineux.
a, b, c : systèmes de transport du pyruvate par le cytoplasme dans la mitochondrie et du malate inversement, d : système de transport du citrate et du malate entre la mitochondrie et le cytoplasme.
Enzymes : ACC : acétylo-CoA carboxylase, ACL : ATP-citrate lyase, FAS : Synthétase des acides gras, ICDH : iso-citrate déshydrogénase, MD_c : Malate déshydrogénase (cytoplasmique), MD_m : Malate déshydrogénase (mitochondriale), PD : pyruvate déshydrogénase, PFK : phospho-fructo-kinase, PK : pyruvate kinase
(d'après Ratledge, 1987).

Comme on le voit dans la Figure II. 2, l'acide malique sort de la mitochondrie afin que le pyruvate entre. Le malate a été formé par l'oxaloacétate, alors que sa décarboxylation forme l'acide pyruvique (Ratledge, 1987).



La production, sans obstacle, de l'acide pyruvique, assure le fonctionnement correct du schéma de la glycolyse. Les enzymes-clefs sont la phospho-fructokinase et la pyruvate kinase (Ratledge, 1987). Une partie de l'acide malique sera convertie en acide pyruvique, en formant simultanement de $NADH_2$, qui sera utilisé lors de la biosynthèse des acides gras.

II.2.3. Biosynthèse des acides gras et des triglycérides

La première réaction de la synthèse des acides gras, est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase. Il s'agit d'une enzyme qui est dépendante de la biotine. Son action peut être résumée de la façon suivante :

$$\text{Acétyl-CoA} + HCO_3 + ATP \longrightarrow \text{malonyl-CoA} + P_i$$

L'acétyl-CoA carboxylase est une enzyme cytoplasmique qui est considerée comme étant l'étape limitante de la biosynthèse des acides gras. Cette enzyme est activée par la présence de l'acide citrique chez la souche oléagineuse Candida 107, mais non chez la souche non-oléagineuse Candida utilis (Gill et al., 1977).

La suite des réactions portant sur la biosynthèse des acides gras, a lieu par l'action de la synthétase des acides gras (FAS), un complexe multi-enzymatique. Les réactions qui s'effectuent peuvent être résumées de la façon suivante (Davies et Holdsworth, 1992).

$$\text{Acétyl-CoA} + 7\ \text{malonyl-CoA} + 14\ NADH_2 \longrightarrow$$
$$\text{Palmitoyl-CoA} + 7\ CO_2 + 14\ NAD + 7\ \text{CoASH} + 6H_2O$$

Le produit final diffère par rapport à la biosynthèse chez les cellules animales, dans la mesure où, chez ces dernières, c'est l'acide gras qui est produit et non son ester-CoA. La synthétase des acides gras FAS, comme d'ailleurs l'ATP-citrate lyase, en général, est inhibée par les chaînes aliphatiques longues existant dans le milieu de culture (Meyer et Schweizer, 1976; Ratledge et Boulton, 1985).

Après la biosynthèse des esters gras, se produit une estérification avec le glycérol intracellulaire, afin que les réserves lipidiques soient stockées sous forme de triglycérides (Ratledge, 1987; Davies et Holdsworth, 1992). Ces substances sont la forme principale de stockage des molécules biochimiques chez les microorganismes oléagineux (Ratledge et Boulton, 1985). Les autres classes lipidiques (phospolipides, glycolipides etc) comprennent seulement le 10% (en masse) (ou même moins) de la matière grasse intracellulaire (Davies et Holdsworth, 1992).

La synthèse des triglycérides à partir des acides gras libres, en général, s'effectue par l'intermédiaire de la voie d'acylation de α-glycérol phosphate. La plupart des études concernant cette formation a été réalisée avec des levures non-oléagineuses. Seuls deux levures oléagineuses, Candida curvata D et Lipomyces starkeyi CBS 1809,

ont été étudiées et il a été montré l'utilisation de la voie d'acylation de α-glycérol phosphate.

La Figure II. 3 décrit la voie de la biosynthèse des triglycérides.

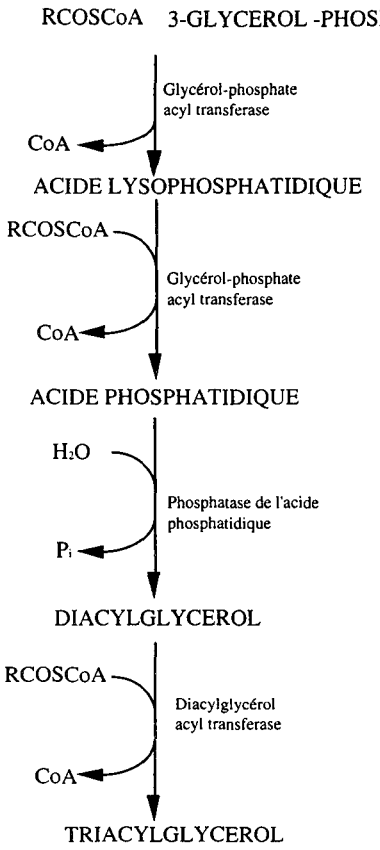


Figure II. 3

Biosynthèse des lipides via la voie de α-glycérol phosphate
(d'après Davies et Holdsworth, 1992).

II.2.4. Conclusions sur l'utilisation des substrats de type osidique

La biosynthèse des lipides à partir des milieux osidiques chez les microorganismes oléagineux s'effectue seulement en limitation d'azote. Le contenu lipidique intracellulaire est fortement dépendant du rapport molaire initial C/N du

milieu de culture utilisé. L'étape clef de l'accumulation lipidique est le clivage de l'acide citrique par l'enzyme ATP-citrate lyase.

Les étapes suivantes, c'est-à-dire l'utilisation de la synthétase des acides gras ainsi que la voie de biosynthèse des triglycérides intracellulaires (voie de α-glycérol phosphate), sont presque identiques à celles des microorganismes non-oléagineux ou les cellules animales.

II.3. Substrats de type hydrocarbures

II.3.1. Les substrats utilisés

Parmi les hydrocarbures utilisés en tant que substrats lors des bioconversions microbiennes, il est surtout fait référence aux alcanes, aux alcènes et aux hydrocarbures alicycliques, hétérocycliques et aromatiques (Finnerty, 1984; Ratledge, 1984). Les substrats de ce type, sont facilement assimilés par de nombreaux microorganismes qu'il s'agisse des bactéries (Pseudomonas sp., Acinetobacter sp.) ou des levures (Candida sp.). Par contre, les hydrocarbures gazeux ne sont pas compatibles avec le processus d'accumulation lipidique chez les microorganismes oléagineux (Finnerty, 1984). De surcroît, les dérivés des hydrocarbures gazeux (surtout le méthanol), très utilisés lors de la production de protéines d'organismes unicellulaires, n'ont pas encore trouvé une application concernant la production des huiles microbiennes. Dans le tableau suivant nous voyons la relation entre les substrats assimilés et les produits métaboliques, lors de l'oxydation microbienne des hydrocarbures (Finnerty, 1984).

Tableau II. 1
Utilisation des souches Pseudomonas sp., Acinetobacter sp. et Candida sp.. Relation entre les substrats et les produits (d'après Finnerty, 1984).

SUBSTRATS	PRODUITS
Hexane	Hexan-2-ol, hexan-2-one, acide hexanoïque
Heptane	Acide propionique, pentanoïque, heptanoïque
Octane	Acide octanoïque, 1-8 acide octanédioïque,
Décane	Acide décanoïque, 1-10 acide décanedioïque
Undécane	Acide undécanoïque
Hexadécane	Acide palmitique, mono, di et tripalmitine
Heptadécane	Acide heptadécanoïque
Octadécane	Octadecylstearate, acide stearique

II.3.2. La biochimie de la dégradation des alcanes

Le schéma métabolique de la dégradation des alcanes dans la cellule microbienne est présenté ci-après (Figure II. 4).

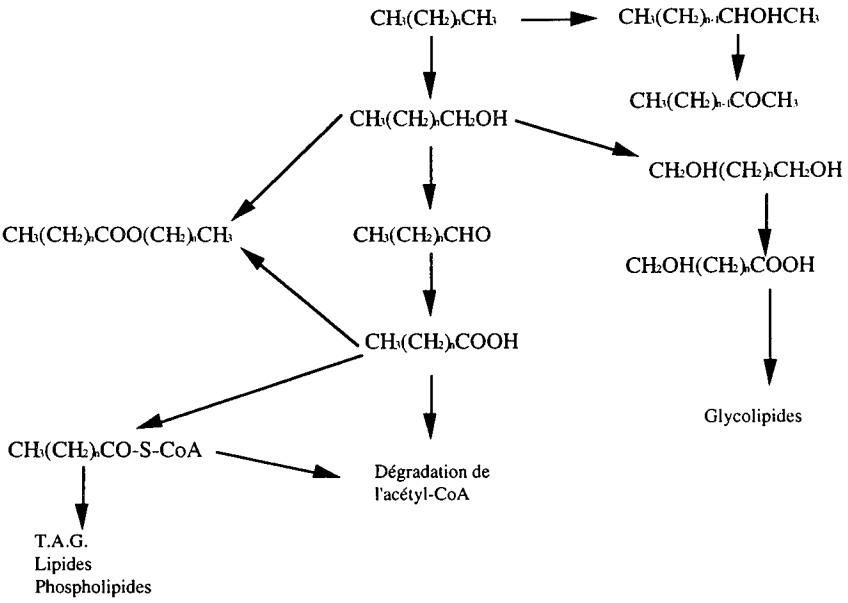


Figure II. 4
Métabolisme des alcanes et biosynthèse des lipides dans la cellule microbienne (n de 6-16) (d'après Ratledge, 1984).

En général, les hydrocarbures les plus utilisés en tant que sources carbonées pour les microorganismes, sont ceux dont le nombre des carbones est de 9 à 18. Ces molécules sont presque complètement immiscibles dans l'eau, pour faciliter le transfert de matière, la création d'une émulsion est indispensable. Les microorganismes qui poussent sur les hydrocarbures excrètent des biotensioactifs afin de favoriser la dispersion de la matière organique dans l'eau (Finnerty, 1984).

En général, la dégradation des alcanes chez les microorganismes est amorcée par une oxydation de la racine méthylénique de l'extrémité de la molécule, grâce à un système d'hydroxylases, très difficilement purifiables. L'hydroxylase des alcanes est couplée avec un système de transfert d'électrons (il s'agit du cytochrome P-450 ou du NADH-cytochrome P-450, Ratledge, 1984). Chez les bactéries Pseudomonas sp. le

système équivalent de transport d'électrons est une ferroprotéine appelée "rubrédoxine" (Ratledge, 1984). L'ensemble des réactions, catalysé par le système du cytochrome P-450 (Ratledge, 1984) est montré Figure II. 5.

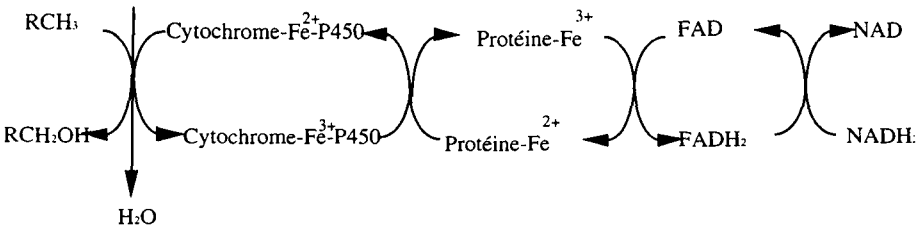


Figure II. 5
Fonctionnement du système d'oxydase du cytochrome P-450 (d'après Ratledge, 1984).

Le produit d'oxydation terminale des alcanes, un alcool gras, sera, ensuite, oxydé en acide gras. L'acide gras activé contient le même nombre de carbones, comparé à l'alcane initial. Ensuite, l'acide gras est soit dégradé par le biais de la β-oxydation soit estérifié par le glycérol (formation des mono-, di- et triglycérides) ou autre polyalcool (formation des cérides) afin d'être stocké en tant que réserve énergétique.

En général la croissance cellulaire sur les hydrocarbures conduit à des pourcentages en lipides et à des productivités plus élevées, par rapport à la croissance sur les milieux osidiques (Thorpe et Ratledge, 1972; Ratledge et Boulton, 1985). De plus, l'avantage de l'utilisation des alcanes en tant que substrats pour les microorganismes oléagineux est que la composition des lipides cellulaires produits peut être "prédéterminée". L'inconvénient majeur de l'utilisation des hydrocarbures comme substrats, est que les huiles produites présentent des odeurs désagréables, difficiles à éliminer (Ratledge et Boulton, 1985).

II.3.3. Conclusions sur l'utilisation des substrats de type hydrocarbures

L'utilisation des hydrocarbures présente un intérêt technologique et économique certain, surtout parce qu'elle nous permet de valoriser des substrats difficilement utilisables. En utilisant les souches adéquates par rapport à ces substrats, il est possible de synthétiser des produits à haute valeur ajoutée (utilisation dans l'industrie alimentaire, chimie fine etc). Il est à noter, également, l'importance écologique de toutes ces applications, étant donné que les hydrocarbures liquides constituent un des

plus grands dangers de l'environnement puisque ils sont utilisés énormement comme sources énergetiques.

II.4. Substrats de type lipidique

II.4.1. La biochimie de l'accumulation lipidique à partir des graisses

Plusieurs microorganismes oléagineux peuvent se développer sur des substrats constitués de matière grasse uniquement (des huiles, des graisses, des acides gras libres, des savons, des esters méthyliques etc, Matsuo et al., 1981, Montet et al., 1985; Ratledge et Boulton, 1985; Radwan et Soliman, 1988; Aggelis et al., 1995a; b; 1997) comme seule source de carbone et d'énergie. Les acides gras libres, incorporés dans la cellule microbienne et dégradés par le biais de la β-oxydation, donneront, d'une part, de l'énergie nécessaire pour la croissance cellulaire (sous forme des co-enzymes réduits) et, d'autre part, des molécules organiques (métabolites intermédiaires) qui constitueront les substances précurseurs pour la biosynthèse des matériaux cellulaires (Ratledge, 1984; Aggelis et al., 1991).

Le processus de la β-oxydation (Figure II. 6) contribue à former une molécule de $NADH_2$ et une molécule de $FADH_2$ pour chaque molécule produite d'acétyl-CoA avant que cette dernière n'entre dans le cycle de Krebs.

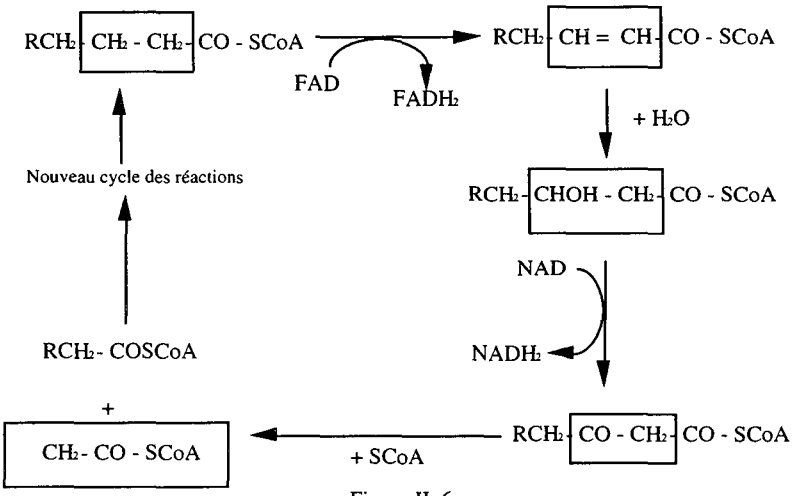


Figure II. 6

Schéma de la β-oxydation des acides gras ayant un nombre des carbons pair (d'après Ratledge, 1984).

Il est évident que les savons ainsi que les acides gras libres peuvent être utilisés par un large éventail de microorganismes indépendamment de leurs capacités

lipolytiques. Par contre, l'utilisation de triglycérides et d'esters méthyliques nécessite l'existence d'un système lipasique actif, dans l'arsenal enzymatique du microorganisme.

Le processus d'accumulation lipidique à partir des lipides, (comme celle à partir des hydrocarbures), présente des différences biochimiques fondamentales, comparé à la biosynthèse lipidique à partir des milieux osidiques; contrairement au cas de la biosynthèse *de novo* des acides gras cellulaires, l'accumulation lipidique à partir des milieux de type graisses s'effectue indépendamment de l'épuisement de la source azotée du milieu réactionnel (Aggelis et al., 1995a; Aggelis et Sourdis, 1997). Les chaînes aliphatiques entrent dans la cellule microbienne par l'intermédiaire d'un transport actif, et elles sont soit dégradées soit stockées en tant que réserves lipidiques. En général, la présence des chaînes aliphatiques extracellulaires même dans des faibles concentrations, bloque les systèmes de la biosynthèse *de novo* des lipides (Meyer et Schweizer, 1976; Alvarez et al., 1997). De plus, quand la concentration du substrat extracellulaire est inférieure d'une valeur critique, constituant ainsi le facteur qui limite la croissance cellulaire, les microorganismes dégradent leurs propres réserves lipidiques, afin d'assurer leur énergie nécessaire pour la maintenance et la croissance (Holdsworth et Ratledge, 1988; Aggelis et al., 1995a).

II.4.2. La modification du substrat lipidique par les microorganismes oléagineux

Les microorganismes oléagineux qui croissent à partir d'une matière grasse, accumulent et, en même temps, modifient le substrat lipidique dont ils disposent. Cette modification s'effectue, d'une part, par la spécificité des membranes cellulaires vis-à-vis des chaînes aliphatiques du milieu de culture et, d'autre part, par les changements endo-cellulaires des acides gras, définis par les capacités enzymatiques du microorganisme. Les acides gras incorporés, vont être soit oxydés pour donner de l'énergie nécessaire pour le métabolisme, soit devenir un "substrat" pour des biotransformations intracellulaires (synthèse de nouveaux profils lipidiques n'existant pas au-paravant).

Peu de levures oléagineuses ont la capacité de pousser sur la matière grasse et en même temps accumuler de quantités hautes en lipides. Elles appartiennent au genre Torulopsis sp. (Torulopsis versatilis, Torulopsis sp. ATCC 20507), Candida sp. (Candida tropicalis, Candida (Yarrowia) lipolytica), Trichosporon sp. et au genre Rhodosporidium toruloides (Matsuo et al., 1981; Glatz et al., 1984; Gierhart, 1984; Aggelis et al., 1997). Concernant Yarrowia lipolytica, comme cela a été déjà souligné, son incapacité à synthétiser des quantités significatives des graisses cellulaires à partir de substrats osidiques, conduit à ne pas le considérer en tant que microorganisme oléagineux. Cependant, la potantialité, au moins pour quelques souches, de Yarrowia

lipolytica d'accumuler des graisses à partir des milieux lipidiques, est incontestable (Glatz et al., 1984; Montet et al., 1985; Aggelis et al., 1997).

Le profil lipidique de la matière grasse intracellulaire accumulée, peut notablement différer par rapport au substrat, permettant, en cela, l'obtention des graisses ayant une composotion très interessante. D'autres fois, l'huile cellulaire présente une composition voisine que celle du substrat substrat fourni (Tableau II. 2).

Tableau II. 2
Composition lipidique du substrat (S) et des cellules (C) lors de la croissance de quelques levures oléagineuses sur des substrats lipidiques

Type		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	Souche	Auteur
Méthyl-stéarate	S		100				
	C	4	40	48	5	Torupopsis sp.	Matsuo et al., 1981
Esters méthyliques	S	30	70				
	C	35	17	32	6	C. tropicalis	Matsuo et al., 1981
Esters méthyliques	S	30	70				
	C	39	18	32	5	Trichosporon sp.	Matsuo et al., 1981
Huile de maïs	S	12	2	22	62		
	C	11	2	36	41	Y. lipolytica	Glatz et al., 1984
Huile de line	S	7	4	20	15		
	C	6	7	36	19	Y. lipolytica	Glatz et al., 1984
Huile de palme	S	30	2	45	11		
	C	27	8	47	10	Y. lipolytica	Glatz et al., 1984
Huile d'olive	S	13	3	69	11		
	C	12	3	70	13	Y. lipolytica	Glatz et al., 1984
Acide stéarique	S		100				
	C	13	49	26	4	R. toruloides	Gierhart, 1984
Savons du palmitate	S	52	5	31	7		
	C	4	3	38	17	Y. lipolytica	Montet et al., 1985

Certaines souches de levures oléagineuses possèdent des systèmes de désaturarion élevés (désaturases $\Delta 9$ et $\Delta 12$) et accumulent une huile plus insaturée par rapport au substrat initial (Matsuo et al., 1981; Gierhart, 1982; Montet et al., 1985). Par contre, d'autres souches ont tendance à assimiler les acides gras polyinsaturés et à accumuler en tant que réserves de stockage les acides gras plus saturés (Glatz et al., 1984; Aggelis et al., 1997).

Contrairement aux levures, certains champignons peuvent croître sur des lipides et accumuler des quantités élevées en graisses cellulaires. Dans la majorité des cas, les champignons accumulent des lipides plus insaturés par rapport aux substrats lipidiques

fournis, puisqu'ils disposent des systèmes de désaturases actifs (Ratledge et Boulton, 1985; Aggelis et al., 1991). Ainsi, Mortierella ramanniana désature l'acide linoléique en produisant des quantités hautes en acide γ-linolénique (A.G.L.) (Kamisaka et al., 1990). Des souches du champignon Mucor, cultivées sur l'huile de tournesol, riche en acide linoléique, accumulent 65% (w/w) de lipides cellulaires contenant 17,4% d'A.G.L. (Aggelis et al., 1991).

La modification de la matière grasse du substrat ne s'effectue pas seulement en vertu de déshydrogénations, mais elle peut résulter de l'assimilation préférentielle des chaînes aliphatiques, ainsi que de réactions d'hydroxylation ou bien d'élongation des acides gras incorporés. Ainsi, Nocardia cholosterolium NRRL 5667 est capable de transformer les acides linoléique et linolénique en acides gras hydroxy-insaturés (Koritala et Bagby, 1992), alors que des phycomycètes accumulent de quantités hautes d'acide arachidonique à partir des acides gras ayant des chaînes aliphatiques plus courtes, comme seule substrat carboné (Radwan et Soliman, 1988).

II.4.3. Conclusions sur l'utilisation des substrats de type lipidique

Il apparaît que la matière grasse constitue un substrat potentiel pour les biotransformations microbiennes. L'utilisation des graisses industrielles (pâtes de neutralisation, acides gras utilisés dans les savonneries, esters méthyliques, etc) ou des lipides à faible valeur ajoutée (huile de colza, de tournesol, etc) en tant que substrats carbonés, pour la production de lipides microbiens à haute valeur ajoutée (lipides riches en A.G.P.I. ou succédanés des lipides exotiques) est une perspective tout à fait attractive, tant au niveau scientifique qu'au niveau écologique et économique.

III. LES HUILES D'ORGANISMES UNICELLULAIRES (H.O.U.)

III.1. Généralités

La partie majoritaire des lipides accumulés chez les microorganismes oléagineux, indépendamment de la source carbonée utilisée afin qu'il y ait liposynthèse, est celle des triglycérides, qui représente 60-80% (w/w) de la masse totale des lipides (Ykema et al., 1988; Davies et Holdsworth, 1992; Ratledge, 1994). Les huiles microbiennes sont de type "végétal", c'est-à-dire que la position sn2 du glycérol est estérifiée presque en totalité par des acides gras insaturés (Ratledge et Boulton, 1985). La structure des triglycérides microbiens, ainsi, est de type IIS, SII et SIS (S : acide gras saturé, I : acide gras insaturé, Ratledge et Boulton, 1985).

L'estérification au niveau de positions sn1 et sn3 du glycérol ne s'effectue pas de la même façon chez les microorganismes oléagineux; DeBell et Jack, (1975) ont demontré que la position sn1 du glycérol est occupé de l'acide palmitique dans un pourcentage de 65%, alors que la position sn3 ne compte que 40% de cet acide pour le champignon Cunninghamella blakesleeanus. De même, il a été montré que Lipomyces lipofer contient 61% d'acide oléique à la position sn1 du glycérol, 40% à la position sn3 et 90% à la position sn2 (Haley et Jack, 1974 d'après Ratledge et Boulton, 1985).

III.2. Paramètres influençant le processus d'accumulation lipidique

La composition des lipides microbiens est influencée, parfois de façon très importante, par divers paramètres comme la source carbonée, azotée, la vitesse spécifique de croissance, la température d'incubation, l'aération etc (Yoon et Rhee, 1983; Hansson et Dostalek, 1986; Granger et al., 1992; Ratledge, 1987; 1994; Hamid et al., 1995; Saxena et al., 1998).

1) Comme il a été déjà cité, la nature de la source carbonée utilisée, peut influencer beaucoup la composition des lipides accumulés. De même, plusieurs fois, la quantité et non seulement la composotion des lipides peut varier énormement d'un substrat à l'autre (Thorpe et Ratledge, 1972; Choi et al., 1982; Montet et al., 1985; Davies et Holdsworth, 1992; Hamid et al., 1995; Saxena et al., 1998).

2) La source azotée peut avoir un effet considérable sur la quantité et la composition des lipides microbiens (Hansson et Dostalek, 1986; Davies et Holdsworth, 1992). L'effet de l'asparagine, de L-glutamate et du chlorure d'ammonium en tant que sources azotées, a été étudié chez plusieurs souches de levures oléagineuses (Evans et Ratledge, 1984). Il a été démontré que l'azote organique stimule le processus d'accumulation lipidique. Le résultat le plus marquant a été obtenu avec

Rhodosporidium toruloides, dont le contenu lipidique a été augmenté de 18% (w/w) à 51% (w/w) grâce à une source organique azotée. La même observation a été faite par Moreton (1982) (d'après Davies et Holdsworth, 1992). Néanmoins, Hansson et Dostalek (1986) ont rapporté que la concentration des graisses accumulées chez Cryptococcus albidus était plus élevée quand de sources azotées inorganiques ont été utilisées.

3) Le rôle de la température d'incubation peut avoir une importance critique vis-à-vis de la quantité ainsi que de la composition des lipides accumulés (Hansson et Dostalek, 1986; Davies et Holdsworth, 1992; Saxena et al., 1998). En général, le fait de diminuer la température favorise la présence d'acides gras insaturés (Rattray et al., 1975). Des études réalisées chez Candida lipolytica, ont montré que la diminution de la température d'incubation de 25°C a 10°C a induit une augmentation du pourcentage de l'acide oléique et linoléique (Ferrante et Kates, 1983 d'après Davies et Holdsworth, 1992). Presque la même observation a été réalisée par Granger et al., (1992), chez Rhodotorula glutinis. De même, une augmentation de la température d'incubation a provoqué une diminution du degré d'insaturation at une augmentation de la présence des acides gras saturés à une chaîne aliphatique courte (études sur Rhodotorula minuta - Saxena et al., 1998). A l'inverse, selon Davies (1992), des cultures en continu à différentes températures d'incubation de Apiotrichum curvatum, n'ont montré que très peu de changements dans la composition des lipides cellulaires.

5) Le pH est un facteur, qui, en général, a peu d'influence tant au niveau composition qu'au niveau vitesse d'accumulation des lipides cellulaires. Des études réalisées avec Candida 107 dans une large gamme de pH (de 3,5 jusqu'à 7,5) ont montré peu de changements sur la réponse de cette souche à propos de l'accumulation lipidique (vitesse de production et composition) (Ratledge, 1994). De même, Davies (1992), qui, en travaillant avec une souche de Apiotrichum curvatum entre pH 3,5 et 5,7, n'a pas trouvé de différences marquantes au niveau de l'accumulation lipidique. Néanmoins, la croissance cellulaire fut stoppée dans le cas d'un pH inférieur à 2,5.

6) Le taux d'aération du milieu de la fermentation, contrairement au pH, a une importance critique vis-à-vis du processus d'accumulation lipidique. Choi et al., (1982) ont rapporté que le microorganisme aérobie stricte Rhodotorula gracilis, cultivé en continu en limitation d'azote, présente une altération significative de son profil lipidique quand la concentration de l'oxygène dissous diminue; le taux de stéarate et d'oléate augmente, tandis que celui des acides gras polyinsaturés diminue. Roux et al., (1995) ont montré que la croissance de Mucor circinelloides, à faible concentration d'oxygène dissous, ont provoqué une diminution notable du taux des acides gras polyinsaturés (en l'occurence de l'acide γ-linolénique) avec une augmentation simultanée de l'acide stéarique et des triglycérides symétriques SIS. Ceci a aboutit à la synthèse d'une huile de composition proche de celle du beurre de cacao.

Par la suite, nous allons présenter les plus intéressantes applications des H.O.U..

III.3. Les acides gras polyinsaturés (A.G.P.I.)

III.3.1. Présentation générale

Principalement produits par les champignons et les algues, les acides gras polyinsaturés (A.G.P.I.) constituent une des applications les plus adéquates de la production des H.O.U.. Les A.G.P.I. constituent les précurseurs de la biosynthèse des prostaglandides, molécules qui empêchent la coagulation des plaquettes sanguines en présentant en même temps des capacités de prévention de bloccage des artères par les plaques athéromatiques (Helme, 1986; Bear-Rogers, 1988). Les études, donc, portant sur les producteurs microbiens des A.G.P.I. sont très intéressantes.

III.3.2. Les principaux A.G.P.I.

1) L'acide γ-linolénique (A.G.L.). La formule de l'A.G.L. est C18:3 , Δ-6,9,12. Il s'agit, donc, d'un acide gras de la série ω-6, dérivé de la déshydrogénation de l'acide linoléique. Les champignons inférieurs (Phycomycètes) possèdent l'A.G.L. en quantités relativement importantes. Il est consideré que la présence de l'acide A.G.L. chez ces champignons, constitue une caractéristique phylogénétique (Shaw, 1965). Plusieurs recherches ont été réalisées en vue de produire des H.O.U. riches en A.G.L.. De souches de Mucor circinelloides ou de Mucor rouxii ont été utilisées en cultures en discontinu, discontinu alimenté ou continu. Le substrats carbonés utilisés étaient divers : glucose, hydrolysats d'amidon, acide acétique ou lipides végétaux (Aggelis et al., 1988; 1991; 1995a; Hansson et al., 1989; Lindberg et Hansson, 1991; Botha et al., 1997; Immelman et al., 1997). Le succès des cultures a conduit à l'extrapolation du procédé (utilisation des fermenteurs agités de 220 m^3 - Ratledge, 1994).

2) L'acide arachidonique (A.AR.). La formule de l'A.AR. est C20:4 Δ-5,8,11,14. Cet acide fait partie, donc, à la série ω-6. Les champignons inférieurs (Phycomycètes) appartenant au genre Mortierella sp. et surtout aux espèces Mortierella alpina et Mortierella elongata (Totani et Oba, 1988; Shinmen et al., 1989; Ratledge, 1994; Singh et Ward, 1997), sont les sources microbiennes les plus riches en acide arachidonique. Dans plusieurs cas, Mortierella alpina a produit plus que 10 g/l d'acide arachidonique (fermentations en discontinu alimenté - Ratledge, 1993).

3) L'acide eicosapentaénoïque (A.E.P.). La formule de l'A.E.P. est C20:5 Δ-5,8,11,14, 17, c'est un acide gras, donc, de la série ω-3. Il a été demontré que ce sont surtout les bactéries Shewanella putrefaciens, Alteromonas putrefaciens, diverses algues (surtout Chlorella sp.) et quelques souches de champignons (Pythium sp., Saprolegnia spp., Schizochytrium sp. et Mortierella sp.) qui arrivent à synthétiser cet acide gras (Seto et al., 1984; Shimizu et al., 1988; Ratledge, 1992; 1993; 1994). Le

problème affronté dans quasiment toutes les souches productrices de cet acide est que, quand la biomasse est riche en lipides, ces lipides sont pauvres en A.E.P. et vice versa.

III.4. Les succédanés microbiens de beurre de cacao

III.4.1. Présentation générale

Une des applications les plus intéressantes de la production des H.O.U. porte sur la production des lipides dont les caractéristiques ressemblent à celles du beurre de cacao. Peu répandu dans la nature (excepté dans quelques pays Africains et Americains comme la Côte d'Ivoire, la Jamaïque etc) et assez coûteux, le beurre de cacao constitue une matière grasse indispensable pour les industries alimentaires, notamment les chocolateries. Il est composé majoritairement de triglycérides de type POS et SOS (P : acide palmitique, O : acide oléique et S : acide stéarique). L'acide oléique se trouve, toujours, estérifié en position sn2. La composition du beurre de cacao, dépendante des variétés et des conditions de culture n'est pas constante. La composition moyenne est la suivante :

Palmitate 23-33% (en masse)

Oléate 30-39% (en masse)

Stéarate 33-40% (en masse)

Linoléate 2-5% (en masse).

Etant donné son coût élevé, plusieurs approches ont été engagées afin de synthétiser une matière grasse ressemblant à ce beurre. La première stratégie suivie, était le mélange de diverses graisses de plantes exotiques (Bassia longifolia - illepé, Mangifera indica - mango), avec des fractions d'huile de palme (Smit et al., 1992). Des stratégies biotechnologiques, qu'il s'agisse d'approches enzymatiques ou fermentaires ont été également mises en évidence (Ratledge, 1987; 1993; 1994). Concernant l'utilisation des enzymes, elles mettent en œuvre des lipases libres ou immobilisées, qui catalysent des réactions de transestérification d'huiles par des acides gras en milieux anhydres, afin d'aboutir à la synthèse des triglycérides recherchés (transestérification de l'huile de palme par l'acide stéarique aboutissant à la synthèse des triglycérides de type POS et SOS - Chang et al., 1990; Bloomer et al., 1990).

Afin de produire un équivalent de beurre de cacao, plusieurs études mettant en jeu des microorganismes oléagineux ont été, également, effectuées. Le fait que ces microorganismes accumulent majoritaiement leurs lipides sous forme de triglycérides estérifiés en position sn2 avec des acides gras insaturés, a favorisé cette approche. La plupart des études ont fait appel à des levures oléagineuses (Ratledge, 1987; Davies et Holdsworth 1992). Chez ces levures, l'acide stéarique n'est, en général, qu'un constituant mineur des réserves lipidiques (inférieur de 10% en masse des lipides). Il est, donc, nécessaire de mettre en place une stratégie adaptée afin d'augmenter le taux

intracellulaire de l'acide stéarique (Davies et Holdsworth 1992). Plusieurs voies en vue de se rapprocher de la composition du beurre de cacao ont été suivies.

III.4.2. Opération de séparation des lipides cellulaires

La mise en culture de levures oléagineuses conventionelles (Rhodosporidium toruloides, Lipomyces lipofer, Rhodotorula graminis sur glucose sous limitation d'azote) a été réalisée. La matière grasse intracellulaire (lipides de 60% en masse par rapport à la matière sèche) a subi une séparation soit par fractionnement soit par cristallisation afin de récuperer la fraction des triglycérides SIS (S : acide gras saturé, I : acide gras insaturé) (US Patent 4032, 405, Tatsumi et al., 1979). De cette façon, majoritairement de triglycérides de type POP et POS ont été purifiés et utilisés lors de la fabrication du chocolat, à la place du beurre de cacao. Le résultat s'est montré satisfaisant, aussi bien au niveau du point de fusion du chocolat que des proprietés organoleptiques, en général, du produit (Tatsumi et al., 1979). L'inconvénient de ce type d'utilisation, repose sur le fait que seul le 35% en masse des triglycérides cellulaires sont présents dans la structure SIS (Davies et Holdsworth, 1992), ce qui a conduit à la recherche d'autres stratégies afin d'augmenter le taux d'acide stearique chez les levures.

III.4.3. Culture sur des préparations d'acide stéarique ou de ses dérivés

Certaines levures oléagineuses sont capables de se développer tout en accumulant et modifiant la matière grasse si elle s'utilise en tant que seule source carbonée. Ainsi, la deuxième stratégie suivie afin de produire une graisse intracellulaire dont la composition ressemble au beurre de cacao, repose sur la capacité de croissance de quelques levures oléagineuses sur des substrats lipidiques riches en acide stéarique et acide palmitique ou leurs dérivés (US Patent 4308, 350 - Matsuo et al., 1981; UK Patent 2091, 285 - Gierhart, 1982a; UK Patent 2091, 286 - Gierhart, 1982b). Les substrats utilisés sont l'acide stéarique et palmitique pur ainsi que leurs esters méthyliques, éthyliques, butyliques et vinyliques. Des mélanges de substrats lipidiques et osidiques ont été utilisés dans, au moins, deux cas (mélanges de glucose ou glycérol avec l'acide stéarique pur - Gierhart 1982a; b). Il s'agissait soit d'un procédé à deux étapes, où les substrats osidiques servaient à la croissance cellulaire, alors que la liposynthèse avait lieu à partir d'émulsion fine de l'acide stéarique, soit d'une co-utilisation simultanée des deux types des substrats.

Les genres Candida sp., Torulopsis sp. et Trichosporon sp. (Candida tropicalis, Torulopsis sp. ATCC 20507, Trichosporon sp. ATCC 20505 - Matsuo et al., 1981) et l'espèce Rhodosporidium toruloides (Gierhart, 1982a; b) ont été, en général, utilisés. Les résultats les plus marquants, sont rassemblés dans le Tableau III. 1.

Tableau III. 1
Utilisation de l'acide stéarique ou de ses dérivées afin de produire des succédanés microbiens de beurre de cacao.

	A	B	C	D	E	F
Lipides (% w/w)	35	61	51	52	43	47
C16:0	26	32	26	11	10	14
C18:0	26	29	37	32	29	39
C18:1	39	32	22	42	44	37
C18:2	5	5	8	8	7	1

A : Candida guillermondii IFO 0838 sur 14 g/l de stéarate de méthyle et 6 g/l de palmitate de méthyle (Matsuo et al., 1981)

B : Trichosporon sp. ATCC 20506 sur 14 g/l de stéarate de méthyle et 6 g/l de palmitate de méthyle (Matsuo et al., 1981)

C : Torulopsis sp. ATCC 20507 sur 13 g/l de stéarate de vinyle et 7 g/l de palmitate de vinyle (Matsuo et al., 1981)

D : fermentation à deux étapes, où Rhodosporidium toruloides s'est d'abord développé sur 50 g/l de glucose et ensuite sur 10 g/l de stéarate et 10 g/l de glucose (Gierhart, 1982a)

E : fermentation à deux étapes, où Rhodosporidium toruloides s'est d'abord développé sur 50 g/l de glucose et ensuite sur 10 g/l de stéarate et 1 g/l de glycérol (Gierhart, 1982a)

F : fermentation à deux étapes, où Rhodosporidium toruloides s'est d'abord développé sur 50 g/l de glucose et ensuite sur 10 g/l de stéarate et 5 g/l de glucose (Gierhart, 1982a)

Cette approche peut présenter un intérêt accru seulement si les acides stéarique et palmitique vont être substitués par des graisses moins coûteuses; le coût de ces deux acides gras utilisés "purs" est élevé et rend cette approche non rentable d'un point de vue économique (Ratledge, 1993; 1994). En revanche, cette approche a été considerée comme très intéressante, parce qu'elle a montré que les levures peuvent accumuler de quantités significatives en acide stéarique (Davies et Holdsworth, 1992; Ratledge, 1994).

III.4.4. Utilisation des inhibiteurs des désaturases microbiennes

La troisième stratégie utilisée pour l'augmentation du taux d'acide stéarique dans les réserves lipidiques chez les microorganismes oléagineux, repose sur le fait que

les plantes, les animaux ainsi que les microorganismes ne produisent pas les acides gras insaturés directement. Il y a, d'abord, formation d'un précurseur saturé, qui ensuite subit des désaturations séquentielles, les doubles liaisons étant introduites en premier lieu sur la position $\Delta 9$ et ensuite sur les positions $\Delta 12$ et $\Delta 15$ (la désaturation sur la position $\Delta 15$ s'effectue plus rarement chez les levures oléagineuses) (Moreton, 1985).

La voie de la désaturation des groupes acylés est présentée dans la Figure III. 1.

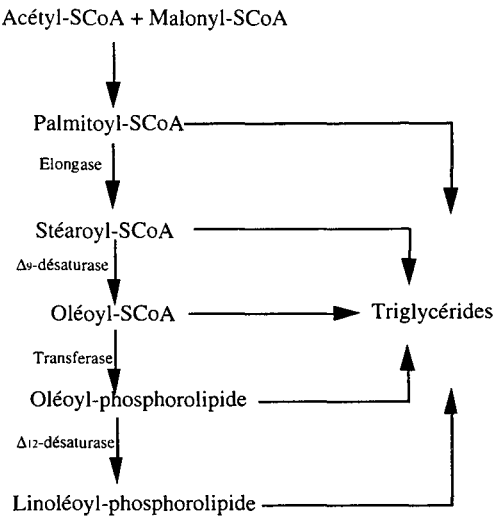


Figure III. 1
Voies de désaturation des groupes acylés chez les levures oléagineuses (d'après Ratledge, 1994).

Les acides gras cyclopropeniques sterculique et malvanique, trouvés dans l'huile de pépin des diverses plantes appartenant aux familles Malvaceae et Sterculiaceae (Yano et al., 1972), sont des acides gras à 17 ou 18 atomes de carbone ayant un groupe cyclopropenique à la position $\Delta 9$. Ces acides, inhibant la désaturation chez les plantes et les animaux, ont été également utilisés afin de modifier la graisse accumulée chez les microorganismes oléagineux (Moreton, 1985). Plusieurs souches ont été testées (Candida 107, Trichosporon cutaneum, Rhodosporidium toruloides), et en aucun cas, l'inhibiteur cyclopropenique n'a modifié ni la croissance cellulaire ni l'accumulation des lipides, mais a diminué le taux d'acide oléique des réserves lipidiques, même s'il a été utilisé à des faibles concentrations (Tableau III. 2).

Tableau III. 2
Effet de l'acide sterculique sur la composition des lipides cellulaires de quelques souches oléagineuses - croissance effectuée sur glucose (l'huile de sterculia contient 50% w/w d'acide sterculique) (d'aprés Moreton, 1985).

Huile de sterculia (ml/l)	Biomasse (g/l)	Lipides (% w/w)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
0.2[1]	6.0	24.7	28	33	10	23
2[1]	7.1	33.1	25	43	10	14
0.2[2]	8.4	30.2	32	24	27	14
2[2]	7.6	30.8	35	23	25	13
0.2[3]	10.1	33.8	15	31	23	15
2[3]	10.3	32.0	13	41	18	15

1. Utilisation de Candida 107
2. Utilisation de Trichosporon cutaneum
3. Utilisation de Rhodosporidium toruloides

Il est clair que l'utilisation de ces inhibiteurs a eu comme résultat la synthèse d'une graisse globalement saturée. Etant donné, néanmoins, que les inhibiteurs de la position $\Delta 9$ n'ont eu presque aucun effet sur la désaturation $\Delta 12$, la graisse levurienne a présenté des pourcentages élevés en acide linoléique (20% en masse par rapport aux lipides totaux). Or, le beurre de cacao ne présente cet acide gras qu'aux alentours de 5% (en masse). Il fallait, donc, une deuxième inhibition sur la position $\Delta 12$. Un inhibiteur tel, l'acide cis-méthylène-octadécénoïque, a été utilisé en diminuant le taux de l'acide linoléique (Moreton et Clode, 1985 d'après Ratledge, 1994) (Tableau III. 3).

Tableau III. 3
Effet d'utilisation des inhibiteurs $\Delta 9$ et $\Delta 12$ sur la composition des lipides de Rhodosporidium toruloides (Moreton et Clode, 1985 d'après Ratledge, 1994).

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Contrôle (aucune addition)	28	7	40	18
Huile de sterculia (0.3 ml/l)	15	48	19	9
$\Delta 12$- inhibiteur (0.3 ml/l)	36	8	45	2
Huile de sterculia et $\Delta 12$- inhibiteur (0.3 ml/l)	20	47	22	5

L'utilisation d'inhibiteurs des désaturases augmente la saturation des graisses intracellulaires, en aboutissant à la synthèse de lipides présentant une composition comparable à celle du beurre de cacao. Néanmoins, cette stratégie présente deux inconvénients fondamentaux : d'abord, le coût élevé des inhibiteurs utilisés (si l'acide sterculique est un produit naturel existant dans l'huile de sterculia, l'acide cis-méthylène-octadécénoïque est un produit synthetisé chimiquement). Le deuxième grand défaut de cette méthode est que les inhibiteurs des désaturases peuvent provoquer de mutagenèse et de cancérogenèse (Ratledge, 1994).

III.4.5. Utilisation des souches génétiquement modifiées

La quatrième approche utilisée afin d'augmenter le pourcentage de l'acide stéarique chez les levures oléagineuses, est une approche génétique. Elle porte sur le clivage du gène codant pour la formation de l'enzyme $\Delta 9$ désaturase, qui, comme nous l'avons déjà vu, est l'enzyme responsable de la biotransformation de l'acide stéarique en acide oléique (Ykema et al., 1989; 1990; Smit et al., 1992). Des suspensions cellulaires du type sauvage Apiotrichum curvatum (Candida curvata), ont été traitées avec le facteur mutagène N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) et ensuite ont été cultivées sur un milieu supplémenté en acide oléique. Des colonies formées ont été répiquées sur des boîtes sans supplément d'acide oléique. Les colonies développées sur les deux types de substrat ont subi une importante sélection et seulement 18 colonies de mutants auxotrophes en acides gras insaturés (Ufa mutants) ont été obtenues sur 200000 colonies analysées (Ykema et al., 1990).

Les lipides intracellulaires isolés par les Ufa mutants, qui s'étaient développés sur des milieux supplémentés en acide oléique, ont été analysés et comparés avec ceux du type sauvage A. curvatum. Les résultats ontenus, figurent dans le Tableau III. 4.

Tableau III. 4
Composition des lipides cellulaires de A. curvatum type sauvage (WT) et auxotrophe Ufa 33 (d'après Smit et al., 1992).

	WT		Ufa 33
	Aucun supplement	Supplement C18:1	Supplement C18:1
C16:0	28	17	22
C18:0	14	11	36
C18:1	44	55	24
C18:2	2	9	10
% A.G.S.	44	31	62

% A.G.S. pourcentage des acides gras saturés (% en masse des lipides totaux)

Comparé au profil lipidique du type sauvage, l'auxotrophe Ufa 33 a montré une augmentation significative d'acide stéarique dans ses réserves lipidiques, alors qu'en même temps le pourcentage d'acide oléique avait diminué. Notons que le profil des lipides cellulaires des mutants Ufa est fortement dépendant de l'apport d'acide oléique, et en procédant correctement à l'utilisation du sucre et de l'acide gras en tant que co-substrats, une composition proche de celle du beurre de cacao peut être obtenue (Smit et al., 1992). Lors de ce type de fermentation du lactosérum qui contient du lactose et de l'huile de colza (riche en acide oléique) ont été utilisées en tant que co-substrats (Smit et al., 1992; Ratledge, 1994).

Afin d'éviter l'utilisation supplémentaire d'acide oléique dans le milieu de culture, des révertants ou des hybrides des Ufa mutants ont été choisis, avec une activité partiellement restaurée de la désaturase $\Delta 9$ (Ykema et al., 1990; Smit et al., 1992). Le résultat obtenu est présenté dans le Tableau III. 5.

Tableau III. 5
Composition lipidique du mutant auxotrophique Ufa 33, du mutant révertant R22-72 et d'un hybride dérivé du mutant Ufa 33 (F33-10), comparée à celle du beurre de cacao (d'après Smit et al., 1992).

Levure	(% w/w)			
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Ufa 33[1]	20	50	6	11
R22-72	16	43	27	7
F33-10	24	31	30	6
Beurre de cacao	23-30	32-37	30-37	2-4

1. Croissance sans supplement d'acide oléique

Il est évident que la manipulation génétique des souches oléagineuses a abouti à des résultats très satisfaisants, qu'il s'agisse de la quantité de graisses intracellulaires produites ou bien de leur composition, puisque le pourcentage d'acide stéarique a augmenté significativement. Cependant, aucun effort d'extrapolation n'a été effectué, d'autant plus que les cultures sauvages, en général, présentent des productivités plus élevées par rapport aux cultures mutées.

III.4.6. Diminution du taux d'aération du milieu de fermentation

Afin d'obtenir par une manipulation métabolique, ce que les généticiens ont obtenu par le biais des mutations, Davies et al., (1990) ont procédé à une culture de Apiotrichum curvatum (Candida curvata) dans des conditions de tension d'oxygène limitées, lors de la phase d'accumulation lipidique. L'idée repose sur le fait que toutes

les réactions de désaturation dans la nature sont dépendantes de l'oxygène. Une limitation critique de l'oxygénation dans le milieu de fermentation pourrait diminuer le taux de conversion de l'acide stéarique en acide oléique, lors de sa désaturation. Les résultats obtenus (fermentation réalisée sur un réacteur "air-lift" de 20l) sont présentés dans le Tableau III. 6).

Tableau III. 6
Effet de la vitesse d'assimilation d'oxygène (O.U.R.) dans la composition lipidique de A. curvatum (croissance sur lactosérum) (d'après Davies et al., 1990).

O.U.R	% (w/w)						
mmol/l.h	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C24:0
8-10	14	16	55	10	1	1	3
7.5	16	17	55	5	0.5	1	3
6.2	19	25	45	5	0.5	1	3
4.8	18	25	45	5	0.5	1	4
2.4	24	24	41	4	0.6	1	4
2.2	23	23	42	3	1	1	4

Il est évident que, malgré le pourcentage relativement faible en acide stéarique observé dans les réserves lipidiques lors de cette approche, la somme des acides gras saturés (C16:0 , C18:0 , C20:0 et C24:0) dépasse souvent le pourcentage de 50% en masse par rapport aux lipides totaux. Ceci représente un résultat intéressant à double titre; d'abord parce que les levures oléagineuses ont la tendance à accumuler des acides gras insaturés et ensuite parce qu'aucune méthode coûteuse ou dangereuse n'a été appliquée (Ratledge, 1994). La diminution de la tension d'oxygène n'a pas affecté la croissance cellulaire (toujours 0,4 g de cellules formées par g de lactose consommé) ni le processus d'accumulation lipidique (environ 37% en masse). Il faut noter, que cette approche portant sur la production d'un succédané de beurre de cacao, est la seule qui a été extrapolée en réacteurs industriels (250 m^3).

IV. MODELISATION DE LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES SYNTHETISANT D'ACIDE CITRIQUE ET DE LIPIDES CELLULAIRES

IV.1. Modélisation de la production d'acide citrique

Le nombre des travaux portant sur la production d'acide citrique, qu'il s'agisse de la mise en culture (discontinu, discontinu alimenté, continu, recyclage cellulaire, fermentations en phase solide) ou d'utilisation des substrats carbonés (sucres, mélasses, hydrocarbures...) est très important. Néanmoins, les études ayant trait à la modélisation du comportement des souches productrices d'acide citrique sont relativement plus limitées. Très souvent, des approches physiologiques décrivant le flux carboné intracellulaire ont été tentées. Il s'agit du cas de la croissance de Aspergillus niger (Torres 1994a; b; Torres et al., 1995) ou de Yarrowia lipolytica sur des milieux osidiques (Aiba et Matsuoka, 1979; Kim et Roberts, 1991). Des modèles cinétiques décrivant la croissance et l'excrétion d'acide citrique en fermentations en discontinu et continu ont été, également, développés (la plupart du temps chez Yarrowia lipolytica - Klasson et al., 1989; Moresi, 1994). Dans ce type de modèle, l'azote constitue le facteur qui limite la croissance cellulaire.

Dans le cas d'une fermentation discontinue, Klasson et al., (1989) a proposé un modèle cinétique pour représenter la croissance cellullaire, la consommation du substrat carboné et la production de l'acide citrique. Ainsi, l'évolution de la biomasse est présentée ci-après (Equation IV.I.1) :

$$\frac{dX}{dt} = K \cdot X \cdot (1 - X / X_{max}) \qquad (IV.I.1)$$

où K est une constante des équations de croissance (h^{-1}) et X est la concentration en biomasse (g/l). Dans ce type de présentation, la concentration en biomasse dépend de la quantité d'azote disponible dans le milieu de fermentation, puisque cet élément constitue le facteur limitant : pour ce modèle, l'équation IV.I.2 décrit la quantité de la biomasse maximale X_{max} :

$$X_{max} = Y_{X/N} \cdot (N_0 + X_0 / Y'_{X/N}) \qquad (IV.I.2)$$

X_0 et N_0 sont les concentrations initiales en biomasse et en azote total (g/l), alors que $Y'_{X/N}$ est le rendement cellulaire en azote au début de la fermentation.

La consommation du sucre sert à la formation de biomasse (surtout lors de la phase de la production de biomasse) et à la biosynthèse d'acide citrique (lors de la phase stationnaire de la croissance) (Equation IV.I.3) :

$$-\frac{dGlc}{dt} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{Y_{X/Glc}} + \frac{dCit}{dt} \cdot \frac{1}{Y_{Cit/Glc}} \quad (IV.I.3)$$

Finalement, la formation d'acide citrique, majoritairement effectuée lors de la phase stationnaire de la croissance, est présentée ci-après (Equation IV.I.4) :

$$\frac{dCit}{dt} = \pi_{Cit} \cdot X \quad (IV.I.4)$$

où π_{Cit} (g de citrate par g de biomasse par heure) est la vitesse spécifique de production de citrate.

L'application du modèle développé sur les résultats expérimentaux, s'est avérée satisfaisante qu'il s'agisse de l'évolution de la biomasse, ou du substrat résiduel ou de l'acide citrique produit. Dans la Figure IV. 1, l'application du modèle pour la biomasse et le glucose est présentée.

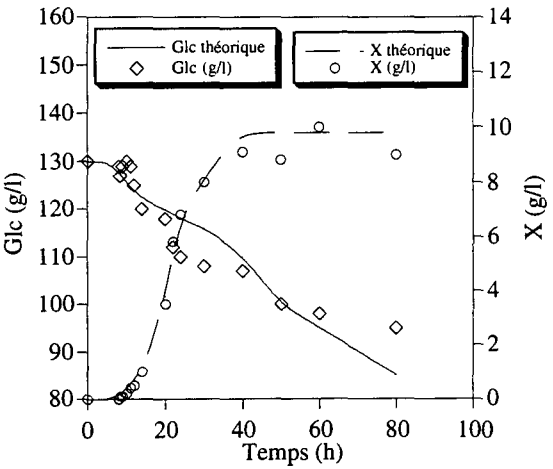


Figure IV. 1
Application du modèle sur les données expérimentales pour la croissance de Y.lipolytica sur glucose (d'après Klasson et al., 1989).

IV.2. Modélisation de l'accumulation de lipides cellulaires

IV.2.1. Modélisation de l'accumulation de lipides à partir des milieux osidiques

Le nombre d'études concernant l'accumulation lipidique à partir des milieux osidiques est assez important (fermentations effectuées en discontinu et continu). Néanmoins, les travaux portant sur la modélisation de cette bioconversion sont assez limités (Glatz et al., 1984; Ykema et al., 1986).

Glatz et al., (1984) ont proposé un modèle décrivant la croissance et l'accumulation lipidique de Apiotrichum curvatum sur lactose (fermentation en discontinu). Selon les deux phases de la fermentation observées (d'abord phase de la production de biomasse et ensuite, à partir de la limitation azotée, phase de la synthèse des graisses intracellulaires), il est condidéré que le processus d'accumulation lipidique est une combinaison de deux mécanismes préconisés :

I) Ose ⟶ X_f (biomasse exempte de lipides) + L (lipides)

II) Ose ⟶ Intermédiaire (I) ⟶ graisse cellulaire (L)

Le premier mécanisme correspond surtout à la phase de croissance cellulaire (formation de biomasse), alors que le deuxième, considérant que l'accumulation des graisses à partir des milieux osidiques passe par la formation d'un intermédiaire de lipides I (Glatz et al., 1984), décrit la phase de limitation azotée.

Le processus d'accumulation des lipides chez les microorganismes oléagineux est réalisé quand l'azote extracellulaire constitue le facteur qui limite la croissance cellulaire. La vitesse spécifique de production de biomasse exempte de lipides (μ_{Xf}) peut, ainsi, être représentée de la façon suivante (Equation IV.II.1) :

$$\mu_{Xf} = \mu_{Xfmax} \cdot \frac{N}{K_N + N} \qquad \text{(IV.II.1)}$$

où N est la concentration d'azote total dans le milieu de fermentation (g/l) et K_N est une constante de type Michaelien correspondant au substrat azoté (Glatz et al., 1984).

Il est considéré qu'une fonction puissance de $\phi = \mu_{Xf} / \mu_{Xfmax}$ sert à la transition du métabolisme cellulaire de la production de biomasse exempte de lipides, vers la synthèse des graisses intracellulaires. Plus spécifiquement, une fonction de type $(1 - \phi)^m$ est utilisée. Plus la concentration d'azote diminue, plus que la valeur de ϕ devient faible. La vitesse spécifique de formation de l'intermédiaire (π_I), liée à la limitation azotée, est décrite de la façon suivante (Equation IV.II.2) :

$$\pi_I = (1 - \phi)^m \cdot \pi_{Imax} \qquad \text{(IV.II.2)}$$

La consommation du lactose sert à la formation de la biomasse exempte de lipides Xf (première phase de la croissance) ainsi qu'à la création de l'intermédiaire I (phase de limitation azotée). Son évolution est présentée dans l'équation IV.II.3 :

$$-\frac{dOse}{dt} = \frac{dXf}{dt} \cdot \frac{1}{Y_{Xf/Ose}} + \frac{1}{Y_{I/Ose}} \cdot \frac{\pi_I \cdot Xf \cdot Ose}{K_{Ose} + Ose} \quad \text{(IV.II.3)}$$

où Ose est la concentration du lactose dans le milieu de fermentation (g/l), K_{Ose} correspond à une constante de type Michaelien pour le substrat osidique, Xf est la concentration de la biomasse exempte de lipides et I est la concentration de l'intermédiaire de la synthèse lipidique.

La graisse cellulaire est formé à partir de l'intermédiaire I (Equation IV.II.4) :

$$\frac{dL}{dt} = \frac{\pi_L \cdot I \cdot L}{K_I + I} \quad \text{(IV.II.4)}$$

où K_I est une constante de type Michaelien pour l'intermédiaire de la synthèse des lipides I, alors que π_L est la vitesse spécifique de formation des lipides cellulaires. L'application du modèle proposé sur les valeurs expérimentales s'est avérée satisfaisante. Dans la Figure IV. 2, l'application du modèle pour la biomasse totale X ainsi que la biomasse exempte de lipides Xf est présentée.

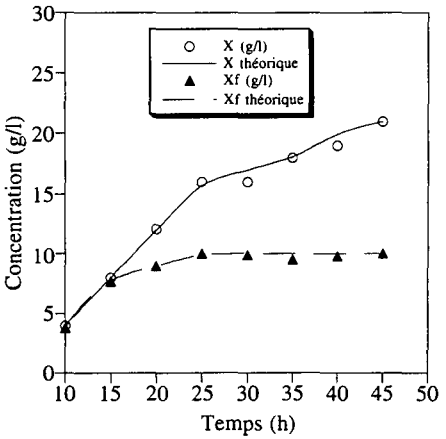


Figure IV. 2
Application du modèle sur les données expérimentales pour la croissance de Apiotrichum curvatum sur lactose (d'après Glatz et al., 1984).

Considérant que le mécanisme biochimique d'accumulation des graisses à partir des milieux osidiques passe par la formation d'un intermédiaire de lipides I, Ykema et al., (1986) ont proposé un modèle mathématique afin de prédire le rapport molaire initial C/N qui maximise la quantité des graisses accumulées en cultures en continu. Ce modèle est basé sur l'hypothèse que l'accumulation des lipides intracellulaires est déclenchée seulement quand le rapport massique C/N prend des valeurs supérieures d'une valeur critique.

Une bonne corrélation a été observée entre les valeurs mesurées et prédites. Dans la la Figure IV. 3, est présentée l'évolution de la biomasse totale en fonction du rapport massique C/N.

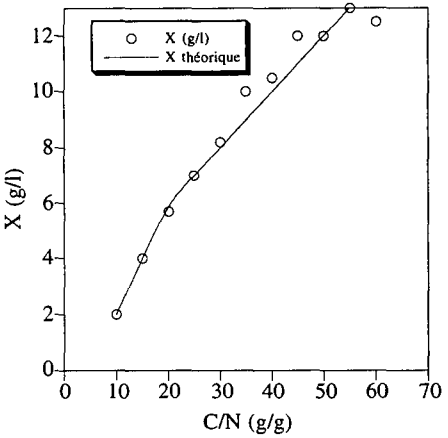


Figure IV. 3
Représentation de la biomasse totale (valeurs expérimentales et courbe théorique) en fonction du rapport massique C/N, lors de la fermentation en continu du glucose par Apiotrichum curvatum (d'après Ykema et al., 1986).

IV.2.2. Modélisation de l'accumulation des lipides à partir des milieux lipidiques

Plusieurs études ont été effectuées sur les microorganismes oléagineux avec des lipides utilisés comme seule source carbonée. Les différences biochimiques par rapport à l'accumulation des graisses à partir des milieux osidiques sont très importantes, puisque les souches poussent et accumulent en même temps des lipides intracellulaires.

Le processus d'accumulation lipidique à partir des milieux composés des graisses a été modélisé (croissance de Mucor circinelloides sur l'huile de tournesol en

cultures en discontinu - Aggelis et al., 1995a; b; Aggelis et Sourdis, 1997). L'accumulation lipidique s'effectue indépendamment de l'épuisement de la source azotée du milieu réactionnel. Ce processus dépend de la concentration de la matière grasse extracellulaire (Aggelis et al., 1995a). Ainsi, le processus d'accumulation des lipides dans la cellule est décrit par l'équation IV.II.5.

$$dL/dt = K_l S \quad (IV.II.5)$$

où L est la concentration en lipides cellulaires (g/l), S est le substrat lipidique (g/l), K_l constante d'incorporation de la matière grasse dans la cellule (h^{-1}) et la fermentation s'effectue en mode discontinue.

Quand la concentration du substrat lipidique devient inférieure à une valeur critique, les capacités biosynthétiques de la population microbienne ne peuvent pas être soutenues seulement par la réserve lipidique extracellulaire. C'est pourquoi le microorganisme consomme ses propres réserves lipidiques, afin d'assurer l'énergie nécessaire pour la maintenance et la croissance (Holdsworth et Ratledge, 1988; Aggelis et al., 1995a; b; Aggelis et Sourdis, 1997). Lors de cette phase de croissance, les lipides cellulaires sont consommés en faveur de la biomasse exempte des lipides (Equation IV.II.6) :

$$- dL/dt = (1/Y_{Xf/L}) \cdot dX_f/dt \quad (IV.II.6)$$

où X_f est biomasse exempte de lipides (g/l) et $Y_{Xf/L}$ le rendement de lipides cellulaires en biomasse exempte de lipides (g/g).

V. CONSIDERATIONS ECONOMIQUES - PERSPECTIVES

La production des H.O.U. présente un avantage important par rapport aux huiles et graisses conventionnelles, ce que les microorganismes oléagineux peuvent pousser et donc valoriser des substrats à faible valeur ajoutée (utilisation de lactosérum, des mélasses, du glycérol, des hydrocarbures...). Néanmoins, le coût final des lipides microbiens est 3 à 5 fois plus élevé par rapport aux huiles végétales, puisque l'extraction de l'huile et surtout la fermentation sont des procédés coûteux (Ratledge, 1992). La production des H.O.U. dans un système d'économie libérale, où le coût de production joue un rôle capital, n'est pas facile d'être économiquement rentable (Ratledge, 1992). Le problème épineux à résoudre, donc, est de trouver de méthodes de fermentation et d'extraction des graisses intracellulaires avec un coût limité, ce qui n'est pas évident (Ratledge, 1987; 1992).

Toutefois, les H.O.U. présentent un intérêt industriel accru étant donné qu'elles ne sont pas destinées à concurrencer actuellement, la matière grasse conventionelle. Le but de l'utilisation des H.O.U. de façon économiquement rentable est de produire des lipides et graisses peu répandus dans la nature. C'est le cas, en général, de la production des A.G.P.I. et les succédanés du beurre de cacao (Ratledge, 1987; 1994).

En ce qui concerne les premiers, la production de la plupart des A.G.P.I. par l'intermédiaire des microorganismes oléagineux est possible et faisable. Une extrapolation à l'échelle industrielle a été obtenue concernant la production de l'acide γ-linolénique à partir des souches de M. javanicus (circinelloides) alors que le remplacement de l'acide arachidonique synthétisé chez les poissons ou des animaux par celui obtenu par fermentations, est une perspective très proche et attractive (Ratledge, 1994). Ce qui reste à faire à propos de ce type de produits (A.G.P.I. microbiens) est, d'abord, d'avancer la réglementation existante, étant donné que dans plusieurs pays l'utilisation des produits biotechnologiques tels n'est pas prévu par le législateur, et, surtout, de persuader le public d'utiliser les huiles d'origine microbienne (Ratledge, 1993; 1994).

En ce qui concerne la production des succédanés microbiens de beurre de cacao, Davies (1992), après avoir réussi un "scale up" au niveau semi-industriel, a identifié trois étapes "clefs" concernant ce processus (qui peuvent être appliqués dans des autres procédés des H.O.U.) :

i) optimisation de l'utilisation du substrat (g de lipides cellulaires par 100 g de substrat consommé)

ii) optimisation de la récupération de la biomasse microbienne

iii) opération unitaire de l'extraction des lipides cellulaires avant de sécher les cellules.

Economiquement viable dans des années 1980-1990, la production des graisses cellulaires dont la composition ressemblait à celle du beurre de cacao (le prix de ce beurre était de 8000 U.S.$/tonne), est fortement dépendante du prix de ce produit exotique (Ratledge, 1993; 1994). La baisse significative de son prix (2000 U.S.$/tonne) lors des années 1990-1994 a constitué un inconvénient énorme concernant l'utilisation des analogues microbiens de ce beurre (Ratledge, 1993). Notons au passage (année 1998), que le prix du beurre de cacao serait en voie d'augmentation pour les années qui viennent, en raison des maladies qui déciment les plantes du cacao, ce qui pourrait rendre de nouveau économiquement intéressante l'utilisation des succédanés de ce beurre.

Quoi qu'il en soit, les huiles microbiennes sont produites par l'intermédiaire des procédés "douces", sans intervention d'insecticides et pesticides (contrairement aux cultures des plantes oléagineuses) (Ratledge, 1992). Concernant la recherche "H.O.U.", les études réalisées portent sur la limitation du coût de la fermentation et de l'extraction de la graisse cellulaire, la recherche de produits nouveaux ainsi que la détection des nouvelles souches oléagineuses (Ratledge, 1992; 1994).

Chapitre 2

MATERIELS - METHODES

I. MATERIELS

I.1. Produits chimiques

I.1.1. Milieux de culture

1) SELS

KH_2PO_4 (Prolabo) Réf. 26925/295, Na_2HPO_4 (Merck) Réf. 1187201, $MgSO_4x7H_2O$ (Merck) Réf. 2448620, $FeCl_3x6H_2O$ (Prolabo) Réf. 24214/295, $CaCl_2x2H_2O$ (Fluka) Réf. 21098, $ZnSO_4x7H_2O$ (Prolabo) Réf. 29243/367, $MnSO_4xH_2O$ (Fluka) Réf. 63554

2) SOURCES AZOTEES

Extrait de levure (Fluka) Réf. 70161, Sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ (Fluka) Réf. 09980

3) SOURCES CARBONEES

Stéarine (Papoutsanis S.A.) 4,5 FF/kg, Glycérol pur (Prolabo) Réf. 24388.295, Glycérol technique (Epilor - Recherche et développement) 2 FF/kg (pureté 60-65% w/w), GlucosexH2O (Fluka) Réf. 49159, Huile de colze oléique (Epilor - Recherche et développement) 6 FF/kg

4) EMULSIFIANTS

Tween 80 (Labosi) Réf. A4920901, P.E.G. 20000 (Labosi) Réf. A4920901

5) GELOSE

Potato Glucose Agar (Fluka) Réf. 70139

I.1.2. Solvants

Acétone (Lambert Rivière), Benzène (Prolabo) Réf. 21802/297, Chloroforme (Carlo Erba), Chlorure d'acétyle (Fluka) Réf. 00990, Cristal violet oxalate (Réactifs RAL) Réf. 3,61493, Ethanol 95% (Carlo Erba), Ether diéthylique (Prolabo) Réf. 23813/185, Ether du pétrole (Lambert Rivière), Hexane (OSI) Réf. A4821053, Iode (Fluka) Réf. 57660, Lugol (Réactifs RAL) Réf. 3,67303, Méthanol (Prolabo) Réf. 20846/361, Safranine (Réactifs RAL) Réf. 361503

I.1.3. Divers

Acétate de cuivre (Sigma) Réf. C-5409, acide acétique (Labosi) Réf. A01140, acide borique (Merck) Réf. 7481801, acide butyrique (Fluka) Réf. 19210, acide α-cétoglutarique (Labosi) Réf. A385, acide citrique mono-hydraté (Fischer) Réf. 6260/60,

acide chlorydrique (Labosi) Réf. A0420, acide heptadécanoïque (Fluka) Réf. 51610, acide iso-citrique (Sigma) Réf. I-1252, acide linoléique (Fluka) Réf. 62230, acide oléique (Fluka) Réf. 75093, acide palmitique (Fluka) Réf. 76129, acide phosphorique (Merck) Réf. 1123027, acide stéarique (Fluka) Réf. 85680, acide succinique (Fluka) Réf. 14079, acide sulfurique (Prolabo) Réf. 20700/323, bicarbonate de sodium (Prolabo) Réf. 27776/365, catalyseur de minéralisation Kjeldahl (Na_2SO_4 17%; $CuSO_4x5H_2O$ 1,5%; sel 1,5%), eau oxygenée (Descharme), E.D.T.A. (Sigma) Réf. E-5134, hydroxyde de potassium (Prolabo) Réf. 26655/292, hydroxyde de sodium (Sigma) Réf. S-5881, isocitrate déshydrogénase ICDH 4,2 mg/ml (Fluka) Réf. 58775, NADP (Sigma) Réf. N-0505, papier filtre Whatman n°3, sodium métallique (Fluka) Réf. 71172, sulfate de sodium anhydre (Labosi) Réf. A4898753, pierre ponce (Prolabo) Réf. 26398/293, Phénolphtaléine (Prolabo) Réf. 31724/295, Trizma BASE (Sigma) Réf. T-8524

I.2. Matériels utilisés

I.2.1. Verrerie

Ampoules à décanter (0,5 et 5l), ballons 250 ml, béchers 50, 250, 500, 2000 ml, cuvettes de spectromètre, entonnoirs, eprouvettes 50, 500, 2000 ml, fioles Erlenmayer 250, 300, 2500, 5000 ml, flacons 30 ml, matras

I.2.2. Appareils

Agitateur magnétique chauffant Bioblock 35006, appareil de dosage Kjeldahl Vapodest 4S Gerhardt Osi (équipé de : titration automatique 64S multi-dosimat metroHM, minéralisation technicon BD-20 heating unit), autoclave Lequeux, bain-marie, balance de précision 10^{-4} Mettler AT 200, balance de précision 10^{-1} Precisa 6000 D, centrifugeuse Jouan M 14.11, chauffe ballon Prolabo, colonne à reflux, étuve Memmert U 30, hotte aspirante SIBM PLASTEC HPV 760 BN, microscope Laborlux 12 Leitz, micropipette P200 Finnpipette Digital ACL 40-200 µl, micropipette P1000 Finnpipette Digital ACL 200-1000 µl, pH-mètre Radiometer PHM62 Standard pHMeter, rotavapor Büchi R-144 (équipé de : bain-marie Büchi Waterbath B-480, pompe à vide KNF Neuberger Laboport, switch-box Büchi B-745, flacon 100 ml Preciso NS 2932, high vacuum grease Dow Corning), sonde "orion 95-12", sonicateur Labo-Moderne, spectromètre BECKMAN DU7500 (équipé de : bain-marie Bioblock polystat), table d'agitation Certomat R. B. Braun Descharmes, tubes en polypropylène 30 ml NALGENE 99433, ultra Turrax T 25 JANKE et KUNKEL IKA-Labortechnik, vortex Bioblock TOP-MIX 94323

I.2.3. Analyses

Chromatographe Liquide Haute Performance M.6000 A Waters équipé de :
spectrophotomètre LC Lambda-Max Model 481

réfractomètre différentiel Waters RI 410
four pour colonne CLHP Waters HTR
injecteur automatique Waters 712 WISP
pompe Spectra SERIES P100
logiciel d'acquisition et de traitement Chroma
tubes 1 ml Waters WAT025054
filtres 0,20 µm Sartorius-Minisart

Chromatographe en Phase Gazeuse Delsi DI 200 équipé de :
vanne d'injection liquide automatique Delsi Nermag
détecteur à ionisation de flamme Delsi Nermag
colonne capillaire COT de silice fondue dont les caractéristiques sont les suivants :
phase stationnaire : Carbowax 30m J&W Scientific
diamètre interne 0,32 mm
épaisseur de film 0,25 µm
logiciel d'acquisition et de traitement Chroma

Chromatographe en Phase Gazeuse couplé à un Spéctromètre de Masse Fisons Instruments VG ORGANIC équipé de :
colonne capillaire CP-SIL-88 de cyanopropyle hautement substitué, dont les caractéristiques sont les suivants :
phase stationnaire : Chrompack 50m
diamètre interne 0,22 mm
épaisseur de film 0,2 µm
détecteur à ionosation de flamme Fisons
évaporateur Fisons
logiciel d'aquisition et traitement Chroma

II. METHODES

II.1. Matériel biologique

Le microorganisme utilisé lors de ces travaux est la souche Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1, issue de la collection du Laboratoire de Microbiologie Générale et Agricole de l'Université Agronomique d'Athènes (U.A.A.). Le microorganisme est conservé à 4°C sur le milieu P.D.A. (gelose inclinée) et est repiqué tous les trois mois pour être maintenu dans un bon état physiologique.

La composition du milieu P.D.A. s'affiche ci-dessous.

Extrait de pomme de terre 4 g/l

Dextrose 20 g/l
Agar 15 g/l
(pH 5,6 ± 0,2)

Le microorganisme est dimorphique; il peut se développer sous forme filamenteuse (Photo 1), ou bien sous forme unicellulaire (Photo 2).



Photo 1
Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 sous forme filamenteuse.

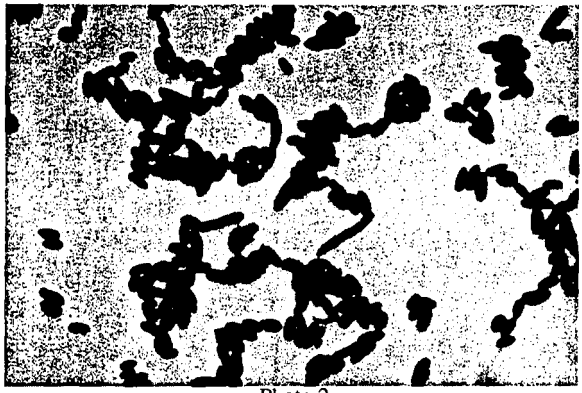


Photo 2
Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 sous forme unicellulaire.

II.2. Milieux de culture

II.2.1. Les sels

Les caractéristiques du milieu de base sont données par Gill et al., (1977). La composition du milieu en sels est la suivante (Tableau II. 1).

Tableau II. 1
Composition en sels du milieu de culture

Produits	Concentrations
KH_2PO_4	7,0 g/l
Na_2HPO_4	2,5 g/l
$MgSO_4x7H_2O$	1,5 g/l
$FeCl_3x6H_2O$	0,15 g/l
$CaCl_2x2H_2O$	0,15 g/l
$ZnSO_4x7H_2O$	0,02 g/l
$MnSO_4xH_2O$	0,06 g/l
pH après autoclavage égal à 6	

Afin de tamponner le milieu de culture employé à une valeur proche de 6, les sels KH_2PO_4 et Na_2HPO_4 sont utilisés à une concentration initiale de 12 g/l (dans ce cas le pH initial après autoclavage est aux alentours de 6,5).

II.2.2. La source carbonée et azotée

Comme il a été déjà cité, les sources de carbone utilisées lors de ces travaux sont les suivantes :

a) Glucose monohydraté

b) Glycérol pur

c) Glycérol technique

d) Stéarine

e) Huile de colza oléique, hydrolysée chimiquement.

Le glucose et le glycérol sont des produits purs. Par contre, le glycérol technique (pureté de 60-65% w/w) est le principal sous-produit industriel de la transestérification directe de l'huile de colza par le méthanol (production de carburants de type ester). Les sels de la transestérification constituent la partie majoritaire des impuretés (10-15% w/w), alors que le méthanol est présent dans un pourcentage de 2-5% (w/w). Ce qui reste est surtout de l'eau. Le prix du glycérol technique est variable de 1 à 4 FF par kg. Peu de souches peuvent pousser sur le glycérol technique, car ces sels présentent un effet inhibiteur très important.

La stéarine est un produit industriel, composé d'acides gras libres d'origine animale. Actuellement, ce produit est utilisé dans les savonneries ou comme lubrifiant et son prix, dépendant de la qualité de la stéarine, varie de 4,5 à 8 FF par kg. Lors de nos expériences, la stéarine utilisée valait presque 4,5 FF/kg. La production industrielle de stéarine est obtenue par une hydrolyse alcaline de la matière grasse; les acides gras libres sont séparés par décantation.

Les sources d'azote utilisées lors de ces travaux sont le sulfate d'ammonium $(NH4)2SO4$ et l'extrait de levure (7% w/w d'azote). Dans l'extrait de levure il y a, également, 12% w/w de carbone. L'estimation du rapport molaire C/N employé pendant les expériences tient compte de cette quantité d'azote et de carbone de l'extrait de levure.

Dans toutes les expériences où de la matière grasse constitue la seule source de carbone, 2 g/l d'extrait de levure sont utilisés. Le sulfate d'ammonium est, également, utilisé come source azotée (dans toutes les expériences le rapport initial matière grasse/sulfate d'ammonium est de 10/0,5 g/g, sauf s'il y a une indication différente dans le chapitre "résultats-discussion").

Quand les sources osidiques sont utilisées comme seul substrat carboné, 0,5 g/l d'extrait de levure et de sulfate d'ammonium sont utilisé comme source d'azote.

Dans le plupart des cas de la co-utilisation de stéarine avec des oses, la quantité d'extrait de levure et de sulfate d'ammonium est de 0,5 g/l.

II.2.3. Hydrolyse alcaline

Dans un becher placé sur un chauffe-ballon et surmonté d'une colonne à distiller refroidie par un circuit d'eau, 25 g de matière grasse (huile de colza oléique) sont saponifiés par 375 ml de KOH 2N dans l'éthanol 95% w/w pendant 3 h. Puis, est effectuée une acidification du milieu par 375 ml de HCl 4N. Les savons, en milieu acide sont transformés en acides gras libres, et sont extraits 3 fois par 250 ml d'hexane. La phase organique est récupérée, lavée par de l'eau pérmutée et sechée par du $Na2SO4$ anhydre, filtrée à travers d'un coton imbibé à l'hexane et mise dans un ballon permettant l'élimination du solvant par le biais du rotar-vapor.

II.2.4. Préparation des milieux

Si le milieu ne contient pas de matière grasse, les différents composants sont simplement dissous dans de l'eau osmosée. Par contre, si la matière grasse (stéarine ou huile de colza oléique hydrolysée) est présente en tant que substrat ou co-substrat, il est nécessaire de réaliser une émulsion de la matière grasse dans l'eau (émulsion o/w).

Afin de réaliser cette émulsion, tous les constituants sont placés dans un bécher dans les concentrations adéquates. L'ensemble est chauffé sous agitation jusqu'à une température d'environ 80°C. A ce stade, l'émulsion est créée en plaçant le mélange une dizaine de minutes à l'ultra-turrax. Deux émulsifiants ont été utilisés afin d'aider la dispersion de la matière grasse dans l'eau, le Tween 80 et le P.E.G. 20000 (10% w/w de chacun vis-à-vis de la matière grasse utilisée).

50 ml de ce milieu sont placés dans chacun des Erlenmeyers de 250 ml (expérience en discontinu en fioles). Ensuite, les fioles sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après la fin de l'autoclavage, on agite doucement les fioles afin de

resuspendre la matière grasse dans la phase aqueuse du milieu de culture, puisque l'émulsion est déstabilisée par l'effet de la température.

II.3. Conduite des cultures

II.3.1. Repiquage

Afin que les cellules soient dans un bon état physiologique pour l'expérience, Yarrowia lipolytica est repiquée 48 heures au préalable sur gélose inclinée et incubée à 28°C.

II.3.2. Préculture

Les précultures sont ensemencées à partir des tubes répiqués, avec l'appui d'un fil droit et ensuite sont placées sur la table d'agitation pendant 24 heures à 185 oscillations par minute à la température de 28°C. La préculture est réalisée sur un milieu de base de stéarine (concentration initiale de stéarine, sulfate d'ammonium et extrait de levure 10, 0,5 et 2 g/l respectivement) pour toutes les fermentations où la matière grasse est présente comme substrat (ou co-substrat). Par ailleurs, pour les fermentations des sucres, la préculture, en général, est réalisée sur le milieu correspondant à celui de la fermentation; ainsi, pour les cinétiques sur glucose, la préculture est constituée en glucose (concentration initiale de glucose, sulfate d'ammonium et extrait de levure 30, 0,5 et 0,5 g/l respéctivement). Pour les cultures en glycérol ou en mélanges glycérol technique/glucose la préculture est constituée en glycérol industriel (concentration initiale de glycérol, sulfate d'ammonium et extrait de levure 30, 0,5 et 0,5 g/l respectivement).

II.3.3. Cultures

Chacun des flacons est ensemencé de façon stérile avec 1 ml de préculture. Tous les erlenmeyers sont ensuite placés sur une table d'agitation (185 osc/min.). Une fiole est prélevé à chacun des temps définis de façon à suivre l'évolution de la biomasse, des métabolites, des lipides intracellulaires et du substrat.

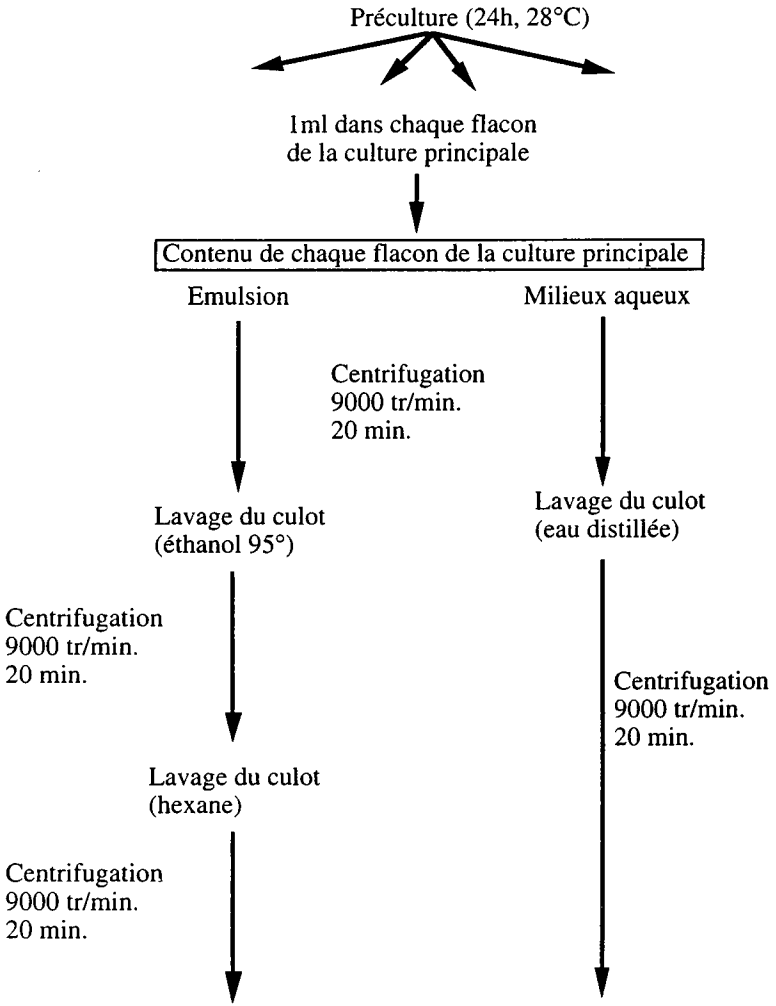
Une coloration de Gram est effectuée sur toutes les cultures pour détecter une éventuelle contamination.

II.4. Détermination de la matière sèche

La première étape consiste à séparer la biomasse des substrats résiduels. Pour celà, plusieurs lavages sont réalisés (Montet et al., 1985). Si le milieu ne contient pas de matière grasse, un lavage à l'eau osmosée suffit pour récupérer le glucose et/ou le glycérol résiduel. Si la stéarine a été utilisée, en tant que substrat ou co-substrat, un lavage à l'éthanol suivi d'un lavage à l'hexane est nécessaire. Entre chacun des lavages, l'ensemble est centrifugé pendant 20 minutes à 9000 rpm. Le surnageant est récupéré et permettra de doser la stéarine résiduelle par le biais d'extractions liquide/liquide. Le culot,

formé par la biomasse totale, est récupéré et placé dans un flacon taré à l'étuve à 80°C pendant 14 à 18 heures.

Les différentes étapes de la fermentation et la détermination de la matière sèche, figurent ci-dessous.



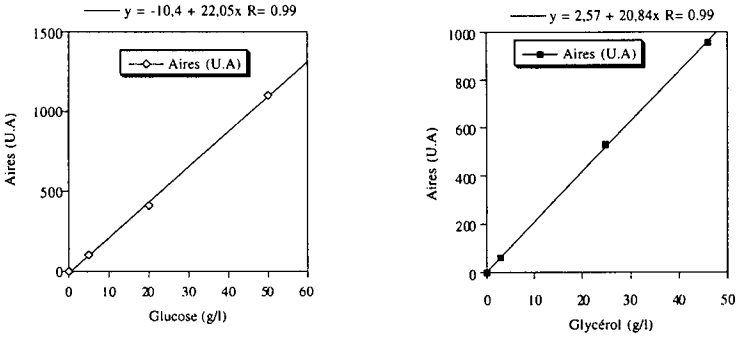
II. 5. Mesure des substrats résiduels

II.5.1. Glucose et glycérol

De façon à doser le glucose et le glycérol résiduels, un prélèvement de 2 ml est réalisé directement à partir du milieu de culture. Il est filtré à l'aide d'un filtre de seuil de coupure de 0.20 µm. Les deux substrats sont dosés par C.L.H.P. grâce au réfractomètre différentiel. Les caractéristiques de l'analyse sont les suivantes :

éluant H_2SO_4 0,04N
débit 0,7 ml/min
température 65°C
colonne Polypore H 25cm x 7mm
injection 10 µl
durée d'analyse 12 min.

Les courbes étalons du glucose et du glycérol sont tracées au préalable (Figure II. 1a, 1b).



1a 1b

Figure II. 1
Courbe d'étalonnage du glucose (1a) et du glycérol (1b) - détérmination par C.L.H.P..

L'étalonnage a été effectué en utilisant le glucose ou le glycérol pur. Les limites de linéarité pour le glucose sont à 120 g/l alors que pour la glycérol sont à 100 g/l.

II.5.2. Lipides résiduels

Afin de doser la matière grasse qui n'a pas été assimilée par la souche, une étape d'extraction liquide/liquide suivie d'une évaporation du solvant et d'une pesée, est nécessaire. Plusieures combinaisons des solvants ont été testées pour pouvoir doser la matière grasse. Pour ceci, des émulsions de concentrations connues en stéarine ont été

élaborées de façon idéntique aux cultures. Le résultat du choix des solvants pour l'extraction, se trouve dans les tableaux suivants.

Tableau II. 2
Choix du solvant pour le dosage de la stéarine - extraction triple avec de l'hexane ou de l'éther du pétrole comme solvant.

Concentration réelle (g/l)	Concentration trouvée (g/l)
4	3,6 ± 0,2
5	4,4 ± 0,5
8	6,8 ± 0,2
10	7,7 ± 0,1
14	9,2 ± 0,3
15	10,4 ± 0,5

Tableau II. 3
Choix du solvant pour le dosage de la stéarine - extraction triple avec du chloroforme comme solvant.

Concentration réelle (g/l)	Concentration trouvée (g/l)
4	4,6 ± 0,2
10	10,6 ± 0,4
14	14,3 ± 0,3

Tableau II. 4
Choix du solvant pour le dosage de la stéarine - extraction double avec de l'éther du pétrole et du chloroforme comme solvants.

Concentration réelle (g/l)	Concentration trouvée (g/l)
5	5,1 ± 0,3
7,5	7,7 ± 0,2
10	10,4 ± 0,3
13	13,4 ± 0,5
14	13,8 ± 0,3

Dans le cas de l'extraction triple avec l'hexane ou l'éther du pétrole comme solvant, nous avons utilisé deux protocoles différents : acidification du milieu réactionnel avec HCl 4N avant l'extraction, ou extraction telle quelle. Le résultat était presque le même dans les deux cas (Tableau II. 2). Dans les autres cas, nous n'avons pas procédé à une acidification du milieu.

Afin de doser la matière grasse extracellulaire on a utilisé la combinaison éther du pétrole/chloroforme. La stéarine est dosée à partir du surnageant récupéré à l'issu des trois centrifugations effectuées (voir détermination de la matière sèche).

Nous procédons de la même façon pour les deux extractions.

Le surnageant, issu des trois centrifugations, est placé dans une ampoule à décanter avec 30 ml d'éther du pétrole. L'ensemble est vigoureusement agité et nous laissons décanter une dizaine de minutes. La phase aqueuse, plus dense, est récupérée en premier et conservée pour la deuxième extraction.

La phase organique est placée dans un bécher avec du sulfate de sodium anhydre de façon à éliminer les traces d'eau éventuelles. Puis, cette phase est filtrée à l'aide du coton cardé imbibé à l'éther du pétrole, placée dans un ballon préalablement taré et évaporée au rotavapor. La matière grasse obtenue est conservée et la phase chloroformique issue de la seconde extraction y est ajoutée.

Cette deuxième extraction est réalisée de façon identique avec 30 ml de chloroforme. La phase chloroformique, plus dense que la phase aqueuse, se trouve cette fois-ci en dessous. Le solvant est évaporé au rotavapor et la matière grasse résultante est pesée.

Nous déterminons, ainsi, la quantité de la matière grasse non assimilée par le microorganisme.

II.5.3. Ions d'ammonium

Afin de doser les ions d'ammonium du milieu extracellulaire, une sonde "orion 95-12" qui mesure la différence entre une solution connue (solution interne) et l'echantillon, par diffusion gazeuse, est utilisée. Avec de la soude (0.2N) on atteint un pH>11. A ce pH les ions se trouvent sous forme de NH_3. L'ammoniaque gazeux diffuse à travers d'une membrane interne. Dans la solution de remplissage, la valeur de pH est plus basse, c'est pourquoi l'ammoniaque réagit avec de l'eau en donnant naissance à des ions OH^-. Par cette formation, la valeur de pH de la solution augmente et la variation correspond précisément au changement de la pression gazeuse.

Pour procéder à la mesure il faut préparer des solutions connues pour la gamme d'étalonnage. Dans trois ml de solution (étalon ou inconnu) nous ajoutons 3 ml de NaOH (0.2N). L'ensemble est agité vigoureusement dans un récipient en verre à double enveloppe (température à 20°C). Une courbe d'étalonnage est présentée Figure II. 2.

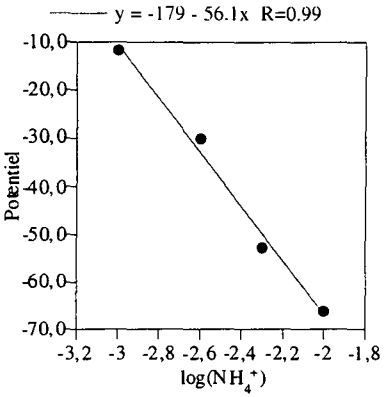


Figure II. 2
Courbe d'étalonnage des ions d'ammonium.

II.5.4. Azote total exta-cellulaire

Afin de doser l'azote total extracellulaire du milieu de la fermentation, la méthode de Kjeldahl est utilisée. Lors de cette méthode, dans un premier temps on procède à la minéralisaton de l'azote de l'échantillon de la façon suivante : dans un matras sont introduits successivement 100-300 µl de la substance à analyser, 3-4 g du catalyseur de minéralisation, 1 ml d'acide sulfurique concentré et 1 ml d'eau oxygenée. Ensuite, les matras sont placés à 400°C pendant 3h de façon que tout l'azote existant dans l'échantillon devienne inorganique. Après refroidissement, chaque matras est passé par l'appareil de dosage (dosage effectué par titration avec l'acide sulfurique N/100).

La formule utilisée afin d'en déduire la quantité d'azote total de l'échantillon inconnu (g d'azote par l de milieu de culture) est la suivante :

taux d'azote (g N/l) = $(V-V_0)$. Normalité . 14 / E

V : volume d'acide sulfurique nécessaire à la titration de l'échantillon inconnu (ml)

V_0 : volume d'acide sulfurique nécessaire à la titration du blanc (ml)

Normalité : titre de la solution d'acide sulfurique (dans ce cas 1/100)

E : prise d'échantillon (ml)

II.6. Mesure des produits métaboliques

II.6.1. Lipides cellulaires

La méthode de Folch et al., (1957), modifiée par Aggelis et al., (1995a) est utilisée afin d'extraire les lipides cellulaires. La biomasse totale est récupérée à l'issu du séchage à l'étuve. Après avoir été pesée, une dizaine de millilitres du solvant Folch

(chloroforme/méthanol 2:1 Folch et al., 1957) sont ajoutés à la matière sèche. Les flacons sont hermétiquement refermés et placés 15 minutes dans un bain à ultrasons de fréquence 15 MHz. Cette étape est destinée à aider la libération des lipides intracellulaires.

Le mélange est alors filtré à l'aide de papier Whatman n°3 et récupéré dans un ballon taré. Le solvant est évaporé au Rotavapor et les lipides obtenus sont pesés.

Il est évident que le mélange chloroforme-méthanol 2:1 procède à une extraction des lipides cellulaires totaux du microorganisme et ne permet pas de distinguer des phospholipides, triglycérides, acides gras libres etc.

II.6.2. Acides organiques

Le dosage des acides organiques est suivi à l'aide de la C.L.H.P. en même temps que celui des sucres, mais la détection des acides organiques se réalise par le spectrophotomètre à U.V. (λ_{max}481). De courbes étalons des acides organiques sont tracées au préalable. La réponse est linéaire de 0 à 50 g/l pour les acides citrique et acétique et de 0 à 15 g/l pour les acides α-cétoglutarique et succinique. Une courbe étalon pour l'acide citrique est présentée Figure II. 3.

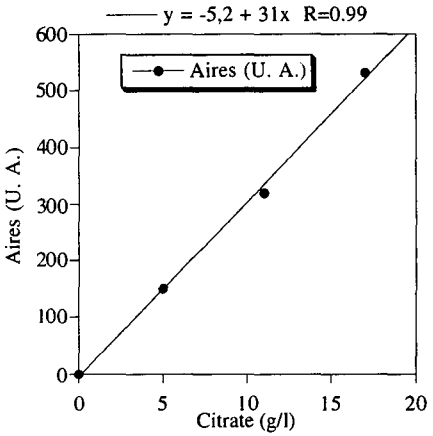


Figure II. 3
Courbe d'étalonnage du citrate - détérmination par C.L.H.P..

Les caractéristiques de l'analyse sont les mêmes que celles de l'analyse du glucose et du glycérol.

II.6.3. Acide iso-citrique

Afin de procéder à l'analyse de l'acide iso-citrique (séparation non très satisfaisante par C.L.H.P.), une méthode enzymatique est utilisée. Elle est basée sur la

transformation de l'acide iso-citrique en acide α-cétoglutarique par la présence de l'isocitrate deshydrogénase et du NADP. La réaction de la transformation est la suivante :

Iso-citrate + $NADP^+$ ⟶ α- cétoglutarate + NADPH + CO_2 + H^+

La quantité du NADPH formé au cours de la réaction enzymatique, est proportionelle à celle de l'iso-citrate de l'échantillon inconnu.

Dans une cuvette de verre sont introduits successivement 320 µl de tampon Tris (préparation : 2,24 g de Trizma BASE et 35 mg d'E.D.T.A. dans 100 ml d'eau distillée, pH final de 7,4), 32 µl de NADP (préparation : 50 mg de NADP dans 5 ml d'eau distillée), 32 µl d'échantillon inconnu (concentration d'iso-citrate inférieure de 1 g/l) et 608 µl d'eau distillée. La réaction est déclenché en mettant 8 µl d'iso-citrate déshydrogénase (4,2 mg/ml). La quantité du NADPH formé sera déterminée par l'absorption à 340 nm.

La formule utilisée afin de déterminer la concentration d'iso-citrate dans l'échantillon inconnu (mg/ml) est la suivante :

$C = (V \cdot PM \cdot \Delta E) / (\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000)$

V : volume final du test se trouvant dans la cuvette (ml) (dans le cas présent 1)

PM : Poids moléculaire de l'acide iso-citrique (192.1 g/mole)

v : volume de l'échantillon de culture mis dans le test (ml) (dans le cas présent 0.032)

d : épaisseur de la cuvette (1 cm)

ε : coefficient d'extinction du NADPH (6.22 cm^2 / µmole pour 340 nm)

ΔE : différence de l'extinction avant de mettre l'enzyme et après son action.

II.7. Analyse de la matière grasse

II.7.1. Composition en acides gras (C.P.G.)

Les lipides cellulaires ou non assimilés sont méthylestérifiés pour pouvoir être analysés par Chromatographie en Phase Gazeuse. De cette façon nous pouvons suivre le profil en acides gras des lipides intracellulaires, accumulés au cours du temps, ou le profil de la matière grasse qui n'a pas été assililée par la souche.

Le protocole de la méthylestérification est défini par A.F.NOR. (1984) et comprend deux étapes. Chacune des étapes est réalisée avec un réactif spécifique :

- l'étape basique utilise le sodium méthylique comme milieu et réactif.
- l'étape acide se sert du méthanol chlorhydrique comme milieu et réactif.

Préparation des solvants

Méthylate de sodium

pour 100 ml de solvant : 70 ml de méthanol
30 ml de benzène
1 g de sodium métallique

Les deux solvants sont ajoutés dans un bécher sous la hotte aspirante. Au mélange vivement agité est ajouté le sodium métallique. L'agitation est poursuivie jusqu'à dissolution complète du sodium. La réaction est exothermique. Une fois terminée, quelques milligrammes de phénolphtaléine sont ajoutées. Le virage de l'indicateur coloré du rose à l'incolore indiquera le passage du pH basique au pH acide entre les deux étapes de la réaction.

Méthanol chlorhydrique :

pour 135 ml de solvant : 125 ml de méthanol
10 ml d'e chlorure d'acétyle

Le méthanol est placé sous la hotte dans un bécher et sous agitation magnétique. L'acétylchloride est ajouté goutte à goutte par l'intermédiaire d'une burette munie d'un robinet.

Méthylestérification

Le montage, dans lequel s'effectuera la réaction, est placé sous la hotte. Il est composé d'un ballon placé dans un chauffe-ballon et surmonté d'une colonne à distiller refroidie par une circulation d'eau.

Les lipides recueillis sont placés dans le ballon avec le sodium chlorhydrique. Pour une quantité de matière grasse inférieure ou égale à 0,1 g, 10 ml du premier solvant sont nécessaires. On ajoute 2 ou 3 pierres ponces.

Le tout est porté à ébullition sous le reflux pendant 15 minutes.

A l'issu du quart d'heure, le second solvant est ajouté jusqu'au virage de la phénolphtaléine. En général, une dizaine de millilitres suffisent. Le nouveau mélange réactionnel est porté à ébullition sous le reflux pendant 15 minutes également.

A la fin, la réaction est stoppée par quelques millilitres d'eau osmosée.

Analyse des esters méthyliques

Le milieu réactionnel est versé tel quel dans une ampoule à décanter avec 5 ml d'hexane (ou d'éther de pétrole). L'ensemble est agité et laissé à décanter pendant une quinzaine de minutes. La phase organique récupérée, contient les esters méthyliques. Ceux-ci seront analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Cette dernière est réalisée sur une colonne capillaire COT de 30 m en silice fondue en phase stationnaire : Carbowax 30mx0.32mm, 0,25 µm. On injecte 1 µl de la solution d'esters méthyliques à l'aide d'une microseringue.

Les caractéristiques d'une telle analyse sont les suivantes :

débit du gaz vecteur 26 ml/min
température de l'injecteur 250°C
température du détecteur à ionisation de flamme (F.I.D.) 300°C

programme de températures 120-240 selon un gradient de 10°C/min

Pour identifier les acides gras, des étalons de composition connue sont passés avant toute nouvelle analyse. Ces étalons sont préparés avec les quatre esters d'acides gras les plus fréquemment rencontrés :

- le palmitate de méthyl
- le stéarate de méthyl
- l'oléate de méthyl
- le linoléate de méthyl.

Chaque ester est caractérisé par un pic à un temps de rétention donné. Celui-ci dépend de la longueur de la chaîne carbonée. Ils sont donnés dans le Tableau II. 5.

Tableau II. 5
Temps de rétention des principaux esters méthyliques.

Ester méthylique	Temps de rétention (min)
Palmitate de méthyl	10,95
Stéarate de méthyl	13,03
Oléate de méthyl	13,30
Linoléate de méthyl	13,95

L'identification complète des esters méthyliques a été effectuée par l'intermédiaire de la Chromatographe en Phase Gazeuse couplé à un Spéctromètre de Masse. Les caractéristiques de cette analyse sont les suivantes :

colonne capillaire CP-SIL-88 50mx0.22mm, 0,2 µm
température de la colonne 180°C
température de rétecteur 200°C
température de l'évaporateur 230°C
70 eV

II.7.2. Analyse qualitative des lipides par la chromatographie en couche mince (C.C.M.)

La matière grasse, qu'il s'agisse des lipides extra- ou intracellulaires, peut être analysée par la chromatorgaphie en couche mince. En ce qui concerne le substrat extracellulaire, par le biais de cette méthode nous pouvons vérifier l'efficacité des lavages effectués. Concernant les lipides intracellulaires, à part l'analyse totale des acides gras (qui nous montre le profil général des acides gras des lipides) il est intéressant de connaître de différencier les classes lipidiques qui les contiennent (phospholipides, triglycérides, acides gras libres...). Pour cela, une analyse des lipides s'effectue par la chromatographie en couche mince; une microquantité des lipides (quelques mg) dissoute dans le réactif Folch est déposée sur une plaque d'aluminium en gel de silice 60G. Le mélange des solvants utilisé pour la migration de la matière grasse, est de l'éther du

pétrole (70), de l'éther diéthylique (30) et de l'acide acétique (1) (v/v). La visualisation des fractions lipidiques est réalisée soit à l'étuve d'iode, soit après pulvérisation avec le réactif d'acétate de cuivre (acétate de cuivre/acide phosphorique 1/1 v/v) suivi de carbinisation de la plaque (180°C-10 min). De produits purs (p.e. tristéarine, acide palmitique, di-palmitine, cholestérol....) sont les références pour les différentes classes lipidiques des lipides intacellulaires.

II.7.3. Détermination quantitative des triglycérides et des acides gras libres des lipides cellulaires

Une quantité connue des lipides cellulaires est dissoute dans le mélange Folch (chloroforme/méthanol 2/1) et ensuite est déposée avec attention sur une plaque d'aluminium en gel de silice 60G. La plaque est posée dans l'étuve de migration, afin que les classes lipidiques soient séparées, et à la fin de la migration sont récupérées en grattant (dans des ballons différents), les bandes qui correspondent aux triglycérides et aux acides gras libres. Dans chaque ballon une quantité connue d'acide heptadécanoïque utilisé comme étalon interne est ajoutée. Ensuite, nous procédons à la méthylation de la bande et nous l'analysons par la C.P.G..

II.8. Exploitation cinétique des résultats

Toutes les fermentations sont effectuées en mode discontinu en fioles Erlenmeyer (250 ml). Les différentes analyses qui ont lieu, permettent le suivi de l'évolution au cours du temps du pH et des concentrations des composants dans le milieu de culture. Ainsi, en général, on observe une évolution de biomasse totale, de lipides extracellulaires, de lipides cellulaires, d'acides organiques, de glucose et de glycérol en fonction du temps. A partir des ces données brutes, il est possible de calculer les diverses vitesses spécifiques pour les fermentation en discontinu.

La vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{max}) peut être déterminée en traçant la courbe $Ln(X/X_0)$ en fonction du temps (t) pour les premiers étapes de la fermentation. La pente de la droite correspond à cette vitesse spécifique.

Si les vitesses d'utilisation d'un substrat et de formation d'un produit (exprimées en g/l.h) sont notées respectivement $r_{Substrat}'''$ et $r_{Produit}'''$, les vitesse spécifiques sont données par les expressions suinantes :

vitesse spécifique de consommation du substrat $\nu = r_{Substrat}'''$ /X. Il suffit de diviser la quantité ΔSubstrat/Δt par la biomasse correspondante.

vitesse spécifique de production des métabolites $\pi = r_{Produit}'''$ /X. Il suffit de diviser la quantité $\Delta P/\Delta t$ par la biomasse qui correspond.

Les rendements globaux ($Y_{X/Substrat}$ ou $Y_{P/Substrat}$) sont définis comme les rapports de la biomasse totale (poids des cellules sèches) (X) ou des métabolites formés (P) par la masse de substrat carboné consommé depuis le début de la fermentation. Ainsi :

$Y_{X/Substrat} = X\text{-}X_0/Substrat_0\text{-}Substrat$

$Y_{P/Substrat} = P\text{-}P_0/Substrat_0\text{-}Substrat$

où X_0, P_0 et $Substrat_0$ sont les concentrations initiales en biomasse, en produit et en substrat définies au départ de la culture.

Le pourcentage des lipides cellulaires par rapport à la matière sèche est répresenté par le coefficient global $K_{L/X}$ (rapport des lipides L sur la biomasse totale X - g des lipides cellulaires par g de biomasse totale).

Quand les réserves lipidiques sont consommées en faveur de la biomasse exempte de lipides (X_f), la création de biomasse est accompagnée d'un rendement global $Y_{Xf/L}$ calculé par la formule suivante : $X_{ff}\text{-}X_{f0} / L_{max}\text{-}L_f$ (g de biomasse exempte de lipides formée par g de lipides cellulaires consommés, X_{f0} est la biomasse exempte de lipides quand les lipides cellulaires présentent leur concentration maximale).

Chapitre 3

RESULTATS - DISCUSSION

I. CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR LA STEARINE : PRODUCTION ELEVEE DE LIPIDES CELLULAIRES

Dans un premier temps, nous voulons observer les potentialités biochimiques de la souche sur un milieu contenant, comme seul substrat carboné, une matière grasse industrielle, la stéarine. Ce substrat est constitué d'acides gras libres saturés (principalement du stéarate et du palmitate). Lors de cette étude, nous nous intéressons à l'évolution cinétique de la biomasse, du substrat lipidique et des lipides intracellulaires, sous conditions opératoires variables. De cette façon, des cinétiques sont suivies pour des valeurs variées de pH initial du milieu de culture, de concentration de la source azotée, de température d'incubation ainsi que de concentration de la stéarine. De plus, les paramètres cinétiques (rendement cellulaire, pourcentage des lipides accumulés par rapport à la matière sèche, vitesse spécifique de croissance, vitesse spécifique de formation des lipides...) sont estimés et commentés.

I.1. Introduction

Single cell oils (S.C.O.) have been considered as lipids with potential industrial interest (Ratledge, 1987; 1992; Aggelis et al., 1991). Although they can not be competed to plant or animal fats because of their higher production cost, there is a great interest concerning S.C.O. production due to their specific structure and composition (Ratledge, 1987; Davies and Holdsworth, 1992). Numerous oleaginous microorganisms have been used in order to produce lipids rich in polyunsaturated fatty acids, such as γ-linolenic (Aggelis et al., 1987; 1988; 1990), dihomo-γ-linolenic (Shimizu et al., 1989), arachidonic (Totani and Oba, 1988) or eicosapentanoic acid (Bajpai et al., 1992). Furthermore, the production of equivalents of lipids with special structure, such as cocoa butter, has been already attempted (Davies et al., 1990; Ykema et al., 1989; 1990) and scaled up (Davies and Holdsworth, 1992; Davies, 1992).

Sugars (Boulton and Ratledge, 1980; Davies and Holdsworth, 1992; Aggelis et al., 1996), vegetable oils (Aggelis et al., 1995a; b; Aggelis and Sourdis, 1997), alkanes (Thorpe and Ratledge, 1972; Ratledge, 1984), ethanol (Emelyanova, 1997), glycerol (Meesters et al., 1996a; b), citric acid (Aggelis, 1996) or acetic acid (du Preez et al., 1997) have been used as substrates to produce S.C.O.. Animal fat and tallow, available in large quantities from the meat industry, are underused nowadays, due to their replacement by vegetable oils. Few investigations, though, using this low value-added material or its derivatives as carbon source, have been recently carried out in the microbial bio-conversion field (e. g. production of sophorolipid biosurfactants by Candida bombicola - Desphande and Daniels, 1995).

This paper is a preliminary part of a work aiming to the production of a microbial substitute of characteristic lipids, like cocoa-butter for instance. The objective of the present study is to investigate lipid accumulation of Yarrowia lipolytica growing on an inexpensive industrial fat based on free fatty acids of animal origin, called "stearin". The influence of the initial pH value, the extracellular nitrogen availability, the initial stearin concentration, as well as the incubation temperature on cell growth and lipid accumulation are studied and discussed.

I.2. Results

I.2.1. Effect of the initial pH value

The influence of the initial pH value on cell growth and lipid accumulation of Y. lipolytica is studied in media containing initial stearin and ammonium sulfate concentrations 10 and 5 g/l respectively. The medium pH is adjusted at 5.5, 6 and 6.5, and the temperature is 28°C. Biomass and cellular lipid production are measured during all growth phases. The obtained results (maximum lipid concentration L_{max}, average

specific lipid production π_{Lx}, corresponding biomass X, substrate S, percentage of lipids in dry matter $K_{L/X}$ and growth yield $Y_{X/S}$) are summarized in Table I. 1.

Table I. 1
Biomass and cellular lipid production at different initial pH values by Y. lipolytica. Culture conditions: stearin 10 g/l, ammonium sulfate 5 g/l, incubation temperature 28°C.

pH_0	pH_f	X (g/l)	L_{max} (g/l)	S_f (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$K_{L/X}$ (g/g)	π_{Lx} (mg/g.h)
5.5	5.1	6.4	1.2	2.7	0.88	0.19	2.60
6.0	5.4	9.5	2.7	1.5	1.12	0.28	2.93
6.5	6.1	8.0	1.6	1.7	0.96	0.20	2.06

A substantial cell growth is observed for pH_0 6 and 6.5 (9.5 and 8 g/l respectively) whereas it is lower for the pH_0 5.5 (6.4 g/l). The process of lipid accumulation is favoured only for the initial medium pH 6; in this case, the accumulated fat concentration is 2.7 g/l ($K_{L/X}$ 0.28 g/g). In addition, the obtained growth yield $Y_{X/S}$ is exceptional (1.12 g/g). At initial pH values 6.5 and 5.5, the maximum coefficient $K_{L/X}$ is only 0.20 and 0.19 g/g, whereas lower global yields $Y_{X/S}$ (0.96 and 0.87 g/g respectively) are observed. The uncontrolled pH presents a little drop in all cases. When the maximum cellular lipid concentration is obtained, 1.5-2.5 g/l of stearin remains unconsumed into the culture medium. A pH_0 6 is chosen for all following experiments.

I.2.2. Effect of the ammonium sulfate concentration

The effect of the extracellular nitrogen availability on cell growth and lipid accumulation is studied in media containing a constant stearin concentration (10 g/l) and variable initial ammonium sulfate concentrations (from 0 to 6 g/l). The initial pH is adjusted at 6 and the temperature is 28°C. The obtained results are presented in Table I. 2.

Table I. 2
Biomass and lipid accumulation by Y. lipolytica at different $(NH_4)_2SO_4$ concentrations. Culture conditions: stearin (10 g/l), pH_0 6, incubation temperature 28°C.

$(NH_4)_2SO_4$ (g/l)	X (g/l)	L_{max} (g/l)	S_f (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$K_{L/X}$ (g/g)	π_{Lx} (mg/g.h)
0	7.9	2.3	3.5	1.21	0.29	4.46
0.25	7.1	2.6	3.5	1.09	0.37	3.43
0.5	8.7	3.8	1.0	0.97	0.44	6.98
1	7.6	2.9	2.8	1.06	0.38	5.42
2	8.0	2.6	2.8	1.11	0.33	4.78
4	8.8	2.8	3.5	1.35	0.32	4.63
5	9.5	2.7	1.5	1.12	0.28	2.88
6	8.9	2.2	2.8	1.24	0.25	3.62

In all of the runs, high cell growth is observed. Even in the case of initial ammonium sulfate concentration 0 g/l, the microorganism grows and accumulates significant fat quantities. In this case, it seems that the microorganism covers its nitrogen needs by the yeast extract added in a concentration 2 g/l.

No correlation between extracellular nitrogen concentration and X and $Y_{X/S}$ values can be established, whereas, in all cases, relatively high lipid amounts are accumulated inside the yeast cells (L_{max} between 2.2 and 3.8 g/l, $K_{L/X}$ between 0.25 and 0.44 g/g). However, it can be observed that the process of intracellular lipid accumulation is favoured for the intermediate operating conditions (e. g. 10 g/l stearin-0.5 g/l ammonium sulfate, initial molar C/N ratio about 35); except for 0 and 0.25 g/l initial ammonium sulfate cases, the coefficient $K_{L/X}$ is inversely correlated with the extracellular nitrogen availability of the culture medium. In the following steps, all other experiments will be realized in substrates containing the stearin/ammonium sulfate ratio 10/0.5 g/g.

For almost all runs, Y. lipolytica consumes its accumulated fats during the stationary growth phase, which appears around 65±15 hours after inoculation. A representative example, with the two extreme ammonium sulfate concentrations (e. g. 0 and 6 g/l), is presented in Figures I. 1 a and b.

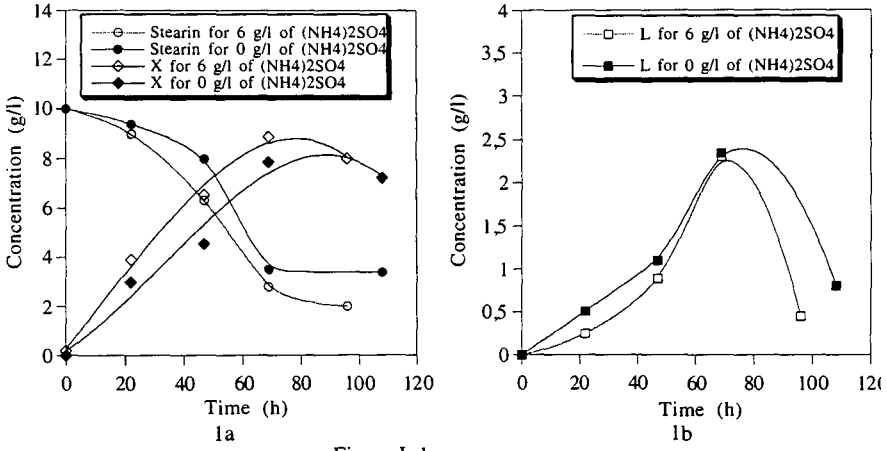


Figure I. 1
Biomass, substrate (1a) and cellular lipid (1b) evolution of Y. lipolytica for initial ammonium sulfate concentration 0 g/l (filled squares and circles) and 6 g/l (open squares and circles). Culture conditions: stearin 10 g/l, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

An effective cell growth and a simultaneous lipid accumulation are observed in both cases. Nearly 70 hours after inoculation, the microorganism reaches the stationary growth phase, although relatively high amounts of the extracellular lipid substrate remain unconsumed. During this period, a fast degradation of cellular accumulated fats is observed.

I.2.3. Effect of the incubation temperature

Five different runs are carried out at 19°C, 24°C, 28°C, 33°C and 39°C, the main characteristics of which are summarized in Table I. 3.

Table I. 3
Biomass and cellular lipid production by Y. lipolytica at different temperatures of incubation. Culture conditions: stearin (10 g/l), pH_0 6, ammonium sulfate 0.5 g/l.

T (°C)	X (g/l)	L_{max} (g/l)	S_f (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$K_{L/X}$ (g/g)	π_{Lx} (mg/g.h)
19	3.9	0.43	5.7	0.91	0.11	1.51
24	7.5	1.7	3.3	1.12	0.22	2.31
28	8.7	3.8	1.0	0.97	0.44	6.98
33	8.0	2.8	3.4	1.21	0.35	3.43
39	1.0	0.08	9.2	1.25	0.10	1.88

The extreme incubation temperatures (19 and 39°C), do not allow a satisfactory cell growth; at 19°C the maximum cell growth observed is about 4 g/l with 5.7 g/l of stearin remaining unconsumed. At 39°C, negligible cell growth and extracellular fat incorporation are observed. On the opposite, significant cell growth is obtained at 24°C, 28°C and 33°C; the maximum biomass concentration observed is 7.5-8.7 g/l, with high simultaneous global growth yields $Y_{X/S}$ obtained (about 1 g/g or higher). In this range of temperature, the maximum specific growth rate (μ_{max}) of Y. lipolytica is contained between 0.25 and 0.28 h^{-1}.

The process of lipid accumulation is not favoured for the incubation temperature of 24°C (L_{max} 1.7 $g.l^{-1}$, $K_{L/X}$ 0.22 $g.g^{-1}$). In contrast, relatively high lipid amounts are accumulated inside the yeast cells at 33°C (L_{max} 2.8 $g.l^{-1}$, $K_{L/X}$ 0.35 $g.g^{-1}$) and mainly at 28°C (L_{max} 3.8 $g.l^{-1}$, $K_{L/X}$ 0.44 $g.g^{-1}$). The more promising incubation temperature of 28°C, will be used for each new run realized.

I.2.4. Effect of the initial stearin concentration

The influence of the initial stearin concentration (4, 10, 14, 16 and 20 g/l) on cell growth and fat accumulation by Y.lipolytica is studied, when a constant stearin/ammonium sulfate ratio 20 g/g is employed. The main characteristics of every run are summarized in Table I. 4.

Table I. 4
Biomass and cellular lipid production by Y. lipolytica at different stearin concentrations. Culture conditions: stearin/ammonium sulfate 20 g/g, pH_0 6, incubation temperature 28°C.

S_0 (g/l)	X (g/l)	L_{max} (g/l)	S_f (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$K_{L/X}$ (g/g)	π_{Lx} (mg/g.h)
4	3.9	1.0	0.2	1.03	0.25	3.67
10	8.7	3.8	1.0	0.97	0.44	6.98
14	11.3	5.7	3.2	1.04	0.50	7.35
16	9.5	4.1	6.6	1.01	0.43	6.82
20	10.2	5.0	8.9	0.92	0.49	6.91

High cell growth is observed when the initial stearin concentration is 4 g/l, but the process of lipid accumulation is not favoured ($K_{L/X}$ 0.25 g/g). In all other cases, the yeast accumulates significant fat amounts (L_{max} between 3.8-5.7 g/l, $K_{L/Xmax}$ 0.43-0.50 g/g). The stearin, used at relatively increased initial concentrations (more than 10 g/l), constitutes an adequate substrate for cell growth and intracellular lipid accumulation of Y. lipolytica.

I.2.5. Cellular lipid accumulation and degradation

The obtained results in almost all of the experiments, show the same kinetic characteristics; in the first growth step (0-50h after inoculation), a high extracellular lipid uptake is accompanied by significant cell growth and lipid accumulation. A stationary growth phase is reached at the time contained between 50 and 70h, even though relatively increased amounts of the lipid substrate remain unconsumed, leading to a rapid consumption of the cellular accumulated lipids.

One of the more representative cases is presented in Figure I. 2 (kinetics of X, X_f, L, S and ammonium, initial stearin concentration 16 g/l).

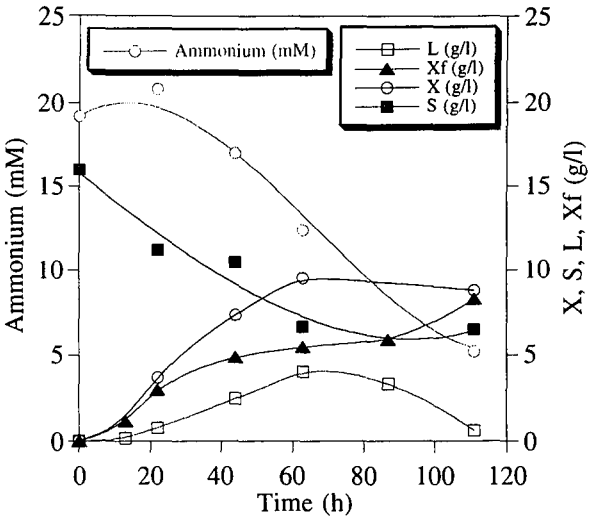


Figure I. 2
Kinetics of biomass (X), stearin (S), cellular lipids (L), fat-free biomass (X_f) (g/l) and ammoniac ions (mM) of Y. lipolytica. Culture conditions: initial stearin 16 g/l, stearin/ammonium sulfate 20 g/g, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

In this example, a large quantity of lipids is accumulated inside the yeast cells (L_{max} 4.1 g/l - $K_{L/X}$ 0.43 g/g), while a rapid degradation of these cellular lipids, accompanied by a significant increase of the fat-free biomass concentrationion, is realized at the stationary growth phase. This fact probably means that the degradation of the accumulated fats occurs while the synthesis of proteins and nucleic acids is still in progress. The observed yield $Y_{Xf/L}$ is about 0.6-0.8 g/g (during all other cultures similar values have been observed) . We will note, too, that the culture medium, seems not to be depleted by nitrogen, as more than 5 mM of ammonium are found at the end of the fermentation (initial concentration 19 mM).

In order to explain the stationary growth phase coming, accompanied by a limitation of the extracellular fat incorporation and a rapid disappearance of the cellular lipids, a pulse either of concentrated yeast extract or of salts is carried out. The pulse is realized at time 72 hours (experiment with initial stearin concentration 15 g/l) when the

concentration of total biomass, accumulated fats and extracellular unconsumed lipidic substrate are 12.5, 6.8 and 4.5 g/l respectively ($K_{L/X}$ 0.54 g/g) (Figure I. 3).

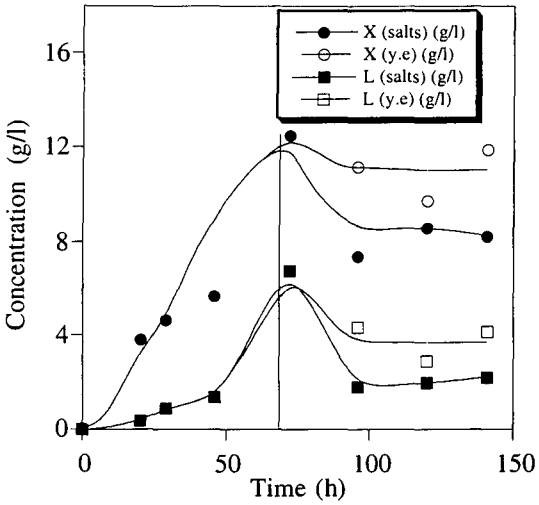


Figure I. 3
Kinetics of biomass (X) and cellular lipids (L). Pulse of concentrated salts (filled squares and circles) or of concentrated yeast extract (open squares and circles) realized at 72h. Culture conditions: initial stearin 15 g/l, stearin/ammonium sulfate 20 g/g, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

In both cases the stationary growth phase is reached with a limitation of stearin consumption and a simultaneous cellular lipid uptake, showing that this phenomenon is not due to vitamin or salt exhaustion.

I.3. Discussion

Cell growth and lipid accumulation of Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 growing on free fatty acids of animal origin, is clearly influenced by the initial medium pH value; at initial pH 6, the concentration of cellular lipids as well as the coefficient $K_{L/X}$ are

higher than those observed at 5.5 and 6.5 respectively. In addition, the pH of the culture medium stays almost constant, showing, hence, that the growth of Y. lipolytica on saturated free fatty acids is not followed by a significant production of organic acids.

Lipid accumulation when fat is used as carbon and energy source, is entirely independent of nitrogen exhaustion from the culture medium. Experiments, with different extracellular nitrogen availabilities and constant concentration of carbon source, show that, in all cases, the microorganism presents significant cell growth and lipid accumulation ($K_{L/X}$ from 0.25 to 0.44 g/g). These data are in agreement with the findings of Aggelis et al. (1995a) and Aggelis and Sourdis, (1997), where cell growth and lipid accumulation of Mucor circinelloides have been studied on vegetable oil used as sole carbon and energy source. Only Glatz et al., (1984), using an Yarrowia lipolytica strain consuming fat (emulsified corn oil) as sole carbon source, consider that lipid accumulation starts after nitrogen exhaustion from the culture medium.

In contrast of lipidic substrates, when oleaginous microorganisms are growing on non lipidic ones, intracellular lipid biosynthesis is correlated with nitrogen limitation of the culture medium. In this case, lipid accumulation is enhanced by the inhibition of Krebs cycle function (inhibition of iso-citrate dehydrogenase) and the resulting excretion of citric acid from the mitochondrion into the cytoplasm. This molecule would be cleaved by the ATP-citrate lyase and the acetyl-CoA would lead to intracellular lipid synthesis (Boulton and Ratledge, 1980; Ratledge, 1987; 1994).

The biochemical mechanism of lipid accumulation from fats used as sole carbon source is completely different, as the extracellular aliphatic chains enter directly the microbial cell. There is not any *de novo* lipid biosynthesis from the acetyl-CoA as, additionally, the fatty acid synthetase (FAS) and the ATP-citrate lyase are strongly inhibited by the presence of exogenous aliphatic chains.

In the present kinetic studies, 50-70h after inoculation the microorganism consumes its accumulated lipids, having as result a significant decrease of the coefficient $K_{L/X}$. This uptake occurs during the stationary growth phase, in spite of the fact that a significant concentration of carbon and nitrogen substrate remain unconsumed. The stationary phase with the simultaneous limitation of stearin consumption does not seem to be a result of vitamin or salt exhaustion, as a pulse of concentrated yeast extract and salts did not improve the consumption of the extracellular carbon substrate.

The process of cellular lipid degradation has been observed in a two stage fermentation of the oleaginous yeast Candida curvata (Holdsworth and Ratledge, 1988). In the first stage, lipid accumulation was enhanced (growth on glucose, use of initial molar ratio C/N 60), while, in the second stage, no extracellular carbon source was employed. The microorganism used its accumulated lipids, showing that the phenomenon of cellular lipid degradation is independent of the culture "history" (carbon source assimilated by the oleaginous microorganism in order to proceed at lipid accumulation).

During the cellular lipid consumption period, the concentration of fat-free biomass showed a significant increase; fat uptake occurred simultaneously with the biosynthesis of proteins and nucleic acids. In fact, the activity of carnitine acetyl-transferase and iso-citrate lyase increased considerably during this phase (Holdsworth et al., 1988). The obtained yield $Y_{Xf/L}$ was about 1.9 g/g. In the present study, cellular lipid uptake is accompanied by a fat-free biomass increase (though, the yield $Y_{Xf/L}$ presents lower values (0.6-0.8 g/g) compared with the previous case). The same yield obtained by Aggelis and Sourdis, (1997) (growth of Mucor circinelloides on vegetable oils) was about 0.63-0.66 g/g.

Although relatively high lipid amounts (L_{max} 2.2-3.8 g/l) are accumulated inside the cells in media showing significant variations of the extracellular nitrogen availability, it must be considered that the intracellular fat synthesis is favoured when the initial nitrogen concentration is sufficiently low. It can be seen that rich nitrogen media favour cell growth and fat-free biomass formation, while relatively lower lipid amounts are accumulated inside the yeast cells.

This study allowed the identification of some parameters of cell growth and cellular lipid production of Y. lipolytica in a medium composed of industrial lipids (free fatty acids of animal origin). The pH, the incubation temperature and the initial substrate concentration play a significant role on the process of lipid accumulation. This process seems independent of the extracellular nitrogen concentration, while during the stationary growth phase, the microorganism consumes its cellular accumulated lipids, although carbon and nitrogen sources have not been exhausted yet.

I.4. Conclusion

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer les potentialités biochimiques de Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 sur la stéarine. Les résultats les plus marquants, obtenus lors de ce travail, sont les suivants :

Y. lipolytica, en général, présente une croissance cellulaire élevée, accompagnée d'une importante accumulation en lipides cellulaires. La croissance n'est pas suivie d'une acidification significative du milieu de fermentation. Une production négligeable d'acides organiques s'effectue lors de ce type de bioconversion.

Le pH initial, la concentration d'azote extracellulaire, la température d'incubation ainsi que la concentration initiale en stéarine jouent un rôle essentiel sur le processus d'accumulation lipidique. En accord avec les données de la littérature (Aggelis et al., 1995a; Aggelis et Sourdis, 1997), l'accumulation des lipides de réserve à partir de milieux de type lipidique, s'effectue en même temps que la croissance cellulaire, n'étant pas dépendante de l'épuisement du milieu par l'azote. Il paraît, néanmoins, que les meilleurs résultats au niveau de l'accumulation en graisses cellulaires, sont obtenus pour les conditions opératoires intermédiaires (rapport initial stéarine/sulfate d'ammonium 10/0,5 g/g, C/N initial aux alentours de 35).

Dans tous les cas, entre 50-70h après inoculation, le microorganisme procède à une dégradation des ses lipides cellulaires, en dépit d'une concentration non négligeable de substrat lipidique qui reste non consommée dans le milieu de fermentation. Cette consommation ne semble pas être résultat d'une limitation d'azote, des sels, ou des vitamines par le milieu de culture.

Une première identification des potentialités métaboliques de Y. lipolytica sur une graisse industrielle composé d'acides gras libre saturés a été effectuée. La stéarine, s'est avérée un substrat qui favorise la croissance cellulaire ainsi que l'accumulation des graisses dans la cellule microbienne; de pourcentages élevés en lipides (de l'ordre de 50% en masse) ont été observés. Nous allons nous intéresser, par la suite, sur la croissance de cette souche, à partir de milieux lipidiques composés de mélanges d'acides gras libres saturés et insaturés dans un double objectif :

d'abord étudier, à partir des données cinétiques et biochimiques, le comportement de la souche sur ces mélanges lipidiques

ensuite orienter le métabolisme microbien vers la synthèse d'une matière grasse intracellulaire avec une composition proche de celle du beurre de cacao.

II. CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR DES MELANGES DE STEARINE ET D'HUILE DE COLZA HYDROLYSEE : PRODUCTION D'UN SUCCEDANE MICROBIEN DE BEURRE DE CACAO

Après avoir analysé, dans une première approche, les potentialités biochimiques de la souche (croissance et accumulation lipidique sur un dérivé de la graisse animale constituée d'acides gras libres), nous voulons observer la réponse du microorganisme sur des mélanges d'acides gras saturés et insaturés. Le premier objectif de cette partie du travail est de réaliser des études cinétiques, en utilisant des substrats lipidiques dont la composition est très variée, afin d'étudier :

la croissance cellulaire sur ces substrats

le processus d'accumulation lipidique

la composition des graisses intracellulaires produites

la spécificité d'incrporation des chaînes aliphatiques extracellulaires dans la cellule.

Le second objectif est d'essayer d'orienter le métabolisme microbien vers la synthèse d'une graisse cellulaire ayant une composition proche à celle du beurre de cacao.

Les substrats qui sont utilisés lors de ce travail sont des mélanges de stéarine, une graisse industrielle majoritairement constituée d'acide stéarique et d'acide palmitique, et d'huile de colza oléique, une matière grasse largement disponible, hydrolysée chimiquement, principalement constituée d'acide oléique.

II.1. Introduction

Single cell oils (S.C.O.) present a potential interest for food and pharmaceutical industries because of their special structure and composition (Ratledge and Boulton, 1985; Ratledge, 1993; 1994). Many oleaginous microorganisms (that can accumulate lipids to more than 20% of their cell dry weight) have been used in the production of lipids containing high percentage of polyunsaturated fatty acids such as γ-linolenic acid (Aggelis et al., 1990; 1991; Botha et al., 1997), dihomo-γ-linolenic acid (Shimizu et al., 1989), arachidonic acid (Totani and Oba, 1988) or eicosapentanoic acid (Bajpai et al., 1992). Also, the production of substitutes of lipids with special financial interest, such as the cocoa-butter, has been already attempted (Ykema et al., 1989; 1990; Davies et al., 1990) and scaled up (Davies, 1992; Davies and Holdsworth, 1992). In all cases, the oil is accumulated as intracellular droplets and is composed mainly of triacylglycerols.

A large number of media have been used so far for S.C.O. production (Davies and Holdsworth, 1992; Ratledge, 1994). Common fats, such as vegetable oils (Aggelis et al., 1995a; b; Aggelis and Sourdis, 1997), methyl-esters (Matsuo et al., 1981) and soaps (Montet et al., 1985), are substrates of great interest because of the capacity of some microorganisms (yeasts and moulds) to accumulate and at the same time modify these substrates (Radwan and Soliman, 1988; Kamisaka et al., 1990; Aggelis et al., 1997). The phenomena leading the cellular lipid composition, are the specific process of incorporation of substrate aliphatic chains and the endo-cellular changes of fatty acids defined by the enzymic capabilities of the microorganism. The incorporated fatty acids will be either assimilated for growth needs or become a substrate for endo-cellular biotransformations (synthesis of "new" fatty acid profiles which did not exist previously in the substrate) (Aggelis and Sourdis, 1997).

Animal fat and tallow, available in large quantities from the meat processing industries, have already lost most of the market volume because of their replacement by vegetable oils. They are now used as raw materials for the production of fatty acids on soap manufacture or as lubricants. Only few investigations using animal fat or its derivatives as carbon and energy source, have, though, been carried out in the microbial bioconversion field (e. g. production of sophorolipids by Desphande and Daniels, 1995). In addition, oleic rapeseed oil is another widely available low value-added material; many different ways in order to enhance its value have been already developed.

This paper represents part of a work aiming to the production of a cocoa-butter equivalent by Yarrowia lipolytica. Recent reports on the international press indicate large problems concerning cocoa-butter production, because of the failure of measures destined in the cocoa plant protection by insects and diseases. This might have as result a significant increase of the cocoa-butter price.

The goal of the present investigation is the study of cell growth and lipid accumulation of Y. lipolytica when substrates with different fatty acid composition are used. The employed substrates are an industrial derivative of animal fat, called "stearin", hydrolyzed oleic rapeseed oil (HORO) and mixtures of these substances. The influence of these substrates on the cell growth, the quantity as well as the composition of cellular lipids of Y. lipolytica is studied and discussed.

II.2. Results

All experiments are realized at different HORO (hydrolyzed oleic rapeseed oil)/stearin ratios and initial substrate concentration 10 g/l. The HORO/stearin ratios employed for all of the runs are the following ones: 0/100, 25/75, 34/66, 40/60, 50/50, 60/40, 75/25, 100/0. Generally, cell growth is conducted in a medium pH remaining practically constant (pH 5.5-6), while the nitrogen does not consist the limiting factor of cell growth (Papanikolaou et al., a). The more representative results will be presented below.

II.2.1. Growth on stearin

The growth of Y. lipolytica on stearin is presented in Figure II. 1.

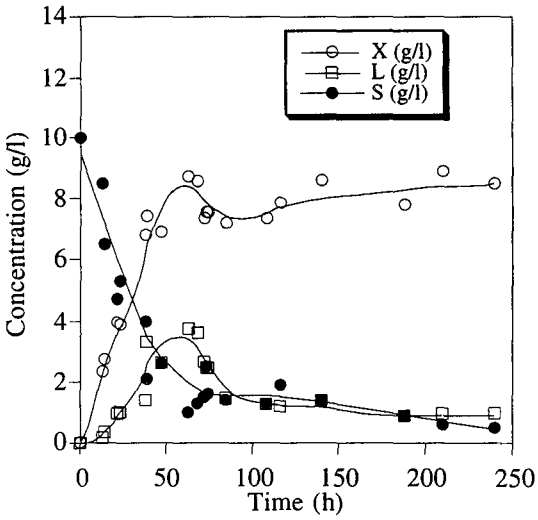


Figure I. 1
Kinetics of biomass (X), substrate (S) and cellular lipids (L) of Y. lipolytica growing on stearin. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

The first 60h after inoculation, the microorganism consumes significant substrate amounts presenting simultaneous cell growth and lipid accumulation. The maximum total biomass value is 8.7 g/l ($Y_{X/S}$ 0.97 g/g). Furthermore, the concentration of cellular lipids arrives at 3.8 g/l with $K_{L/X}$ 0.44 g/g. From 60 to 100h after inoculation, a degradation of the cellular lipids is realized, although a relatively high quantity of stearin remains unconsumed (at 60h, S is near 2 g/l). During the above period, the microorganism seems to use simultaneously as substrates, the extracellular carbon source and the cellular lipids (though, mainly the cellular accumulated lipids are consumed). At the late fermentation phase (100-240h), a further decrease of the extracellular carbon substrate is observed (final concentration 0.4 g/l at 240h) while the cellular lipid concentration remains constant. Furthermore, it can be observed that, between 60 and 100h, the curve of total biomass evolution is similar to that of the cellular lipids; a decrease of total biomass value is obseved, due to the consumption of the accumulated fats. As for the fat-free biomass concentration X_f, it increases significantly from 60 to 240h (from 4.9 to 7.5 g/l), meaning that cellular lipids act as precursor in the synthesis of cell materials. In addition, the uncontrolled pH of culture medium stays almost constant (final pH 5.8).

A significant increase (% w/w) of the cellular stearic acid occurs during growth (Table II. 1); in the first growth step, the cellular lipid composition is similar to that of stearin, but during the culture, the stearic acid concentration increases significantly from 52 to 80% while that of the palmitic acid decreases from 22 to 13%.

Table II. 1
Total fatty acid composition of cellular lipids of Y. lipolytica grown on stearin. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, pH_0 6, incubation temperature 28°C.

		Stearin fatty acid composition[1]		
		C16:0	C18:0	C18:1
		25	52	2
		Cellular lipid composition		
Time (h)	$K_{L/X}$ (g/g)	C16:0	C18:0	C18:1
14	0.13	22	52	7
21.5	0.24	17	68	3
38.5	0.44	16	79	1
62.5	0.43	18	77	1
72	0.33	13	78	1
84.5	0.20	13	83	3
108	0.18	14	80	3
116	0.15	13	78	2

1. Other non-presented fatty acids are mainly the lauric - C12:0 (10% w/w) and the myristic - C14:0 acid (10% w/w)

II.2.2. Growth on hydrolyzed oleic rapeseed oil (HORO)

Significant cell growth (maximum biomass value 7.7 g/l, $Y_{X/S}$ 0.86 g/g) is realized on HORO. However, lipid accumulation is not favoured (only 0.3-0.6 g/l of cellular lipids are found with $K_{L/X}$ 0.05-0.09 g/g), showing, hence, that this hydrolyzate, rich in oleic acid, is not an adequate substrate for lipid accumulation (Figure II. 2).

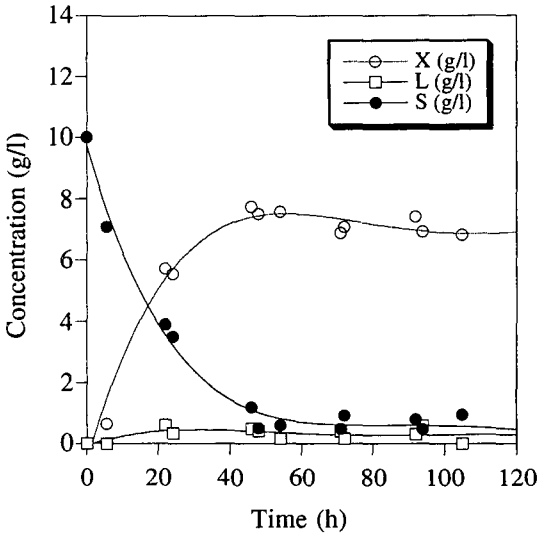


Figure II. 2
Kinetics of biomass (X), substrate (S) and cellular lipids (L) of Y. lipolytica growing on hydrolyzed oleic rapeseed oil (HORO).
Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

The pH of the culture medium presents a decrease (final pH 5.1). In addition, the cellular total lipid composition, shows higher percentages of oleic acid than those found at the HORO (higher than 80% w/w) (Table II. 2).

Table II. 2
Total fatty acid composition of cellular lipids of Y. lipolytica grown on hydrolyzed oleic rapeseed oil (HORO). Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, pH_0 6, incubation temperature 28°C.

		HORO fatty acid composition[1]		
		C16:0	C18:1	C18:2
		5	72	15
		Cellular lipid composition		
Time (h)	$K_{L/X}$ (g/g)	C16:0	C18:1	C18:2
54	0.03	3	79	9
72	0.05	-	86	12
94	0.09	1	85	11
104	0.08	-	86	12

1. Other non-presented fatty acid is mainly the α-linolenic acid (6% w/w)

It must be noted that the α-linolenic acid, presented at percentage 6% in the HORO, is not detected in the cellular lipids (data non shown).

II.2.3. Growth on HORO/stearin (25/75)

The growth on HORO/stearin 25/75, presented in Figure II. 3, shows the following characteristics: in the first growth phase (40-50h), high cell growth (X equal to 8.2 g/l, $Y_{X/S}$ 1.15 g/g) and simultaneous lipid accumulation (L equal to 3.4 g/l, $K_{L/X}$ 0.42 g/g) are observed. From 50 to 100h after inoculation, the microorganism consumes its cellular lipids, although the concentration of the remaining substrate is relatively high (about 3 g/l). During this period (50-100h), a decrease of the extracellular lipidic consumption is observed. The late fermentation step (from 100 to 170h after inoculation) is accompanied by a further decrease of the substrate concentration, while that of the cellular lipids remains constant. As in the stearin case, the late fermentation phases (from 50 to 170h) are followed by a significant increase of the fat-free biomass concentration X_f (from 4.8 to 7.2 g/l). In addition, during the cellular lipids consumption period (50-100h after inoculation) the total biomass curve presents similar evolution to that of the cellular lipids (Figure II. 3).

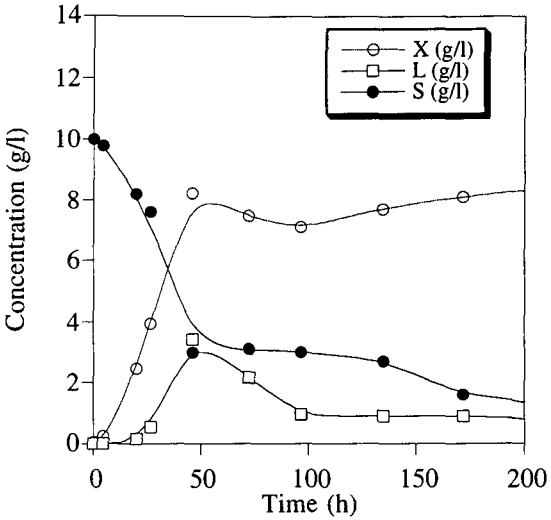


Figure II. 3
Kinetics of biomass (X), substrate (S) and cellular lipids (L) of Y. lipolytica growing on HORO/stearin 25/75. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

The pH of the culture medium stays almost constant (final pH 5.8). Moreover, the cellular fatty acid composition, studied in all growth phases is presented in Table II. 3.

Table II. 3
Total fatty acid composition of cellular lipids of Y. lipolytica grown on HORO/stearin 25/75. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, pH_0 6, incubation temperature 28°C.

		HORO/stearin 25/75 fatty acid composition			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
		19	41	19	4
		Cellular lipid composition			
Time (h)	$K_{L/X}$ (g/g)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
20	0.06	20	30	30	10
26.5	0.14	15	35	23	6
46	0.42	17	63	12	4
72.5	0.30	16	77	5	2
96.5	0.13	17	64	10	2

In the first growth step, the oleic acid percentage is relatively higher than the one of the substrate, whereas lower is that of the stearic acid. Afterwards, during microbial growth, a spontaneous accumulation of the stearic acid is realized while oleic acid percentage decreases.

II.2.4. Growth on HORO/stearin (75/25)

Significant growth (X around 7-7.5 g/l and $Y_{X/S}$ 0.90 g/g) is observed on HORO/stearin 75/25 but lipid accumulation is not favoured ($K_{L/X}$ 0.05 to 0.1 g/g) (Figure II. 4).

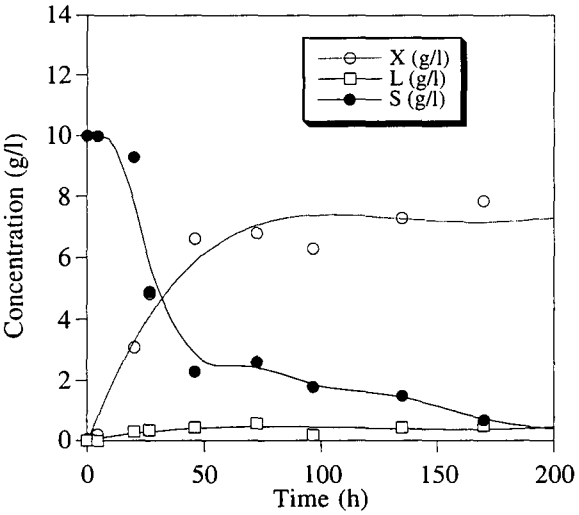


Figure II. 4
Kinetics of biomass (X), substrate (S) and cellular lipids (L) of Y. lipolytica growing on HORO/stearin 75/25. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

The pH of the culture medium decreases slightly, presenting a final value 5.6. Furthermore, the cellular fatty acid composition is studied in all growth phases (Table II. 4).

Table II. 4
Total fatty acid composition of cellular lipids of Y. lipolytica grown on HORO/stearin 75/25. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, pH_0 6, incubation temperature 28°C.

		HORO/stearin fatty acid 75/25 composition			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
		12	15	55	11
		Cellular lipid composition			
Time (h)	$K_{L/X}$ (g/g)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
20	0.10	9	4	58	17
26.5	0.07	10	5	58	18
46	0.07	11	33	42	9
72.5	0.10	11	32	40	9
96.5	0.03	11	48	30	7

In the first step of cell growth, the cellular oleic acid percentage is high while, the one of the stearic acid is relatively lower compared with the substrate. During growth, the percentage of stearic acid increases significantly reaching, 96.5h after inoculation, the amount 48% while that of oleic acid decreases from 57 to 30% (w/w). It is noticed that the stearic acid percentage in the substrate is only 15%.

II.2.5. Growth on HORO/stearin (50/50)

In the first growth step (40-50h), high biomass (X around 8 g/l, $Y_{X/S}$ 1) and cellular lipid (L_{max} 2.9 g/l, $K_{L/X}$ 0.36 g/g) concentrations are obtained. Then (50-100h), the cellular lipids are consumed. During this growth phase, the extracellular lipid incorporation can be considered as stopped. The late growth phase (100-240h) is characterized by a further decrease of the extracellular lipidic substrate (final substrate concentration 0.4 g/l), while the cellular lipid concentration remains almost constant. Moreover, the later phases (50-240h) are accompanied by a significant fat-free biomass concentration increase from 5 to 7.5 g/l. In addition, as in all cases where significant cellular lipid accumulation and degradation was observed, the total biomass curve, between 50 and 100h, presents a decrease (similar evolution to the curve of cellular lipids) (Figure II. 5).

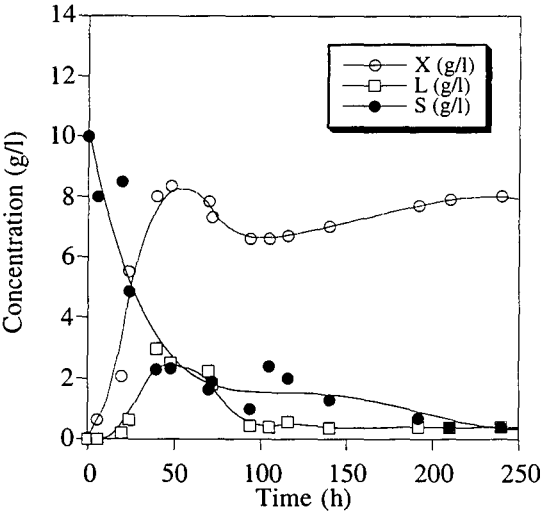


Figure II. 5
Kinetics of biomass (X), substrate (S) and cellular lipids (L) of Y. lipolytica growing on HORO/stearin 50/50. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

The pH of the culture medium stays almost constant for all growth phases (final pH 5.7).

The cellular fatty acid composition of the microorganism is studied during all growth phases. Similar modifications are obtained during this experiment: in the first growth step, the cellular lipids present higher oleate and lower stearate amounts compared with the substrate profile. Then, the concentration of stearic acid increases considerably (Table II. 5).

Table II. 5
Total fatty acid composition of cellular lipids of Y. lipolytica grown on HORO/stearin 50/50. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, pH_0 6, incubation temperature 28°C.

		HORO/stearin fatty acid 50/50 composition			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
		15	26	38	10
		Cellular lipid composition			
Time (h)	$K_{L/X}$ (g/g)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
19.5	0.07	15	15	46	12
39.5	0.36	14	50	24	4
48	0.30	12	64	18	3
70	0.29	10	67	14	3
72	0.24	13	73	8	2
94	0.06	10	60	15	2
105	0.06	9	70	13	3
116	0.09	9	71	9	2
140	0.06	13	74	8	2
210	0.05	12	75	5	1

Cellular lipid profiles similar to those of the cocoa-butter are obtained, as the process of lipid accumulation is accompanied by high stearic acid and relatively significant palmitic and oleic acid percentages. For instance, 39.5h after inoculation, these fatty acids present percentages around 50, 14 and 24% (w/w) of total lipids respectively. At the same time, the biomass produced is rich in lipids (L 2.9 g/l, $K_{L/X}$ 0.36 g/g).

II.2.6. Fatty acid incorporation and degradation

The study of the culture fatty acid incorporation, realized in several experiments (HORO/stearin ratios 0/100, 25/75, 50/50, 34/66, 40/60, 60/40), presents similar results in all cases; lower aliphatic chain (C12:0 and C14:0) or unsaturated (C18:1, C18:2, C18:3) fatty acids are rapidly incorporated. In contrast, the palmitic and mainly the stearic acid present lower incorporation rates. In Figure II. 6, an exemple of a fatty acid incorporation kinetics is presented (HORO/stearin 50/50 experiment).

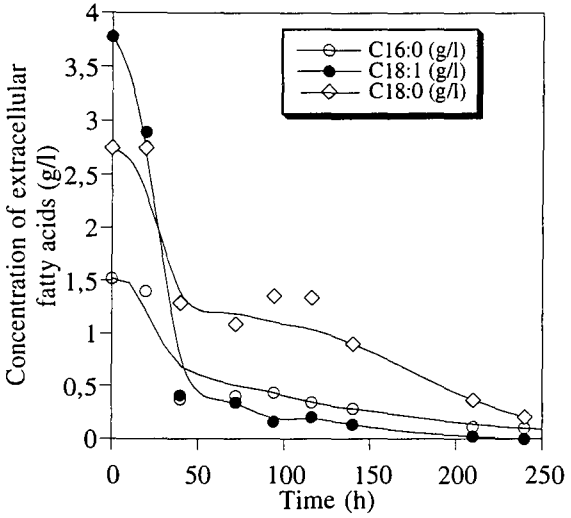


Figure II. 6
Kinetics of extracellular free fatty acids incorporation during growth of Y. lipolytica on HORO/stearin 50/50. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

A high specificity for the oleic acid, which almost completely disappeared from the culture medium at early cell growth, is observed. The incorporation rate (evaluated in the first 40 hours) is about 0.12 g/l.h. Significant is the specificity for the linolenic, the lauric and the myristic acid which disappeared very rapidly (40h after inoculation - data not shown). In contrast, lower is the specificity for the palmitic (initial concentration around 1.6 g/l, final concentration 0.2 g/l, incorporation rate about 0.05 g/l.h) and mainly for the stearic acid. It must be noted that the evolution of this fatty acid is similar to that of the total lipidic substrate; in first growth step, some uptake of the extracellular stearic acid is observed. Then (50-100h), during the cellular lipids consumption period, the concentration of extracellular stearic acid remains almost constant; during the above period, this fatty acid is the only one remaining unconsumed in significant quantities into the culture medium. The late growth phase (100-240h), is followed by a further decrease of the extracellular stearic acid concentration.

The accumulation rates of the intracellular stearic and oleic acid are almost the same, and relatively higher than that of the palmitic acid; though, significantly higher

amounts of stearic acid are accumulated as reserve lipids compared with oleic and palmitic acid (Figure II. 7).

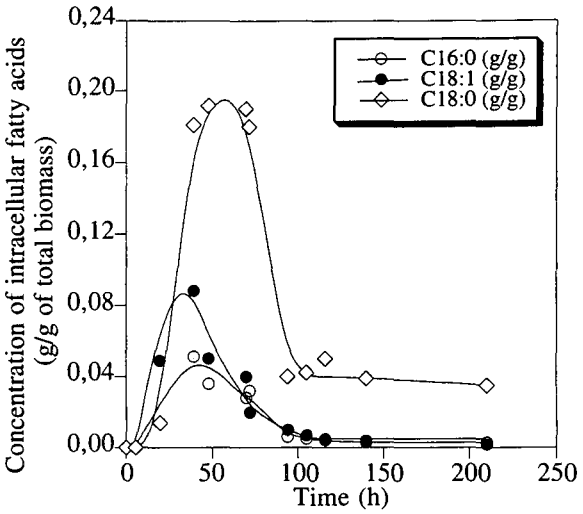


Figure II. 7
Kinetics of intracellular fatty acids evolution (accumulation-degradation) during growth of Y. lipolytica on HORO/stearin 50/50. Culture conditions: free fatty acids 10 g/l, incubation temperature 28°C, pH_0 6.

When cellular lipid consumption occurs, a preferential degradation of the oleic acid is observed; 72h after inoculation, the concentration of this cellular fatty acid is close to 0.02 g/g (maximum value obtained 0.09 g/g, 39.5h after inoculation). At the same time, some consumption of the cellular palmitic acid has been observed too while the cellular stearic acid amount remains at almost its highest level (0.18 g/g). Between 72 and 94h, a rapid decrease of the cellular stearic acid is observed.

II.2.7. Cellular lipid analysis

In several cases, when the accumulated lipids present their maximum value, a cellular lipid analysis is carried out in order to quantify the main lipid fractions. The microbial fats are mainly composed of polar fractions (phospholipids), sterols, free fatty acids and triglycerides. The triglycerides are the principal lipid fraction of the accumulated

fat (45-55% w/w of total lipids); the free fatty acids are presented in significant amounts too (about 40% w/w of total lipids). The composition of the triglyceride and free fatty acid fractions is relatively different than the total lipid composition; the principal amount of the unsaturated fatty acids (oleic and linoleic acid) is found in the triglyceride fraction, whereas the free fatty acids are mainly composed of stearic and palmitic acid. In most of the cases, compared with the total lipids, the triglycerides contain about 50-70% more oleic and linoleic acid and 50% less stearic acid. In contrast, the palmitic acid percentage is almost the same in the triglyceride fraction and in the total lipids.

II.3. Discussion

Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 presents significant cell growth from industrial lipids based on free fatty acids. In all cases, the maximum specific growth rate (μ_{max}), estimated at the early exponential growth phase, is between 0.25 and 0.3 h^{-1}.

Lipid accumulation is critically influenced by the substrate fatty acid composition; rich oleic acid lipids are an inadequate substrate for lipid accumulation. The obtained results from all runs conducted are summarized in Table II. 6 (for the calculation of the carbon recovery it is considered that the average fat-free biomass structure is $C_5H_7NO_2$ and the carbon content of the cellular lipids is 75% w/w).

Table II. 6
Biomass and cellular lipid production by Y. lipolytica at different HORO/stearin mixtures. All represantations and calculations are realized when cellular lipids present their maximum value. Culture conditions: free fatty acids (10 g/l), pH_0 6, incubation temperature 28°C.

	X g/l	L_{max} g/l	S g/l	$Y_{X/S}$ g/g	π_{Lx} mg/g.h	Carbon recovery % w/w
HORO/Stearin 0/100	8.7	3.8	1.0	0.97	7.0	88
HORO/stearin 25/75	8.2	3.4	2.9	1.15	9.1	99
HORO/stearin 34/66	8.1	2.5	2.8	1.06	4.9	90
HORO/stearin 40/60	7.5	2.3	3.0	1.07	6.5	89
HORO/stearin 50/50	8.0	2.9	2.3	1.04	9.4	89
HORO/stearin 60/40	8.1	1.4	2.4	1.06	3.4	83
HORO/stearin 75/25	6.8	0.7	2.6	0.92	1.4	66
HORO/stearin 100/0	7.6	0.6	0.9	0.84	1.5	60

High cell growth is observed in all cases. Though, significant presence of oleic acid in the culture medium results in lower carbon recoveries. Moreover, it can be observed that the process of lipid accumulation is correlated with the presence of stearin into the culture medium (Figure II. 8).

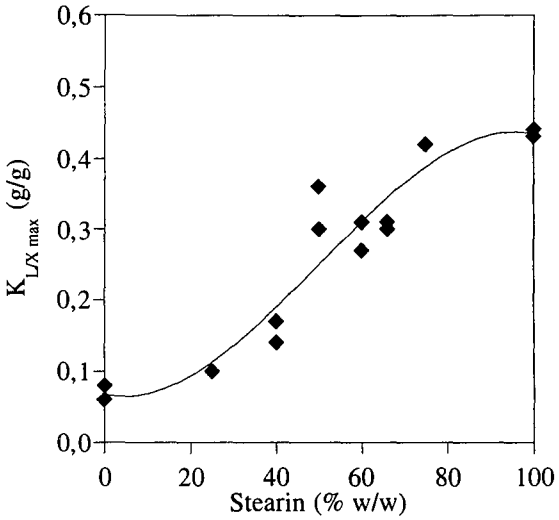


Figure II. 8
Relationship between maximum percentage of cellular lipids in dry matter ($K_{L/Xmax}$) and stearin percentage in the carbon substrate (in all cases, initial free fatty acid concentration in the culture medium 10 g/l).

The carbon recovery calculations, the increased lipid accumulation in rich stearin media, the data of the extracellular fatty acid incorporation and the cellular lipid composition, as well as the relatively decreased final pH in the HORO fermentation, permit the following assumption: the unsaturated fatty acids (mainly the oleic acid) are rapidly incorporated and principally used for growth needs (energy needs, formation of CO_2) and organic acid production. In contrast, the saturated fatty acids are incorporated more slowly and are partially used for growth needs and partially accumulated as storage materials.

Montet et al., (1985) proceeding at cell growth with Candida lipolytica DIDDENS and LODDER in carbon-limited media, observed decreased lipid accumulation ($K_{L/X}$ 0.09 g/g) on soaps rich in oleic acid.

In the present work, the accumulated fat of Y. lipolytica is mainly composed of triglycerides (45-55% w/w of total lipids, analysis conducted when the cellular lipids present their maximum value). The amount of accumulated free fatty acids is significant too (40% w/w), while sterols and phospholipids are also detected in low amounts. In general, it is considered that the oleaginous microorganisms accumulate their lipids as intracellular droplets composed mainly of triacylglycerols (80-90% w/w of total lipids, Ykema et al., 1988; Meesters et al., 1996). However, other investigations indicate significant (but lower) triglyceride percentages (45-70% w/w of total lipids, Ratledge and Boulton, 1985; Kendrick and Ratledge, 1992).

The growth of Y. lipolytica on industrial lipids, is accompanied by a radical modification of the substrate fatty acid profile. Cellular total lipid profiles with significant stearic acid percentages and lower (but non negligible) ones of oleic and palmitic acid are obtained, resulting in the synthesis of a cocoa-butter equivalent (Figure II. 9).

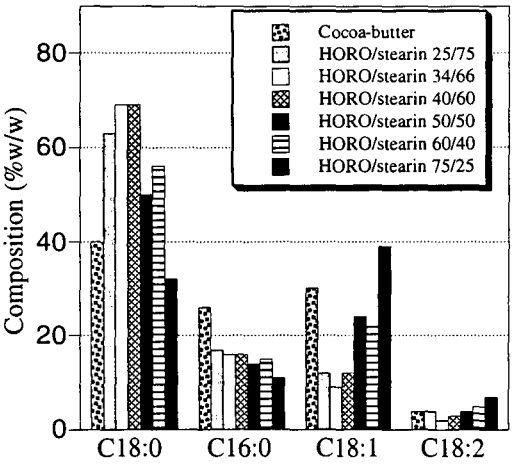


Figure II. 9
Fatty acid composition (% w/w) of cocoa-butter and cellular lipids of Y. lipolytica growing on different HORO/stearin ratios
(data shown when $K_{L/X}$ was maximum at every case).

When HORO/stearin 50/50 mixture is used as substrate, high lipid accumulation occurs ($K_{L/Xmax}$ 0.36 g/g) with cellular lipid composition close to that of the cocoa-butter. When the initial mixtures used are 25/75, 34/66 and 40/60 respectively, lipid accumulation is significant ($K_{L/Xmax}$ 0.31-0.42 g/g) with a cellular total fatty acid composition relatively different than that of the cocoa-butter (with higher stearic and lower oleic acid percentages than those of the cocoa-butter). Nevertheless, the total saturated fatty acid content (16:0 and 18:0) is over 70% w/w of the accumulated fat. This is a remarkable achievement, considering the usual predominance of unsaturated fatty acids into the reserve lipids of the oleaginous yeasts. When HORO/stearin mixtures 60/40 and 25/75 are used, cellular fatty acid composition is very interesting (close to that of the cocoa-butter) but lipid accumulation is not high ($K_{L/Xmax}$ 0.14 and 0.09 g/g respectively).

The spontaneous increase of cellular stearic acid in Y. lipolytica LGAM S(7)1 is a rather unusual result, as in general, the research groups dealing with the microbial production of cocoa-butter substitutes, find difficult to increase the cellular level of this fatty acid; in general, the oleaginous yeasts accumulate large amounts of oleic and linoleic acid and less than 10% (w/w) of stearic acid (Davies and Holdsworth, 1992). Several approaches have been followed in order to increase the cellular level of stearic acid such as: extensive isolation and screening program of yeasts growing on dairy drains and capable of accumulating high stearic acid amounts (Davies and Holdsworth, 1992), use of $\Delta 9$ and $\Delta 12$ desaturase inhibitors (e. g. sterculic, malvanic and cis-12-methyleneoctadecenoic acid, Moreton, 1985; Ratledge, 1994), low oxygenation of the fermentation medium (Davies et al., 1990; Davies and Holdsworth, 1992) and genetic engineering so as to obtain mutants defective in the conversion of stearoyl-CoA to oleoyl-CoA (Ykema et al., 1990; Smit et al., 1992). Additionally, one of the common approaches conducted, was the growth of oleaginous yeasts in preparations of stearic acid or its derivatives. It was the case of Rhodosporidium toruloides growing firstly on osidic substrates and then on fine stearic and palmitic acid emulsions or directly on these emulsions (Gierhart, 1982a; b) or of yeasts belonging to the genera Torulopsis, Candida and Trichosporon growing on methyl, ethyl or vinyl-esters of stearic and palmitic acid (Matsuo et al., 1981). Though, the use of industrial low value-added fats as sole carbon source in order to synthetize cocoa-butter-like lipids by fermentative means, the scope of the present investigation, is a new approach not having appeared in the literature yet.

A comparison of the results obtained from some of the research groups dealing with the production of cocoa-butter equivalents, given in Table II. 7, shows that whatever the strategy followed, cellular lipids with similar fatty acid composition to the cocoa-butter are obtained. In the present investigation, the percentage of accumulated lipids is relatively high (36% w/w), while the lipid yield ($Y_{L/S}$) is excellent (0.38 g/g).

Table II. 7
Results obtained from research groups dealing with the microbial production of cocoa-butter substitutes (Cocoa-butter fatty acid composition: C18:0 33-40%, C16:0 23-33%, C18:1 29-39%, C18:2 2-6% w/w).

	1-Matsuo et al., 1981	2-Moreton, 1988*[1]	3-Davies et al., 1990	4-Ykema et al., 1990	This work
$K_{L/X}$ (g/g)	0.51	0.31	0.39	0.47*[2]	0.36
$Y_{L/S}$ (g/g)	0.33	0.11*[2]	0.17	0.14	0.38
C16:0	26	20	23	26	14
C18:0	37	47	23	36	50
C18:1	22	22	42	20	24
C18:2	8	5	3	9	4

*[1]: Data from Ratledge, 1994

*[2]: Calculated from available data

1. Torulopsis sp. ATCC 20507 on vinyl-stearate and vinyl-palmitate
2. Rhodosporidium toruloides on glucose
3. Apiotrichum curvatum on lactose
4. Apiotrichum curvatum revertant R22.72 on lactose

The cell growth and the accumulation-degradation of cellular lipids of Y. lipolytica growing on industrial fats can be divided into three well separated phases:
i) 0-50h after inoculation. Y.lipolytica consumes significant extracellular lipid quantities, proceeding at simultaneous cell growth and relatively high intracellular fat accumulation (35-45% w/w of lipids in dry matter).
ii) 50-100h after inoculation. Y.lipolytica consumes its accumulated lipids although relatively high amounts of carbon substrate remain unconsumed. During this phase, the microorganism uses mainly its cellular lipids, whereas a low extracellular lipid consumption is observed.
iii) 100-240h after inoculation. The microorganism proceeds again at the extracellular substrate consumption, while the concentration of cellular lipids remains constant.

The origin of the low extracellular substrate uptake rate during the second phase, accompanied by the cellular lipid consumption, is unknown. Perhaps, during the late fermentation phases, the biosynthetic abilities of the microbial population cannot be supported only by the extracellular carbon source and the carbon pool should be supplemented by the biodegradation of the lipid reserves. This assumption is in agreement with the findings of Aggelis et al., (1995a) and Aggelis and Sourdis, (1997),

where Mucor circinelloides growing on a vegetable oil, consumed its accumulated lipids when the carbon substrate concentration was inferior than a critical value.

Another hypothesis is that the accumulated fat could play an inhibiting role in the extracellular fatty acid uptake; when a significant lipid amount is accumulated, the microorganism could realize a consumption of its reserve lipids instead of transporting the remaining extracellular aliphatic chains inside the microbial cell; this process is more favoured considering energy and yield terms (Aggelis and Sourdis, 1997).

Another assumption capable of explaining the low extracellular fatty acid uptake, could be related to decreased membrane biological activity during the late fermentation steps; it is known that the active transport of nutrients (e. g. fatty acids, salts....) inside the microbial cell, is correlated with increased activity of the membranes. The unsaturation of membrane lipids, favours this activity. In the present study, the decreased extracellular aliphatic chain incorporation is observed when the cellular accumulated fats are mainly composed of saturated fatty acids. Although a judicious analysis of the cellular phospholipids has not been conducted, a decreased membrane activity could be plausible due to sufficient saturated fatty acid amounts found into the membrane lipids.

Whatever the origin of the consumption, the cellular lipid degradation is followed by a significant increase of the fat-free biomass concentration, showing that accumulated lipids act as precursor in the biosynthesis of cell materials.

II.4. Conclusion

Y. lipolytica a présenté une croissance cellulaire significative ($Y_{X/S}$ 0,85-1,2 g/g, μ_{max} 0,25-0,3 h^{-1}) quand des mélanges de stéarine et d'huile de colza oléique hydrolysée chimiquement ont été utilisés comme substrat carboné. Le processus d'accumulation lipidique a été notablement influencé par la composition du substrat. Ainsi, des milieux lipidiques constitués d'huile de colza oléique hydrolysée, n'ont pas favorisé l'accumulation des lipides cellulaires ($K_{L/Xmax}$ 0,09 g/g), alors que la quantité de la stéarine dans le substrat carboné a été corrélée avec le pourcentage maximum des lipides accumulés par rapport à la matière sèche; Y. lipolytica a procédé a une accumulation lipidique relativement importante (supérieure de 30% de lipides par rapport à la matière sèche) quand la stéarine constituait plus que le 50% (en masse) du substrat lipidique utilisé.

Le contenu en lipides cellulaires est majoritairement constitué de triglycérides (45-55% en masse par rapport aux lipides totaux) et d'acides gras libres (40% en masse des lipides). Des stérols et des phospholipides ont été détectés en quantités minimes.

Tout au long de sa croissance, le microorgnisme augmente, de manière peu habituelle, son pourcentage d'acide stéarique cellulaire. L'obtention de compositions en lipides intracellulaires très intéressantes, avec des pourcentages élevés en acide stéarique (55-70%) et non négligeables en acides oléique (10-24%) et palmitique (aux alentours de 15%), a été observée. Un succédané de beurre de cacao a été synthétisé avec une approche différente par rapport à celles proposées dans la littérature.

La croissance de la souche peut être divisée en trois phases bien séparées : d'abord (0-50h) une phase de consommation rapide de substrat extracellulaire accompagnée d'une croissance cellulaire et une importante accumulation des graisses cellulaires
ensuite (50-100h), une phase de consommation des lipides accumulés malgré la présence relativement importante du substrat lipidique extracellulaire
finalement (100-240h), une phase de consommation de substrat extracellulaire alors que la concentration des lipides cellulaires diminue lentement.

De la biomasse exempte de lipides est formée lors des dernières phases (50-240h) de la fermentation. L'origine de la "cassure" de consommation du substrat extracellulaire lors de la deuxième phase, reste inconnue.

La cinétique des acides gras extracellulaires a montré une affinité importante de la souche vis-à-vis des acides gras insaturés (C18:1 et C18:2) et les acides gras à une chaîne aliphatique intermédiaire (C12:0 et C14:0). La spécificité se montre moins haute pour l'acide palmitique, et surtout pour l'acide stéarique, qui est le seul acide gras disparaissant très lentement par le milieu de culture.

Y. lipolytica a présenté une croissance cellulaire importante quand elle s'est développée sur des substrats carbonés composés des mélanges des acides gras libres saturés et insaturés. Un succédané microbien de beurre de cacao a été synthétisé. Dans une prochaine étape, nous allons nous intéresser au comportement bio-physiologique de la souche sur des substrats carbonés composés des oses, en imposant des conditions opératoires qui favorisent le processus d'accumulation lipidique à partir de ces milieux (forte limitation en azote).

III. CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR DES SUBSTRATS OSIDIQUES : PRODUCTION D'ACIDE CITRIQUE

L'utilisation des graisses en tant que sources carbonées, permet une bonne croissance cellulaire de Yarrowia lipolytica. Cependant, la souche employée est capable d'utiliser d'autres substrats carbonés comme les composés osidiques. Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la réponse biochimique du microorganisme sur des substrats carbonés constitués de sucres. Les composés osidiques utilisés, sont le glucose, le glycérol pur, le glycérol technique et des mélanges des ces sources carbonées.

Des rapports molaires C/N élevés sont utilisés afin de favoriser l'accumulation des lipides intracellulaires à partir de ces substrats osidiques. Il est, en effet, connu que l'accumulation des graisses cellulaires s'amorce dès lors qu'il y a limitation en azote dans le milieu de fermentation. Néanmoins, peu de souches de Y. lipolytica sont connues pour être capables d'accumuler de quantités élevées en graisses cellulaires à partir des milieux osidiques limités en azote, puisque, la plupart des fois, la limitation en azote provoque une accumulation importante d'acide citrique dans le milieu de fermentation.

La croissance cellulaire (vitesse spécifique de croissance, de consommation du substrat, rendement cellulaire), la production d'acide citrique (vitesse spécifique et rendement de production de citrate), la quantité et la composition des lipides cellulaires produits ainsi que la morhologie de la souche sont étudiés quand le glycérol technique, un co-produit industriel peu valorisé actuellement, est utilisé comme substrat carboné. Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus sur glucose, considéré comme un substrat-référence.

III.1. Introduction

In a previous investigation, the response of the oleaginous yeast Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 was studied, when an industrial derivative of animal fat, composed of saturated free fatty acids, was used as sole carbon and energy source. Significant cell growth, accompanied by high intracellular fat accumulation (until 54% w/w of lipids in dry matter), was observed. The pH of the culture medium remained practically constant, as negligible amounts of organic acids were produced during this type of bioconversion (Papanikolaou et al., a).

It is known that the onset of lipid accumulation in oleaginous microorganisms growing on oses, is correlated with nitrogen exhaustion of the culture medium (Boulton and Ratledge, 1980; Ratledge, 1994). Though, few Y. lipolytica strains have been reported to accumulate intracellularly significant amounts of fats, from osidic nitrogen-limited media (Ratledge, 1994). In contrast, most of the times, the growth is followed by a significant citric acid production, as strains of Y. lipolytica (as well as of the fungus Aspergillus niger) are considered to be the potential microbial producers of this organic acid (Hamissa and Radwan, 1977; Aiba and Matsuoka, 1979; Klasson et al., 1989; Wojtatowicz et al., 1991; Roukas and Kotzekidou, 1997).

During the present work, the physiological behaviour of Y. lipolytica growing on osidic substrates and particularly on technical-raw glycerol is studied. High initial C/N molar ratios are employed in order to produce significant cellular lipid and/or organic acid (mainly citrate) amounts.

Numerous carbon sources, such as molasses, n-paraffins, hexadecanes, edible oils, glucose, starch hydrolyzates etc, have been used in order to produce citric acid from Y. lipolytica strains (Wojtatowicz et al., 1991; Rane and Sims, 1993; Barth and Gaillardin, 1997). Few investigations have been realized, though, with glycerol employed as sole substrate (Barth and Gaillardin, 1997). However, in other types of bioconversions, glycerol, as carbon source, has been broadly used (e. g. production of 1-3 propanediol, Biebl et al., 1992; Menzel et al., 1997).

Whatever the fermentation mentioned, pure glycerol (purity 98%) was employed as carbon substrate, as few microorganisms present significant tolerance on the impure-technical glycerol, by-product of the bio-diesel production process; the salts released from the oil transesterification, presented in technical glycerol, exert significant inhibitory effects on many microorganisms. In our knowledge, only few Clostridium butyricum strains have been reported to grow on raw glycerol (Petitdemange et al., 1995). Technical glycerol can become an important feedstock when bio-diesel is applied on a large commercial scale. With the production of 10 kg of bio-diesel from rapeseed oil, 1 kg of glycerol becomes available (Meesters et al., 1996).

The aim of the present investigation is to study the biochemical response Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 on raw glycerol. Growth parameters are compared with those obtained from glucose, as this substrate, broadly employed in the literature, can be considered as a reference.

III.2. Results

III.2.1. Growth on glucose

Growth is realized firstly on glucose as this substrate has been broadly used in the literature. The growth on this substrate will be considered as basis in order to be compared with the one obtained on technical glycerol. Relatively high molar ratios C/N are employed, though intracellular lipid accumulation does not occur (5-9% w/w of lipids in dry matter). Cell growth is accompanied by the production of organic acids, resulting in a decrease of the culture medium pH (Table III. 1).

Table III. 1
Growth and citric acid production by Y. lipolytica on glucose. All representations and calculations are realized when citric acid presents its maximum concentration.

	Glc consumed (g/l)	C/N molar	X (g/l)	$Y_{X/Glc}$ (g/g)	pH_0	pH_f	Cit_{max} (g/l)	Carbon recovery % w/w
U.B.M.[1]	30.2	97	5.8	0.19	6.0	3.1	5.9	47
U.B.M.[2]	29.9	97	6.5	0.22	5.0	2.7	<0.5	37
B.M.[3]	28.1	97	5.2	0.19	6.5	4.3	10.9	66
B.M.[4]	28.9	115	6.1	0.21	6.5	5.4	9.7	61

U.B.M.: unbuffered medium

B.M.: buffered medium

1. Incubation time 69 h, initial glucose 30.2 g/l, determined after sterilization
2. Incubation time 110 h, initial glucose 30.4 g/l, determined after sterilization
3. Incubation time 110 h, initial glucose 28.1 g/l, determined after sterilization
4. Incubation time 118 h, initial glucose 34.5 g/l, determined after sterilization

Citrate is the principal organic acid produced. Its maximum concentration, though, is significantly influenced by the medium pH; in general, buffered culture media result in increased citric acid concentrations and in higher carbon recoveries during growth (average biomass structure is considered as $C_5H_7NO_2$). In contrast, maximum

biomass value and yield $Y_{X/Glc}$ are not affected by the pH evolution. The production of other organic acids (mainly iso-citrate, acetate and α-ketoglutarate) is low (iso-citrate corresponding to 1.5-4%, acetate to 4-7% and α-ketoglutarate to 5-8% w/w of the citric acid amount) and equally unaffected by the pH evolution.

Kinetics of the pH evolution and the citric acid production are presented in Figure III. 1.

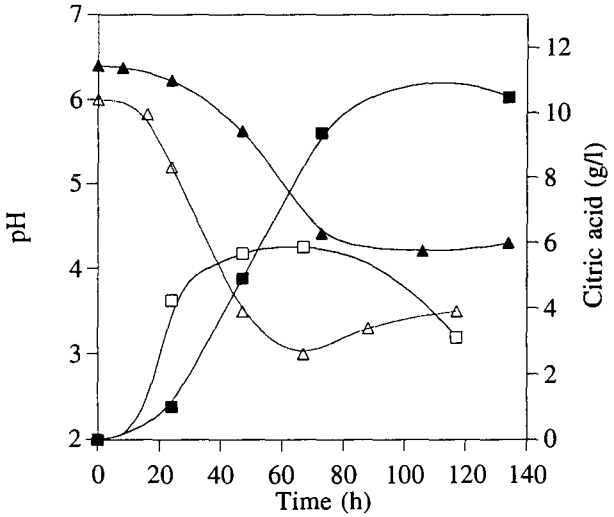


Figure III. 1
Growth of Y. lipolytica on glucose. Evolution of pH (triangles) and citric acid (squares) in non-buffered media (open symbols) and in buffered media (filled symbols).
Culture conditions:
buffered medium - initial glucose concentration 28 g/l, molar ratio C/N 97,
unbuffered medium - initial glucose concentration 30 g/l, molar ratio C/N 97.

A rapid decrease of the medium pH, results in lower maximum citric acid concentrations. However, citric acid production rate is higher in the unbuffered medium than in the buffered one (0.4 against 0.25 g/l.h respectively).

The kinetics of one characteristic case (buffered medium) is presented in Figure III. 2.

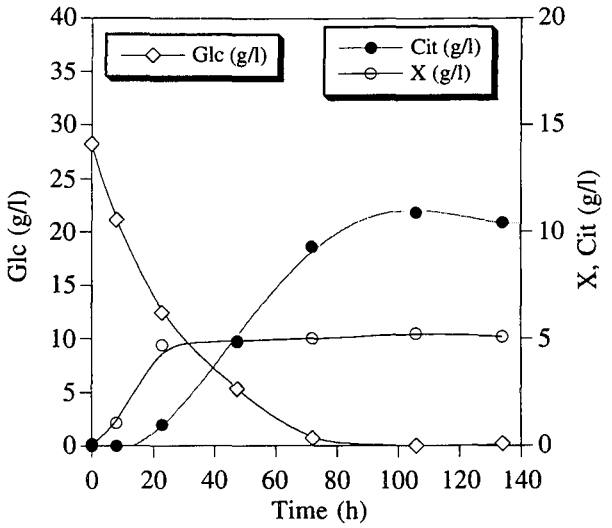


Figure III. 2
Biomass (X), glucose and citric acid evolution of Y. lipolytica growing on glucose. Culture conditions: buffered medium, initial glucose concentration 28 g/l, initial molar ratio C/N 97.

The specific growth rate is about 0.25 h^{-1} whereas the overall yield $Y_{X/Glc}$ is 0.19 g/g. Relatively high quantities of citric acid are produced (maximum concentration around 11 g/l, global yield $Y_{Cit/Glc}$ 0.39 g/g). The specific consumption rate of glucose (ν_{Glc}) is constant (0.08 g/g.h), while the specific citrate production rate (π_{Cit}), is 0.04 g/g.h. Two well separated phases are observed during this type of bioconversion: firstly the growth phase, in which almost all of the substrate is used for biomass production (until almost 20 hours after inoculation, with a partial yield $Y_{X/Glc}$ about 0.30 g/g) and then the stationary phase in which glucose is principally tranformed in citric acid (yield $Y_{Cit/Glc}$ about 0.80 g/g). After the sugar has been exhausted, some consumption of the citric acid produced is obseved.

III.2.2. Growth on technical glycerol

High cell growth is observed on raw glycerol; intracellular fat accumulation does not take place (5-9% w/w of lipids in dry matter). Cell growth is followed by a significant acidification of the culture medium (Table III. 2).

Table III. 2
Growth and citric acid production by Y. lipolytica on technical glycerol. All representations and calculations are realized when citric acid presents its maximum concentration.

	Glol consumed (g/l)	C/N molar	X (g/l)	$Y_{X/Glol}$ (g/g)	pH_0	pH_f	Cit_{max} (g/l)	Carbon recovery % w/w
U.B.M.[1]	30.2	98	6.5	0.22	6.0	3.5	1.2	46
U.B.M.[2]	28.6	98	6.0	0.21	5.0	2.4	<0.5	42
B.M.[3]	31.6	98	7.7	0.24	6.5	4.5	11.9	73
B.M.[4]	38.8	147	7.8	0.20	6.5	4.5	13.7	64

U.B.M.: unbuffered medium

B.M.: buffered medium

1. Incubation time 88 h, initial glycerol 30.2 g/l, determined after sterilization
2. Incubation time 88 h, initial glycerol 30.2 g/l, determined after sterilization
3. Incubation time 106 h, initial glycerol 31.6 g/l, determined after sterilization
4. Incubation time 118 h, initial glycerol 45.9 g/l, determined after sterilization

Citric acid is the principal organic acid produced. In buffered media, increased concentrations of citric acid and higher carbon recoveries are obtained during growth. As in the glucose fermentation case, maximum biomass value and yield $Y_{X/Glol}$ are not affected by the pH evolution, whereas the production of other organic acids (mainly iso-citrate, acetate and α-ketoglutarate) is low (iso-citrate corresponding to 1.5-4%, acetate to 4-9% and α-ketoglutarate to 5-7% w/w of the citric acid amount).

The pH evolution and the citric acid production curves are presented in Figure III. 3. As in the case of glucose, a rapid decrease of the medium pH induces lower maximum citric acid concentrations.

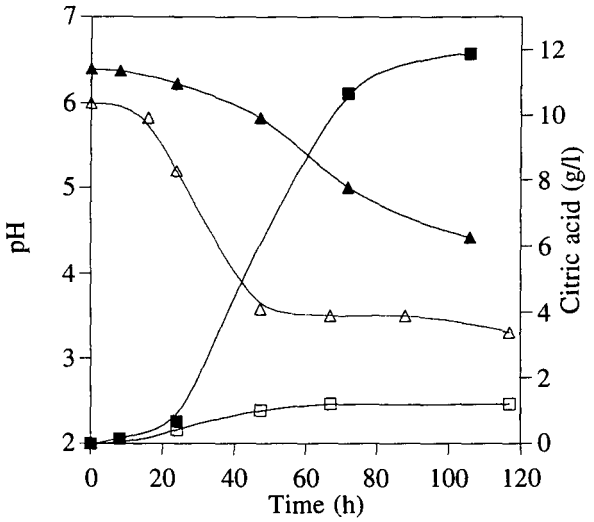


Figure III. 3
Growth of Y. lipolytica on technical glycerol. Evolution of pH (triangles) and citric acid (squares) in unbuffered media (open symbols) and in buffered media (filled symbols).
Culture conditions:
buffered medium - initial glycerol concentration 31 g/l, molar ratio C/N 98
unbuffered medium - initial glycerol concentration 30 g/l, molar ratio C/N 98.

The kinetics of one characteristic case (buffered medium) is presented in Figure III. 4; the specific growth rate, estimated in the early exponential growth phase, is around 0.2 h^{-1}. The global yield $Y_{X/Glol}$ is 0.24 g/g. Relatively high amounts of citric acid are produced (maximum concentration close to 12 g/l, global yield $Y_{Cit/Glol}$ around 0.38 g/g and π_{Cit} 0.04 g/g.h). Glycerol is completely consumed (v_{Glol} constant 0.05 g/g.h). As in the glucose case, citric acid is principally formed at the stationary growth phase; in the first fermentation step (until 20 hours after inoculation) glycerol is almost completely used for biomass formation with a yield $Y_{X/Glol}$ about 0.48 g/g. Then, citric acid production is enhanced (yield $Y_{Cit/Glol}$ about 0.5 g/g), whereas biomass concentration presents a further increase. In addition, after the total exhaustion of the glycerol from the culture medium, some consumption of the accumulated citrate is observed (Figure III. 4).

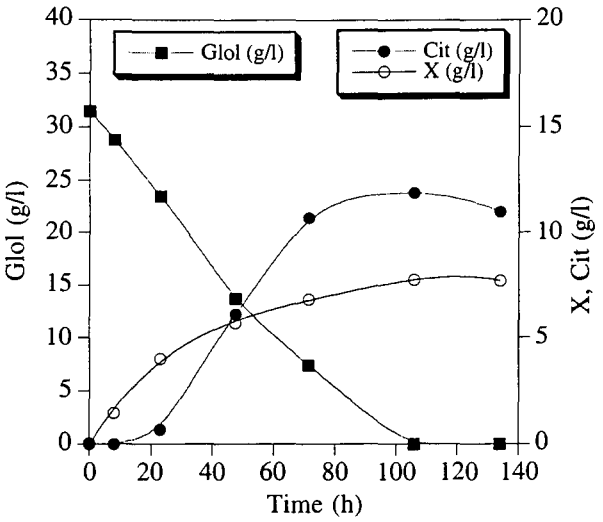


Figure III. 4
Biomass (X), glycerol and citric acid evolution of Y. lipolytica growing on technical glycerol. Culture conditions: buffered medium, initial glycerol concentration 31 g/l, molar ratio C/N 98.

A similar experiment using pure glycerol (purity 98%) as sole carbon source, is also conducted showing equivalent kinetic parameters (μ_{max} near 0.2 h^{-1}, $Y_{X/Glol}$ 0.23 g/g, maximum citric acid near 11 g/l, $Y_{Cit/Glol}$ 0.36 g/g and π_{Cit} 0.04 g/g.h).

III.2.3. Growth on mixtures of technical glycerol and glucose

Glucose and technical glycerol are used as simultaneous carbon sources in order to compare their uptake rates. In all cases, higher assimilation rates of glycerol than those of glucose are observed; at the end of growth, glycerol is exhausted from the culture medium whereas significant quantities of glucose remain unconsumed, regardless of the initial amounts of each substrate used. Relatively high quantities of citric acid (10-15 g/l) are produced as the growth is conducted in buffered media (Table III. 3).

Table III. 3
Growth and citric acid production by Y. lipolytica on mixtures of technical glycerol and glucose in buffered media. All representations and calculations are realized when citric acid presents its maximum concentration.

Glc consumed (g/l)	Glol consumed (g/l)	C/N molar	X (g/l)	pH_0	pH_f	Cit_{max} (g/l)	Carbon recovery % w/w
6[1]	18.5	90	6.1	6.5	5.1	9.1	75
11.3[2]	15.0	120	6.4	6.5	4.5	9.8	76
9.9[3]	20.8	120	8.0	6.5	5.1	10.1	73
3.7[4]	31.5	160	6.0	6.5	4.3	14.9	68

1. Incubation time 98 h, initial glucose 9 g/l, initial glycerol 18.5 g/l, determined after sterilization
2. Incubation time 115 h, initial glucose 21.2 g/l, initial glycerol 15 g/l, determined after sterilization
3. Incubation time 135 h, initial glucose 15.8 g/l, initial glycerol 20.8 g/l, determined after sterilization
4. Incubation time 150 h, initial glucose 16.5 g/l, initial glycerol 31.5 g/l, determined after sterilization

As in the case of glucose or glycerol fermentations, citric acid biosynthesis is realized at the stationary growth phase; in the first growth step, the substrates are used mainly for biomass formation and then citric acid production is enhanced, while the biomass concentration presents a feeble further increase.

The production of other organic acids (iso-citrate, acetate and α-ketoglutarate) is low.

One of the glycerol/glucose co-utilization cases showing the specificity of the microorganism on these substrates, is presented in Figure III. 5.

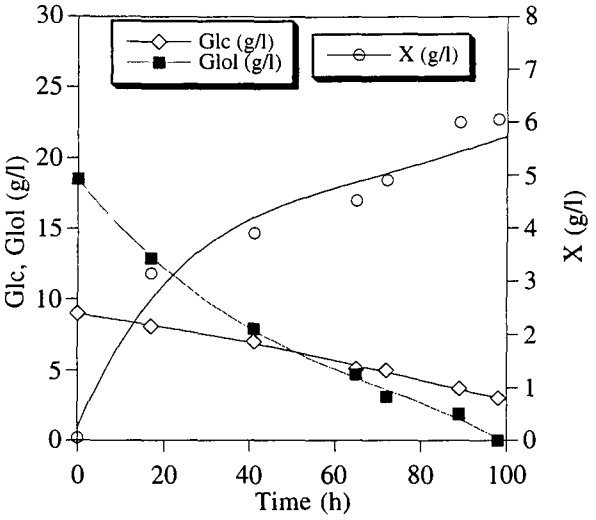


Figure III. 5
Biomass (X), glycerol and glucose evolution of Y. lipolytica growing on a mixture of glucose and technical glycerol. Culture conditions: buffered medium, initial glycerol concentration 18 g/l, initial glucose concentration 9 g/l, molar ratio C/N 90.

Significant cell growth takes place and total consumption of glycerol is realized. Glucose uptake is clearly lower than the one of glycerol. The same pattern (clearly higher uptake rate of glycerol over glucose) is observed during all other cultures realized.

III.2.4. Citric acid production from technical glycerol

Industrial glycerol seems to be a suitable substrate for citric acid production. Growth and citric acid production parameters have been found to be similar to those obtained from glucose, whereas glycerol uptake is higher than the one of glucose, when both substrates are available for the strain.

In order to increase citric acid production, the growth of Y. lipolytica is conducted in media presenting high concentrations of industrial glycerol and increased initial C/N molar ratios. Buffered media are employed, whereas 500-600 μl of KOH 5M are periodically added to each flask so as to maintain the medium pH in values between 5 and 6.

The obtained results are presented in Table III. 4. In both cases, Y. lipolytica proceeds at high glycerol assimilation and increased citric acid production (33-35 g/l 236h after inoculation), while the overall yield $Y_{Cit/Glol}$ observed is slightly higher (0.42-0.44 g/g) than those obtained during the previous experiments.

Table III. 4
Citric acid production by Y. lipolytica growing on substrates with high initial technical glycerol concentrations. Fermentation stopped 236h after inoculation, all representations and calculations are realized for the end of the fermentation.

Glol consumed (g/l)	C/N molar	X (g/l)	$Y_{X/Glol}$ (g/g)	Cit_{max} (g/l)	$Y_{Cit/Glol}$ (g/g)
76.9[1]	261	6.8	0.09	33.6	0.44
83.4[2]	388	5.8	0.07	35.1	0.42

1. Initial glycerol 80.3 g/l, determined after sterilization
2. Initial glycerol 119.2 g/l, determined after sterilization

Other organic acids produced in lower quantities, are the iso-citric, the acetic and the α-ketoglutaric acid, (iso-citrate corresponding to 3-6%, acetate to 1-3% and α-ketoglutarate to 4-6% w/w of the citric acid amount produced).

One of the above mentioned experiments is presented in Figure III. 6.

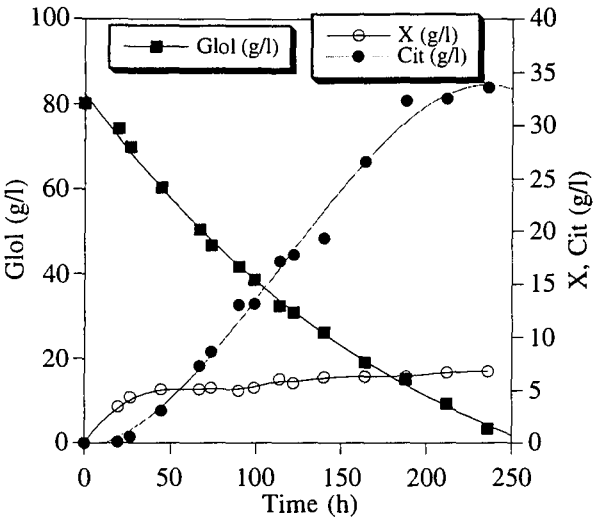


Figure III. 6
Biomass (X), glycerol and citric acid evolution of Y. lipolytica growing on technical glycerol. Culture conditions: buffered medium, periodicall addition of KOH 5M (pH 5-6), initial glycerol concentration 80 g/l, molar ratio C/N 261.

As in all other fermentations conducted, citric acid production is realized at the stationary growth phase (final concentration close to 34 g/l, partial yield $Y_{Cit/Glol}$ 0.51 g/g, π_{Cit} 0.04 g/g.h, volumetric productivity 0.15 g/l.h. At the first growth steps, glycerol is mainly used for biomass formation (partial yield $Y_{X/Glol}$ 0.45 g/g).

III.2.5. Citrate excretion and extracellular nitrogen

Citric acid excretion is enhanced due to nitrogen limitation on the culture medium. In the first growth phase, Y. lipolytica proceeds at a rapid nitrogen assimilation whereas the stationary growth phase (followed by the citrate biosynthesis) arrives when the concentration of the extracellular total nitrogen presents a critical value about 0.02 g/l (Figure III. 7).

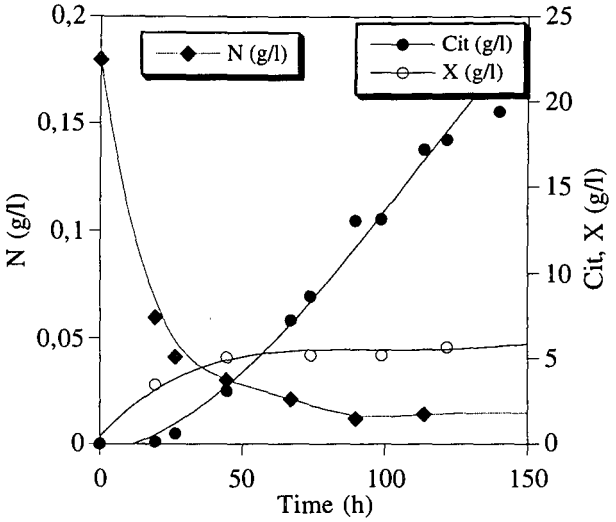


Figure III. 7
Biomass (X), citric acid and total extracellular nitrogen (N) evolution of Y. lipolytica growing on technical glycerol. Culture conditions: buffered medium, periodicall addition of KOH 5M (pH 5-6), initial glycerol concentration 80 g/l, molar ratio C/N 261.

This value should correspond to the extracellular non-assimilable nitrogen of the culture medium. In other bioconversions conducted, the total nitrogen has been determined showing equivalent kinetic results; the extracellular citric acid accumulation is enhanced when the total nitrogen concentration was close to 0.02 g/l.

III.2.6. Morphology and cellular lipid analysis of Y. lipolytica

Yeast response (e. g. morphology and cellular lipid composition) is studied during all runs. In all cases, Y. lipolytica develops it's yeast form, whereas the presence of true mycelium is negligible. In contrast, growth of Y. lipolytica on industrial fats composed of saturated free fatty acids employed as sole carbon substrate, was followed by a significant presence of real mycelia (unpublished data).

Cellular lipids are measured and their composition is studied for all cultures. The percentage of lipids in dry matter is between 5 and 9% (w/w) in all cases. Cellular lipids are mainly composed of polar fractions (phospholipids) and sterols. Triglycerides are not

detected, so, although high initial molar ratios C/N are employed into the culture medium, the microorganism does not accumulate reserve lipids.

In experiments with glucose as substrate, microbial growth is accompanied by a change of the cellular fatty acid composition as a function of the fermentation time (Table III. 5).

Table III. 5
Cellular fatty acid composition (% w/w) of Y. lipolytica growing on glucose (mean of three experiments). Culture conditions: buffered medium, glucose 28 g/l, molar ratio C/N 97.

Growth phase	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Exponential (17h)	18	25	23	14
Early stationary (25.5h)	13	8	51	19
Stationary (51h)	15	12	40	19
Stationary (90h)	17	13	42	16
Stationary (120h)	10	9	45	17

At the exponential growth phase, the percentage of stearic acid is significant (25% w/w) while it decreases at the stationary growth phase (8-13% w/w). In contrast, the percentage of oleic acid, relatively low (23% w/w) at the exponential growth phase, increases significantly at the early stationary phase (51% w/w) and it is found at 45% at the stationary phase. This pattern (significant stearic acid amounts at early cell growth) is observed during all other growths conducted on glucose.

Cell growth on technical glycerol is not accompanied by significant cellular fatty acid composition changes; during all growth phases, the cellular lipid profile is almost constant with high percentages (w/w) of oleic and linoleic acid (about 45 and 20% respectively) and lower percentages of stearic and palmitic acid (about 10 and 15% respectively) (data not shown). Almost the same cellular fatty acid composition (with high oleic acid percentages and lower ones for palmitate, stearate and linoleate, for all growth phases) is observed when cell growth of Y. lipolytica is carried out on mixtures of glucose and technical glycerol used as co-substrates (data not presented).

III.3. Discussion

Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 presents high cell growth on osidic substrates composed of glucose or raw-industrial glycerol. Growth is accompanied by significant organic acid (mainly citrate) production, while intracellular fat accumulation does not take

place. The biomass yield on glycerol is slightly higher than the one obtained on glucose, whereas, for equivalent experiments, citric acid production (Cit_{max} and global yield $Y_{Cit/Ose}$) is similar for both substrates. When the culture medium is buffered, maximum concentrations of citric acid as well as yields $Y_{Cit/Glol}$ ($Y_{Cit/Glc}$) are relatively high (10-15 g/l and 0.35-0.4 g/g respectively). In contrast, unbuffered media present lower maximum citrate concentrations and decreased carbon recoveries; an increased energy of maintenance requirement as well as an excessive CO_2 production during the cultures in unbuffered media could explain the obtained finding, as, in addition, the production of other organic acids (mainly α-ketoglutarate, iso-citrate and acetate) is not high and unaffected by the pH evolution, in all cases. After the exhaustion of sugars from the culture medium, some consumption of the citric acid produced is observed (in agreement with Guttierrez et al., (1993) who proceeded at citric acid production from glucose and galactose by a Candida guillermondii strain).

The use of glucose and raw glycerol as co-substrates shows that the amounts of glycerol assimilated by Y. lipolytica are much higher than those of glucose. It can be assumed, hence, that either the carrier of glucose and glycerol is the same with a preference on glycerol transport - in the yeasts, it is considered however, that the carriers of glucose and glycerol are different - or the enzymic activity of the catabolic C6 pathway of the glycolysis (6-PFK...) is decreased due to the energy excess in the C3 pathway (glycerol catabolisme). This pattern of catabolism is similar to the findings of Biebl and Marten (1995), who reported that a Clostridium butyricum strain consumed simultaneously glucose and glycerol used as co-substrates, with a glucose uptake significantly lower than that of glycerol.

Technical-raw glycerol, hence, seems a very efficient substrate for citric acid production. Use of high initial amounts of this substrate (80 and 120 g/l) results in a significant increase of citric acid production (final concentration 33-35 g/l). High citric acid production (overall yields $Y_{Cit/Glc}$ 0.5-0.8 g/g with final concenrations 50-80 g/l) has been already reported for strains of Candida sp. (mainly Y. lipolytica) growing on glucose (150-200 g/l) under nitrogen limitation (initial C/N ratios higher than 150 mol/mol) by several investigators, in batch, fed-batch and continuous cultures (Briffaud and Engasser, 1979a; b; Klasson et al., 1989; Wojtatowicz et al., 1991; Rane and Sims, 1993; 1994; 1995).

During batch fermentations, citric acid formation is realized at the stationary growth phase when the extracellular nitrogen is the limiting factor of cell growth (Engasser and Briffaud, 1979a; Rane and Sims, 1993). In general, during the first bioconversion steps, biomass formation is observed (partial yields $Y_{X/Glc}$ 0.30-0.47, Briffaud and Engasser, 1979a; Klasson et al., 1989; Wojtatowicz et al., 1991). After the nitrogen source has been depleted, Y. lipolytica uses most of the remaining sugar for citrate production, with some further increase in biomass (Briffaud and Engasser, 1979a;

Wentworth and Cooper, 1996). In addition, citric acid biosynthesis is favoured under efficient aeration conditions of the culture medium and for this reason, growths have been observed on stirred tank reactors, highly aerated and agitated (Briffaud and Engasser, 1979a; Klasson et al., 1989; Wojtatowicz et al., 1991; Rane and Sims, 1993; 1994; 1995).

Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 growing on glucose or technical glycerol, is developed under it's yeast form. The presence of true mycelium is negligible. However, growth of Y. lipolytica on industrial fats composed of saturated free fatty acids used as sole carbon substrate, was followed by a significant production of real mycelia (unpublished data). In general, the morphology of this fungus depends on a variety of nutritional and environmental conditions (Novotny et al., 1994; Bhushan and Hoondal, 1996; Zinjarde et al., 1998).

The percentage of lipids in dry matter is only 5-9% (w/w) in all cases, whereas the cellular lipids are mainly composed of polar fractions (phospholipids) and sterols. In spite of the high initial C/N molar ratios employed in the culture medium, cell growth is followed by significant citric acid production, virtually without intracellular lipid accumulation. It can be assumed hence, that the enzyme-key capable of the intracellular cleavage of the citric acid in order to enhance triglycerides biosynthesis, the ATP-citrate lyase, does not exist in this strain (it is known that the immediate precursor of the intracellular lipid accumulation in the oleaginous microorganismes during the *de novo* biosynthesis, is the cellular citric acid - Botham and Ratledge, 1979; Boulton and Ratledge, 1980; Ratledge, 1994).

Cellular fatty acid composition of the strain growing on glucose, shows a decrease of stearic acid and an increase of the oleic acid at the late cell growth steps. In contrast, at exponential growth phase, the amount of stearic acid is significant (25% w/w). The change of the cellular lipid profile as a function of the fermentation time has been already observed by Aggelis et al., (1996), with oleaginous yeasts growing on glucose in carbon and nitrogen limited media. Moreover, it is considered that the change of the cellular lipid profile during the cell growth is a factor that could be taken under consideration for yeast's classification (Smit et al, 1987; Ratledge, 1994).

In contrast of the results obtained on glucose, the cell growth on raw glycerol or on mixtures of glucose and glycerol is not accompanied by significant modifications of the cellular fatty acid composition. In all growth phases, the percentage (w/w) of oleic and linoleic acid is high (about 45 and 15% respectively), whereas that of stearic and palmitic acid is lower. The high presence of unsaturated fatty acids in cellular lipids of Y. lipolytica even at early cell growth phase, could be related to increased biological activity, explaining the high uptake rate of glycerol; it is known that cellular unsaturated fatty acids have been found to be required as a component of yeast mitochondrial lipid to permit the coupling of electron transport to phosphorylation and active cation transport. In addition,

the physical state of lipid component has been deduced to be a factor influencing membrane capacity for oxygen uptake. Arrhenius plots of membrane-bound enzymes showed that the unsaturated fatty acids induced a lowering of the energy of activation, due to presumed conformational changes in the membrane structure in the immediate vicinity of the enzymes (Rattray et al., 1975).

Raw glycerol seems a suitable substrate for citric acid production by Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1. Relatively high amounts of this acid have been produced (33-35 g/l); although it is plausible to wait for better productivities with an amelioration of the operating conditions conducted (use of bioreactors, growth on constant pH, increase of agitation and aeration rate).

III.4. Conclusion

Le glycérol industriel représente un substrat carboné favorable à la croissance cellulaire de Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1. Les paramètres de croissance sont similaires à ceux obtenus avec le glucose utilisé en tant que seul substrat carboné.

Malgré les rapports C/N élevés utilisés, le microorganisme n'a pas accumulé des réserves lipidiques significatives, puisque la limitation azotée a conduit à la production d'acides organiques (surtout du citrate) dans le milieu de fermentation. Dans tous les cas, des pourcentages de 5 à 10% en masse des lipides cellulaires, majoritairement composés des fractions polaires et des stérols, ont été observés. Aucun triglycéride n'a été détecté. La composition des lipides cellulaires a montré une prédominance des acides gras insaturés (surtout de l'oléate et du linoléate) dans quasiment toutes les étapes de la fermentation.

La croissance cellulaire de Y. lipolytica sur des milieux non tamponnés a eu comme résultat une chute très rapide du pH du milieu de culture. Ceci a résulté à une production d'acide citrique beaucoup moins importante par rapport aux milieux tamponnés. Dans tous les cas, la production d'autres acides organiques (acétate, α-cétoglutarate, iso-citrate) a été faible (1,5-9% en masse par rapport à la concentration du citrate).

La co-utilisation de glucose et de glycérol technique conduit à une vitesse de consommation du glycérol beaucoup plus élevée que celle du glucose. Dans nos conditions opératoires, le glycérol a toujours été totalement consommé alors que le glucose restaient présent en quantités importantes. Ce type de métabolisme montre que l'activité enzymatique de la voie des C6 du catabolisme glycolytique est bloqué en raison de l'excès de flux carboné sur la voie des C3 (catabolisme du glycérol).

Le glycérol technique s'avère un substrat adapté à la croissance cellulaire et à la production d'acide citrique par Y. lipolytica. L'utilisation de concentrations relativement élevées en glycérol technique (80 et 120 g/l), favorise une augmentation significative de la concentration finale en acide citrique (jusqu'à 35 g/l) dans des conditions expérimentales non optimales. Ce résultat paraît encourageant en vue d'une production d'acide citrique, dans des conditions de mise en œuvre améliorées.

L'utilisation des oses en tant que substrats carbonés a permis une bonne croissance cellulaire de Y. lipolytica. La composition totale des lipides cellulaires, avec une prédominance de l'acide oléique (45-50% en masse), a présenté des différences fondamentales comparée à celle obtenue lors de la croissance du microorganisme sur la stéarine (80% de stéarate en masse des lipides totaux). Ceci nous conduit à nous intéresser sur la croissance de la souche en mélanges des oses et de stéarine. L'objectif de ce travail est d'utiliser les deux types de substrats de façon à déterminer les conditions de

mise en culture favorisant l'orientation du métabolisme cellulaire vers l'obtention de profils lipidiques intracellulaires caractéristiques, ressemblant au beurre de cacao.

IV. CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR DES MELANGES DE STEARINE ET D'OSES : PRODUCTION D'ACIDE CITRIQUE ET DE LIPIDES CELLULAIRES

Les résultats précédents ont montré les potentialités d'utilisation de la stéarine ou des oses (glucose et glycérol technique) comme sources carbonées de Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1. De différences notables au niveau de leur métabolisme chez cette souche ont été observées. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la mise en culture de la levure Y. lipolytica sur ces deux types de substrat utilisés simultanément. Puisque la culture sur stéarine aboutit à une formation des lipides cellulaires très riches en acide stéarique (80% w/w) et pauvres en acides gras insaturés (<3% w/w), alors que la croissance sur les oses montre une composition exactement inverse, le but de cette partie est de déterminer les conditions expérimentales pour essayer d'orienter le métabolisme cellulaire vers la synthèse d'une graisse cellulaire ayant une composition prédéterminée, proche de celle du beurre de cacao. Parallèlement, il apparaît utile d'étudier les cinétiques comparatives d'assimilation des sucres et des lipides mais aussi de production d'acide citrique.

IV.1. Introduction

Some microorganisms, called oleaginous, have been reported to accumulate storage lipids up to 60% of their dry weight (Ratledge, 1987; 1994). The accumulated oil is composed mainly of triacylglycerols (80-90% w/w), with a fatty acid composition similar to many plant seed oils (Ykema et al., 1988; Davies and Holdsworth, 1992).

Media used for microbial lipid production contained as carbon source sugars (Boulton and Ratledge, 1980; Davies and Holdsworth, 1992; Aggelis et al., 1996), vegetable oils (Aggelis et al., 1995a; b; Aggelis and Sourdis, 1997), alkanes (Thorpe and Ratledge, 1972; Ratledge, 1984), ethanol (Emelyanova, 1997), glycerol (Meesters et al., 1996a; b), citric acid (Aggelis, 1996), acetic acid (du Preez et al., 1997) or mixtures of glucidic and lipidic substrates (Gierhart, 1982a; b; Davies and Holdsworth, 1992).

In a previous investigation, cell growth and lipid accumulation of Y. lipolytica have been studied on industrial fats (mixtures of stearin and hydrolyzed oleic rapeseed oil) used as sole carbon source. Rich stearin media favoured the process of intracellular fat accumulation (about 0.44 g of lipids per g of dry matter). The intracellular accumulated lipids presented very high stearic acid amounts (80% w/w of total lipids) and negligible ones of unsaturated fatty acids (Papanikolaou et al., b).

Furthermore, osidic substrates (glucose and raw glycerol), have been used as carbon sources from Y.lipolytica. Similar growth parameters were obtained for both substrates. Although high initial molar ratios C/N were used, lipid accumulation was not favoured (less than 0.1 g of lipid per g of biomass) but relatively high citric acid amounts were produced (final concentrations 10-15 g/l with overall yields $Y_{Cit/Glc}$ (or $Y_{Cit/Glol}$) around 0.4 g/g). The cellular fatty acid composition showed a domination of the oleic acid (45-50% w/w of cellular lipids) (Papanikolaou et al., c).

In the present investigation we were interested in the physiological behaviour (cell growth, lipid accumulation, cellular lipid composition and production of organic acids) of Y. lipolytica growing on mixtures of stearin and oses (glucose or raw glycerol), used as simultaneous carbon substrates. Aim of this study was to synthetize cellular lipids with significant stearate and non negligible palmitate and oleate amounts (a composition close to that of the cocoa-butter). This investigation may include a potential financial interest, as recent international newspaper reports indicate significant problems concerning cocoa-butter production, due to the appearence of harmfull insects and disease infections. This fact can lead to a significant increase of the cocoa-butter price in the future.

IV.2. Results

IV.2.1. Cell growth on mixtures of raw glycerol and stearin

Several kinetic studies with raw glycerol and stearin used as co-substrates are conducted. In all of them, high cell growth is observed (Table IV. 1).

Table IV. 1
Growth of Y. lipolytica on mixtures of stearin and technical glycerol. Parameters of growth, lipid accumulation and citric acid production in media having initial stearin concentration 10 g/l and different initial glycerol concentrations.

Incubation time (h)	C/N molar	$Glol_0$ (g/l)	$Glol_f$ (g/l)	S_f (g/l)	X_{max} (g/l)	L_{max} (g/l)	$K_{L/X}$ (g/g)	Cit_{max} (g/l)
112	55	10	0	5.5	9.7	2.6	0.27	0.9
116	100	11	0	4.4	9.2	1.9	0.20-0.22*	2.5
124	140	23	0	4.4	10.1	2.7	0.26-0.28*	9.5
124	175	34	4.5	4.2	11.5	3.4	0.29-0.33*	12.5

* Coefficient $K_{L/X}$ lies between these values

Both substrates are consumed simultaneously, although, glycerol uptake rate seems to be relatively higher than that of stearin as at the end of growth, significant stearin quantities remain unconsumed whereas high glycerol amounts are assimilated. Lipid accumulation occurs in all cases and seems unaffected by the presence of glycerol as well as by the initial C/N molar ratio employed (L between 1.9 and 3.4 g/l with coefficients $K_{L/X}$ between 0.20 and 0.33 g/g). In contrast, significant production of organic acids (mainly citric acid, in concentrations higher than 9.5 g/l) is observed only in rich glycerol media. Other principal organic acids produced are the acetate (15-20% w/w of the citrate amount), the α-ketoglutarate (8-12% w/w of the citrate amount) and the iso-citrate (1.5-6% w/w of the citrate amount).

The composition of cellular lipids is affected by the stearin/glycerol ratio (Table IV. 2).

Table IV. 2
Cellular lipid composition of Y. lipolytica growing on mixtures of technical glycerol and stearin. Initial stearin concentration 10 g/l, incubation time about 100h.

C/N molar	$Glol_0$ (g/l)	$K_{L/X}$ (g/g)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
55	10	0.27	15	78	5	2
100	11	0.20-0.22	14-17	70-75	4-6	1-2
140	22	0.26-0.28	15-17	66-69	5-8	1-3
175	34	0.29-0.33	13-15	65-69	8-11	2-3

In all cases, major cellular fatty acid, presented in high amounts, is the stearic. Although, it may be observed that, significant glycerol assimilation leads to an increase (w/w) of the cellular unsaturated fatty acids (mainly oleic and linoleic acid).

Lipid accumulation seems to be related to relatively high stearin uptake. In order to confirm this observation, experiments in media having high glycerol and low stearin concentrations (e. g. $Glol_0$ 28 g/l, S_0 7 g/l, C/N 140), are conducted (data not shown). The observed cell growth is significant (X around 9-10.5 g/l, 120h after inoculation) but L_{max} is only 0.9 g/l (coefficient $K_{L/X}$ 0.09 g/g). All of the glycerol was consumed, while only 3 g/l of stearin were assimilated. Moreover, the cellular lipids present lower stearic acid amounts (about 50% w/w) and higher ones for the unsaturated fatty acids (oleic and linoleic acid percentages were 15-17% and 5-7% respectively).

One of the stearin/glycerol experiments is presented in Figure IV. 1a and b.

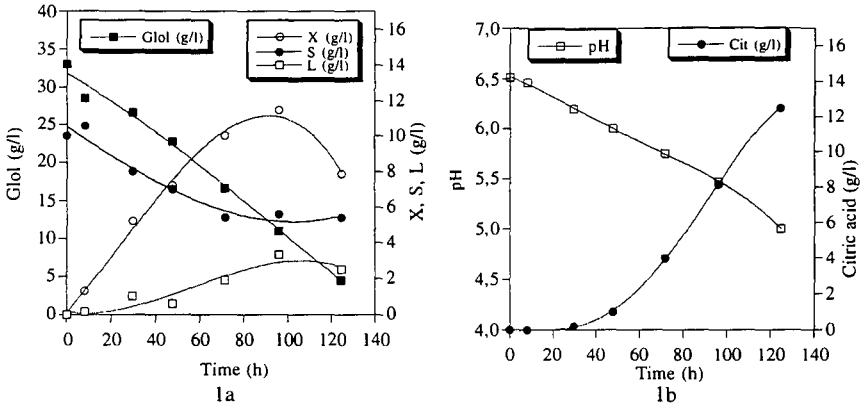


Figure IV. 1
Biomass (X), glycerol (Glol), stearin (S), cellular lipids (L) (1a) pH and citric acid (1b) evolution of Y. lipolytica growing on a mixture of stearin and technical glycerol. Culture conditions: glycerol 34 g/l, stearin 10 g/l, molar ratio C/N 175.

The fermentation was stopped 124h after inoculation as the principal objective is to study the response of the microorganism when the cellular lipids present their highest value. Significant cell growth, simultaneous uptake of the two carbon substrates, increased lipid accumulation and relatively high citric acid production are observed. The

specific rate of glycerol consumption (ν_{Glol}) is constant (0.035 g/g.h), while that of stearin (ν_S) is around 6 mg/g.h. Relatively increased citric acid production (π_{Cit} 0.02 g/g.h) and lipid accumulation (π_{Lx} 3 mg/g.h) are observed (Figure IV. 1a and b).

The cellular lipid composition is studied in all growth steps (Table IV. 3).

Table IV. 3
Cellular lipid composition of Y. lipolytica growing on a mixture of technical glycerol and stearin. Culture conditions: glycerol 34 g/l, stearin 10 g/l, initial molar ratio C/N 175.

		Stearin fatty acid composition[1]			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
		25	52	2	<0.5
		Cellular lipid composition			
Time (h)	$K_{L/X}$(g/g)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
8	0.14	13	60	23	3
30	0.19	15	57	17	4
71	0.19	19	64	9	2
96	0.29	15	65	11	3
124	0.33	15	69	8	3

1. Other non-presented fatty acids are mainly the lauric - C12:0 (10% w/w) and the myristic - C14:0 acid (10% w/w)

The amount of stearic acid is high in all phases (57-69% w/w). In contrast, the percentage of oleic acid is significant in the first fermentation step (about 23% w/w) while it decreases afterwards to reach 8% (w/w). The amount of palmitic acid is relatively higher (13-19% w/w).

Moreover, the analysis of extracellular lipids (Figure IV. 2) shows that the microorganism presents a high specificity for lauric (C12:0) and myristic (C14:0) acids which disappear rapidly from the culture medium.

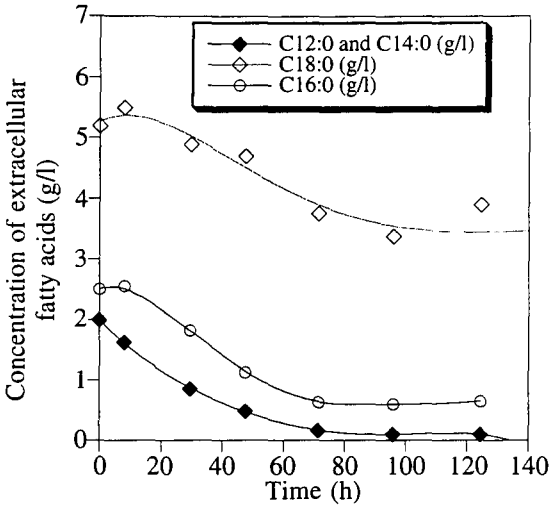


Figure IV. 2
Kinetics of extracellular free fatty acid incorporation during growth of Y. lipolytica on a mixture of stearin and technical glycerol. Culture conditions: glycerol 34 g/l, stearin 10 g/l, molar ratio C/N 175.

These two fatty acids are principally used for growth needs as their percentages are negligible in the cellular lipids (data not shown). The specificity for the palmitic acid (C16:0), is relatively high. In contrast, lower is the specificity for the stearic acid, which is the only fatty acid remaining unconsumed at the end of cell growth. Similar extracellular fatty acid evolutions are observed during all other stearin/glycerol growths conducted.

IV.2.2. Cell growth on mixtures of glucose and stearin

Y. lipolytica presents significant cell growth with simultaneous consumption of glucose and stearin (Table IV. 4).

Table IV. 4
Growth of Y. lipolytica on mixtures of stearin and glucose. Parameters of growth, lipid accumulation and citric acid production in media having initial stearin concentration 10 g/l and different initial glucose concentrations.

Incubation time (h)	C/N molar	Glc_0 (g/l)	Glc_f (g/l)	S_f (g/l)	X_{max} (g/l)	L_{max} (g/l)	$K_{L/X}$ (g/g)	Cit_{max} (g/l)
140	100	10	0	4.1	7.7	0.5	0.07	1.7
100	145	21	5.9	4.9	9.3	2	0.18-0.22*	3.9
101	180	34	13.9	5.3	8.7	1.7	0.17-0.19*	5.9

* Coefficient $K_{L/X}$ lies between these values

Lipid accumulation is observed; however, it it lower than that obtained on the similar glycerol/stearin bioconversions, even if the observed stearin uptake is quite high. Especially in one case (Glc_0 10 g/l, S_0 10 g/l), the concentration of accumulated lipids is indeed low ($K_{L/X}$ 0.07 g/g), although 5.9 g/l of stearin are assimilated.

Glucose uptake is relatively high, though lower compared with that of glycerol (for similar runs); in two of the cases, significant glucose amounts remain unconsumed into the culture medium (5.9 and 13.9 g/l for C/N 145 and 180 respectively) at the end of growth. A citric acid production (lower than that of glycerol/stearin fermentations) is observed too. Other organic acids produced are mainly the acetate, the α-ketoglutarate and the iso-citrate (each of them presenting 2-6% w/w of the citrate amount).

In addition, cellular lipid composition is affected by the glucose/srearin ratio (Table IV 5).

Table IV. 5
Cellular lipid composition of Y. lipolytica growing on mixtures of glucose and stearin. Initial stearin concentration 10 g/l, incubation time about 100h.

C/N molar ratio	Glc_0 (g/l)	$K_{L/X}$ (g/g)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
100	10	0.05-0.07	17-23	45-50	17-20	5-8
145	21	0.18-0.22	15-18	63-69	7-10	2-4
180	34	0.17-0.19	13-15	65-69	7-9	2-3

In the high glucose concentration media, the intracellular lipid synthesis is a relatively favoured process ($K_{L/X}$ 0.17-0.22 g/g); the accumulated lipids contain increased stearic acid amounts (63-69% w/w), while unsaturated fatty acids (e. g. oleic and linoleic acid) are found in lower percentages (7-10 and 2-4% respectively). In the case of 10 g/l initial glucose concentration medium, lower stearic (45-50% w/w) and higher oleic and linoleic acid (17-20 and 4-8% w/w respectively) amounts are observed in the cellular lipids. In this case, lipid accumulation is not favoured ($K_{L/X}$ 0.05-0.07 g/g).

In addition, media containing high glucose and low stearin concentrations (e. g. Glc_0 25 g/l, S_0 7 g/l, C/N 130) do not favour lipid accumulation (L_{max} 0.5 g/l, $K_{L/X}$ 0.05-0.07 g/g) (data not shown). The uptake of stearin as well as the cell growth are significant, while glucose assimilation is observed but it is lower compared with that of glycerol (for the similar experiment) (X around 10-11 g/l, 15 g/l of glucose and 5.5 g/l of stearin have been assimilated 130h after inoculation). The cellular lipids present the following composition (about 100h after inoculation): C16:0 20-25% w/w, C18:0 40-50% w/w, C18:1 11-17% w/w, C18:2 4-7% w/w).

One of the stearin/glucose experiments is presented in Figures IV. 3a and b.

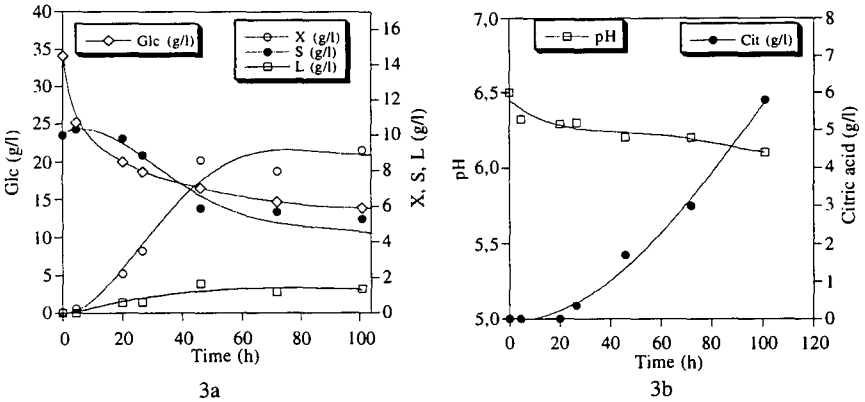


Figure IV. 3

Biomass (X), glucose (Glc), stearin (S), cellular lipids (L) (Fig. 3a) pH and citric acid (Fig. 3b) evolution of Y. lipolytica growing on a mixture of stearin and glucose. Culture conditions: glucose 34 g/l, stearin 10 g/l, molar ratio C/N 180.

The fermentation was stopped 100h after inoculation as, again, the main objective is to study the response of the microorganism when the cellular lipids present their

highest value. Significant cell growth accompanied by a simultaneous uptake of glucose and stearin is observed. Lipid accumulation occurs, but it is lower than the similar glycerol/stearin bioconversion (L_{max} 1.7 g/l, with $K_{L/X}$ 0.19 g/g). The specific rate of glucose consumption (v_{Glc}) is about 0.020 g/g.h while that of stearin (v_S) is 5.5 mg/g.h. Moreover, a production of organic acids is realized (mainly citric acid in a final concentration 6 g/l).

The composition of cellular lipids is studied in all growth phases (Table IV. 6).

Table IV. 6
Cellular lipid composition of Y. lipolytica growing on a mixture of glucose and stearin. Culture conditions: glucose 34 g/l, stearin 10 g/l, initial molar ratio C/N 180.

		Stearin fatty acid composition			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
		25	52	2	<0.5
		Cellular lipid composition			
Time (h)	$K_{L/X}$ (g/g)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
20	0.26	8	34	34	13
26.5	0.17	10	31	38	13
46	0.19	15	68	8	3
72	0.15	13	76	6	3
100	0.16	16	67	8	3

In first step of cell growth, the oleic acid is found into the cellular lipids in relatively high amounts (34% w/w) while it decreases afterwards to 8% w/w. The stearic acid percentage was 34% in the first growth step, reaching the amount 67% 100h after inoculation.

Furthermore, the extracellular fatty acid analysis shows similar results with the ones obtained on glycerol/stearin bioconversions (data not shown). The microorganism presents high specificity for the lauric (C12:0) and the myristic (C14:0) acid, completely disappeared from the growth medium in the first growth step. The specificity for the palmitic acid (C16:0) is relatively high, whereas lower is that for the stearic acid (C18:0), which is the principal fatty acid remaining unconsumed at the end of growth.

IV.2.3. Cell growth on mixtures of glucose, technical glycerol and stearin

Y. lipolytica presents significant cell growth when stearin, glucose and industrial-raw glycerol are used as simultaneous carbon substrates (data not shown). The osidic consumption is sequential; raw glycerol is rapidly assimilated, while at the same time the uptake rate of glucose is decreased. When low amounts of glycerol remain unconsumed into the culture medium, a relatively high glucose assimilation is observed. As for the free fatty acids incorporation, it is conducted regardless of that of sugars. Though, it is low; in all cases, stearin is the only substrate remaining into the culture medium in significant amounts at the end of growth. In addition, relatively significant amounts of citric acid (other organic acids are the iso-citrate, the acetate and the α-ketoglutarate) are produced.

The quantity of lipids accumulated inside the yeast cells is not very high ($K_{L/X}$ 0.07-0.15 g/g). The cellular lipids present the following medium composition (about 100h after inoculation): C16:0 18-25% w/w, C18:0 45-60% w/w, C18:1 14-20% w/w, C18:2 4-7% w/w).

The evolution of extracellular fatty acids during cell growth is studied, verifying the obtained results of glycerol or glucose/stearin fermentations; the fatty acids with low aliphatic chain (e. g. lauric and myristic acid) disappear rapidly from the culture medium. Relatively high is the specificity for the palmitate whereas lower is that for the stearate, which is the main fatty acid presented in the culture medium at the end of growth.

IV.3. Discussion

Previous works showed that Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 presents significant cell growth from industrial fats (mixtures of stearin and hydrolyzed oleic rapeseed oil). Rich stearin medium favours intracellular lipid accumulation (until 44% w/w of lipids per dry matter); in this case, the major cellular fatty acid was the stearic presented in very high concentrations (about 80% w/w), whereas negligible amounts of oleic acid (about 1-2% w/w) were detected (Papanikolaou et al., b). In addition, growth of Y. lipolytica on glucose or raw glycerol in nitrogen-limited media, was followed by low lipid accumulation ($K_{L/X}$ lower than 0.1 g/g). The cellular fatty acid composition showed a predominance of oleic acid and linoleic acid (about 45-50 and 15-18% w/w respectively) (Papanikolaou et al.,c). Aim of the present study was to investigate the possibility of growth of Y. lipolytica on mixtures of stearin, technical glycerol and glucose, in order to direct the cellular metabolism towards the accumulation of fats presenting high stearic and non negligible oleic acid amounts (a lipid composition similar to that of the cocoa-butter).

The first worth-noticing result is that, in agreement with Kim et al., (1997), the consumption of osidic (glucose or glycerol) and lipidic (free fatty acis) substrates is

simultaneous. Moreover, sugar (glycerol or glucose) catabolism, leading to citric acid biosynthesis, is not affected by the presence of fat as co-substrate in the culture medium. Nevertheless, Y. lipolytica shows higher osidic consumption (and increased citric acid production) during growth on glycerol/stearin mixtures than on glucose/stearin ones (for similar experiments). It is noted, though, that growth of Y. lipolytica on glucose or raw glycerol used as sole substrates, gave similar kinetic parameters, total sugar consumption and equivalent citric acid production for both cases (Papanikolaou et al., b). It may be considered, hence, that the presence of fat as co-substrate, could affect the carrier of glucose, but not that of glycerol (it is known that the transporters of these two molecules are different in the yeast cells - Nevoigt and Stahl, 1997). Another hypothesis that may explain the relatively lower uptake of glucose compared with the one of glycerol, is that the presence of exogenous free fatty acids (or their intracellular metabolism) could decrease the carbon flux in the pentose-phosphate catabolic pathway; it is known that the glucose catabolism in the yeast cells is realized both via the pentose-phosphate and the EMP pathway (in the respitory-sufficient yeasts like Y. lipolytica, though, the major catabolic way is that of the pentose-phosphate - Aggelis et al., 1998) while that of glycerol is conducted only via the EMP glycolysis.

In addition, simultaneous use of glucose, stearin and glycerol, leads to a glucose assimilation only when glycerol concentration in the culture medium is low (the stearin uptake is realized regardless of the presence of sugars into the medium). Similar behaviour has been observed with the simultaneous use of glucose and raw glycerol as co-substrates (Papanikolaou et al.,c).

The process of lipid accumulation is critically influenced by the substrate composition; when glycerol is used as co-substrate, cell growth is accompanied by relatively high accumulation of cellular lipids. In this case, lipid synthesis occurs only when the consumption of stearin is significant and regardless of the initial C/N molar ratio employed. In contrast, when glucose is used as co-substrate, lipid accumulation is lower (maximum $K_{L/X}$ 0.22 g/g), although significant stearin incorporation is observed, it seems, hence, that glucose is an inadequate substrate for this type of bioconversion.

The lipid accumulation obseved during the present investigation, is lower than that reported when stearin has been used as sole carbon and energy substrate (maximum coefficient $K_{L/X}$ obtained in this work 0.33 g/g against 0.44 g/g on stearin fermentation, Papanikolaou et al., b). However, an increase of the cellular unsaturated fatty acid level, the main aim of the investigation, has been observed (oleic acid 7-20% w/w, linoleic acid 2-7% w/w). The presence of cellular unsaturated fatty acids in relatively high amounts, a worth-noticing finding, indicates that *de novo* fatty acid biosynthesis is conducted, in spite of the presence of exogenous fatty acids found into the culture medium. On the contrary, Meyer and Schweizer, (1976) reported that low extracellular pentadecanoic acid concentrations (e. g. about 0.3% w/v) were capable of completely repressing the fatty

acid synthetase activity of another Candida lipolytica strain, having as a result, only the presence of odd fatty acids into the cellular lipids (initial sugar concentration was 2% w/v).

A significant modification of the cellular lipids is realized; cellular lipids with relatively similar composition to that of the cocoa-butter are obtained (Figure IV. 4).

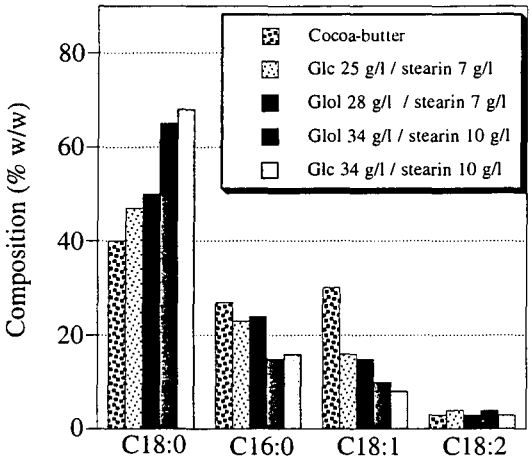


Figure IV. 4
Fatty acid composition (% w/w) of cocoa-butter and cellular lipids of Y. lipolytica growing on different stearin/glycerol or stearin/glucose ratios (data shown when $K_{L/X}$ is maximum at every case).

In all cases, the cellular lipids present increased stearic and non negligible palmitic and oleic acid amounts. In addition, it may be observed that, when lipid accumulation is relatively high ($K_{L/X}$ 0.25-0.33 g/g), the amount of cellular stearic acid is higher than 60% w/w whereas the total saturated fatty acid content (16:0 and 18:0) is over 70% w/w of the accumulated fat (cocoa-butter contains 33-40% w/w of stearic acid and 60-67% w/w of saturated fatty acids). In contrast, when the lipid accumulation is not favoured (cases of Glc_0 25 g/l, S_0 7 g/l and $Glol_0$ 28 g/l, S_0 7 g/l), the composition of cellular lipids is closer to that of the cocoa-butter.

The strategy followed during the present work in order to synthetize this cocoa-like-fat, is completely different than those appeared in the literature; the capacity of a microorganism to present at the same significant lipid accumulation and very high cellular

stearic acid content (around 80% w/w while the total unsaturated fatty acid content was lower than 3% w/w - case of Y. lipolytica growing on stearin) is a rather unexpected result. The main problem to solve, hence, was the adverse of that met in the literature: how to decrease the amount of cellular stearic acid, increasing the unsaturated fatty acid content. The use of industrial glycerol (or glucose) as co-substrate, served to decrease the stearic acid percentage, increasing the oleic and linoleic acid amounts. For the same purpose, in a previous work, hydrolyzed oleic rapeseed oil has been used as another stearin co-substrate; similar results were obtained, as, in that case too, the strain presented the unusual capacity to increase its cellular stearic acid level, even if this fatty acid was found in low concentrations in the culture medium. When lipid accumulation was relatively high (28-35% w/w of lipids in dry matter), a medium cellular lipid profile was as follows: C18:0 59-67% w/w, C16:0 8-15% w/w, C18:1 12-18% w/w, C18:2 2-5% w/w (Papanikolaou et al., b). In addition, it has to be noted that industrial substrates and by-products such as the stearin and the raw glycerol have been rarely used in such types of bioconversions.

In general, the research groups dealing with the production of cocoa-butter substitutes by fermentative means, confront exactly the opposite problem than that of the present study: how to increase the stearic acid content, with a simultaneous decrease the unsaturated fatty acids, usually predominant in the oleaginous yeasts (in general, the total amount of unsaturated fatty acids is 60-80% w/w). Several approaches have been followed. One of them, relatively similar to the present work, includes the growth of oleaginous yeasts on stearic acid or its derivatives (Matsuo et al., 1981) or on mixtures of oses and stearic acid (Gierhart, 1982a, b). In the later case, the sugars are mainly used for growth needs while the fatty acids serve mainly to modify the metabolism of the yeast cells in order to produce microbial lipids with particular fatty acid composition (with relatively high amounts of stearic acid, similar to the cocoa-butter) (Gierhart, 1982a; b). Other strategies conducted in order to increase the cellular saturated fatty acid content are the use of Δ_9 and Δ_{12} desaturase inhibitors (Moreton, 1985; Ratledge, 1994), the low oxygenation of the fermentation medium (Davies et al., 1990) and the genetic engineering so as to obtain mutants defective in the conversion of stearoyl-CoA to oleoyl-CoA (Ykema et al., 1990).

The co-utilization of glucidic and lipidic substrates has taken place many times. Most of them, the aim was to produce biosurfactants by the yeast Torulopsis (Candida) bombicola (Asmer et al., 1988). In general, the fermentation was conducted with the use of glucose and palm oil (Davies and Holdsworth, 1992), but in at least one case, animal fat has been used as co-substrate (Desphande and Daniels, 1995).

Analysis of the non-consumed lipids shows the same pattern in all cases: a rapid incorporation of the lauric (C12:0) and the myristic (C14:0) acid. These fatty acids are used for growth needs as they are not detected in high amounts into the cellular lipids.

Relatively high is the specificity for the palmitic acid (C16:0), which was partially oxidized and partially accumulated. In contrast, lower was the specificity for the stearic acid (C18:0). In the literature, Y. lipolytica is considered to possess two different fatty acid carrier systems, one being specific for the C12 and C14 fatty acids, the other for C16 and C18 saturated and unsaturated fatty acids (Barth and Gaillardin, 1997).

IV.4. Conclusion

Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 a présenté une croissance cellulaire importante sur la stéarine et le glycérol technique (ou le glucose) utilisés en tant que co-substrats. Le microorganisme a procédé à une assimilation simultanée des deux types des sources carbonées dont il dispose (oses et acides gras libres). Le catabolisme des oses, conduisant à la biosynthèse d'acide citrique, n'a pas été affecté par la présence de la stéarine en tant que co-substrat dans le milieu de culture. Néanmoins, le glycérol a été assimilé avec une vitesse relativement plus importante par rapport au glucose, ce qui a eu comme résultat une acidification plus importante du milieu de culture lors des fermentations de glycérol/stéarine.

Le processus d'accumulation lipidique est critiquement influencé par la composition du milieu de culture; en général, la co-utilisation de glycérol/stéarine aboutit à des concentrations plus élevées en lipides cellulaires par rapport à celle de glucose/stéarine (pour des expériences similaires), ce qui montre que le glycérol constitue un co-substrat plus adéquat par rapport au glucose, pour ce type de biotransformation. Le processus d'accumulation lipidique s'effectue seulement quand une consommation importante en stéarine est observée et il est indépendant du rapport initial C/N utilisé.

La composition des lipides cellulaires a présenté une augmentation des acides gras insaturés (C18:0 55-70% w/w, C18:1 7-20% w/w, C18:2 3-7% w/w) par rapport à la fermentation de la stéarine (C18:0 78-81% w/w, C18:1 1-2% w/w), mais en général la concentration en lipides cellulaires était moins haute. De même, le pourcentage en lipides par rapport à la matière sèche était diminué comparé à celui obtenu lors des fermentations de stéarine, utilisée comme seul substrat.

Quand l'accumulation lipidique était relativement importante ($K_{L/X}$ 0,25-0,33 g/g), l'acide stéarique dépassait le pourcentage de 60% w/w (dans le beurre de cacao est de 33-40% w/w). Par contre, quand l'accumulation lipidique était moins haute ($K_{L/X}$ 0,08-0,12 g/g) la composition des lipides cellulaires était plus proche à celle du beurre de cacao.

L'evolution des acides gras extracellulaires a été suivie. Le microorganisme a présenté une affinité très importante pour les acides gras à une chaîne aliphatique intermédiaire (C12:0 et C14:0), qui, en général, ont été incorporés rapidement et utilisés pour les besoins énergétiques du microorganisme. Le microorganisme a présenté une spécificité relativement haute pour l'acide palmitique, alors que l'acide stéarique a été incorporé moins rapidement et il était le seul acide gras présent dans le milieu de culture, en concentrations hautes, vers la fin de l'expérience.

V. MODELISATION DE LA CROISSANCE DE Yarrowia lipolytica SUR DE MELANGES LIPIDIQUES ET SUR GLYCEROL TECHNIQUE

La première partie de ce travail a conduit à déterminer certaines caractéristiques cinétiques concernant la croissance de la levure Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1, la consommation des substrats carbonés lipidiques et osidiques ainsi que la production d'acide citrique et l'accumulation des graisses intracellulaires. Les données fournies par les expériences préalables, forment un ensemble adéquat, en vue d'une modélisation préliminaire du comportement cinétique de la souche évoluant sur différents substrats carbonés. Malgré la connaissance, encore relativement limitée, par rapport à l'explication des différents phénomènes bio-physiologiques ayant lieu, la construction de modèles mathématiques basés sur des hypothèses émises auparavent, paraît envisageable. Ainsi, dans un premier temps, nous allons essayer de modéliser la croissance cellulaire et l'accumulation-dégradation des réserves lipidiques de Y. lipolytica se développant sur des milieux lipidiques (mélanges de l'huile de colza oléique hydrolysée et de stéarine). Ensuite, le développement d'un modèle cinétique décrivant et la croissance sur glycérol technique et la production d'acide citrique va être effectué.

V.1. Modélisation d'accumulation et de dégradation des réserves lipidiques chez Yarrowia lipolytica utilisant des graisses industrielles comme seule source carbonée

V.1.1. Introduction

Peu de travaux ont été consacrés à la modélisation du processus d'accumulation des lipides cellulaires chez les microorganismes oléagineux. Etant donné la nouveauté du sujet ainsi que de la complexité des fermentations, l'objectif de ce travail est de proposer une approche de modélisation relativement globale du phénomène d'accumulation et de dégradation des réserves lipidiques chez les microorganismes oléagineux à partir des milieux lipidiques. Cette approche est basée sur les travaux portant sur la modélisation de la croissance du champignon Mucor circinelloides sur l'huile de tournesol (Aggelis et al., 1995a; b; Aggelis et Sourdis , 1997).

V.1.2. Phénomènes pris en compte et hypothèses

D'après la conception du modèle numérique proposé, la masse sèche microbienne totale (biomasse totale X) correspond à la somme des lipides intracellulaires totaux accumulés (L) et de la biomasse exempte de lipides X_f. De plus, cette approche conduit à considérer que la biomasse exempte de lipides peut consommer de substrat lipidique extracellulaire ainsi que les lipides accumulés au sein des levures. Ceci sousentend qu'une quantité du substrat extracellulaire sert à la création des lipides cellulaires (Figure V. 1).

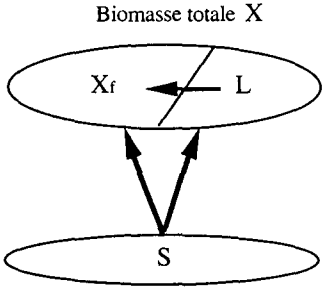


Figure V. 1
Présentation des compartiments pris en compte pour le développement du modèle.
(X) biomasse totale, (L) lipides totaux, (X_f) biomasse exempte de lipides,
(S) substrat lipidique.

Tout le comportement physiologique de la cellule est contrôlé par la biomasse exempte de lipides X_f puisque, celle-ci contient les acides nucléiques, les systèmes de la synthèse des protéines et tous les complexes enzymatiques.

Dans le modèle proposé, la quantité des lipides totaux (L) considérée, correspond à l'extrait Folch (chloroforme/méthanol 2/1); ceci signifie que la masse totale des lipides comprend l'ensemble des lipides structuraux (L_S, phospholipides et d'autres lipides polaires qui ne peuvent pas être dégradés) et des lipides accumulés (L_a). Cette première approche de modélisation, ne prend pas en compte la distinction faite entre lipides structuraux et lipides accumulés.

Dans la plupart des cultures où la matière grasse constitue la seule source carbonée, l'allure cinétique suivante est observée : au cours des premières heures de fermentation, le microorganisme consomme des quantités importantes de substrat lipidique, en présentant, en même temps, une croissance cellulaire élevée ainsi qu'une accumulation significative en réserves lipidiques (jusqu'à 50h après inoculation). Ensuite, (entre 50-100h), le microorganisme procède à une dégradation de ses réserves lipidiques bien que la quantité du substrat résiduel soit relativement importante (1,5-3 g/l). Lors de cette phase de croissance cellulaire, le microorganisme consomme rapidement ses réserves lipidiques alors que l'assimilation de la source lipidique extracellulaire se trouve ralentie par rapport à la phase précédente. Lors de la dernière phase de croissance (100-240h), le microorganisme consomme à nouveau la source lipidique extracellulaire mais à une vitesse réduite (concentration finale des lipides extracellulaires 0,4-0,7 g/l) alors que la quantité des lipides cellulaires reste constante. Lors de l'approche mathématique proposée, le phénomène de l'arrêt de consommation du substrat extracellulaire n'a pas été pris en compte.

L'origine de la "cassure" observée lors de la consommation du substrat résiduel ainsi que de la dégradation des réserves lipidiques, reste à éclaircir. L'hypothèse faite pour procéder à la modélisation est que, les capacités biosynthétiques de la population microbienne ne peuvent pas être assurées par la seule source carbonée extracellulaire, au cours des dernières phases de la croissance (50-240h). C'est pourquoi le pool carboné doit être supplementé par la biodégradation des réserves lipidiques (Holdsworth et Ratledge, 1988; Aggelis et Sourdis, 1997).

Toutes les expériences ont été réalisées en mode discontinu en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml. Il est considéré que le milieu réactionnel est parfaitement mélangé et que le volume liquide reste constant tout au long de la fermentation; les pertes par évaporation sont considérées comme négligeables.

V.1.3. Description du modèle

D'après une des hypothèses émises il est considéré que la variation de la masse microbienne totale (biomasse totale X) correspond à la somme des variations observées en lipides intracellulaires accumulés (L) et en biomasse exempte de lipides (Xf) (Equation V.I.1). Ainsi :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dXf}{dt} + \frac{dL}{dt} \qquad \text{V.I.1}$$

La formation de biomasse exempte de lipides est le résultat de l'utilisation de deux sources carbonées : le substrat lipidique extracellulaire et les réserves lipidiques intracellulaires. La vitesse de sa formation rXf (en g/h) est présentée ci-dessous (Equation V.I.2) :

$$rXf = \mu_{Xf(S)} \cdot Xf \cdot V + \mu_{Xf(L)} \cdot Xf \cdot V \qquad \text{V.I.2}$$

V (en l) est le volume actif de la fermentation.

$\mu_{Xf(S)}$ (en h^{-1}) est la vitesse spécifique de formation de biomasse exempte de lipides à partir du substrat extracellulaire. Elle est définie par l'équation V.I.3, inspirée des modèles proposés par Aggelis et Sourdis, (1997) et Galiotou-Panagiotou et al., (1998) :

$$\mu_{Xf(S)} = \mu_{Xf(S)\,max} \cdot \frac{S}{S_0} \qquad \text{V.I.3}$$

Maximale au début de la fermentation, cette vitesse decroît linéairement avec la diminution du substrat extracellulaire disponible.

$\mu_{Xf(L)}$ (en h^{-1}) est la vitesse spécifique de formation de biomasse exempte de lipides à partir des réserves lipidiques. L'expression de cette vitesse spécifique (equation V.I.4) a été proposée par Aggelis et Sourdis , (1997) :

$$\mu_{Xf(L)} = \mu_{Xf(L)\,max} \cdot \frac{L}{L_{max}} \qquad \text{V.I.4}$$

Il est supposé que le processus de dégradation des réserves lipidiques est amorcé quand les lipides cellulaires ont atteint une concentration maximale.

La variation des lipides des lipides au sein de la cellule microbienne (g de lipides cellulaires / l.h), résulte de l'addition de deux processus inverses; celui de la formation des réserves lipidiques à partir du substrat extracellulaire et celui de la dégradation de ces lipides afin de créer de la biomasse exempte de lipides. L'expression mathématique de cette variation est décrite par l' équation V.I.5 :

$$\frac{dL}{dt} = \pi_L \cdot Xf - \mu_{Xf(L)} \cdot Xf \cdot \frac{1}{Y_{Xf/L}} \qquad \text{V.I.5}$$

π_L (g de lipides /g de biomasse exempte de lipides .h) est la vitesse spécifique d'accumulation des lipides dans les cellules, se présentant sous la forme proposée par Aggelis et Sourdis, (1997) (Equation V.I.6) :

$$\pi_L = \pi_{Lmax} \cdot \frac{S}{S_0} \qquad \text{V.I.6}$$

Cette vitesse spécifique dépend de la quantité du substrat lipidique disponible. Le rendement $Y_{Xf/L}$ correspond à la quantité, en g, des lipides cellulaires consommés pour la création d'un g de biomasse exempte de lipides.

La vitesse de consommation du substrat lipidique extracellulaire rS (g de substrat consommé /h), traduit deux contributions; la création de biomasse exempte de lipides (Xf) et l'accumulation des graisses intracellulaires (Equation V.I.7) :

$$rS = \mu_{Xf(S)} \cdot Xf \cdot \frac{1}{Y_{Xf/S}} \cdot V + \pi_L \cdot Xf \cdot \frac{1}{Y_{L/S}} \cdot V \qquad \text{V.I.7}$$

Le rendement $Y_{Xf/S}$ représente la quantité, en g, de biomasse exempte lipides synthétisée par g de substrat lipidique consommé, alors que le rendement $Y_{L/S}$ est la quantité, en g, des lipides cellulaires accumulés par g de substrat carboné assimilé.

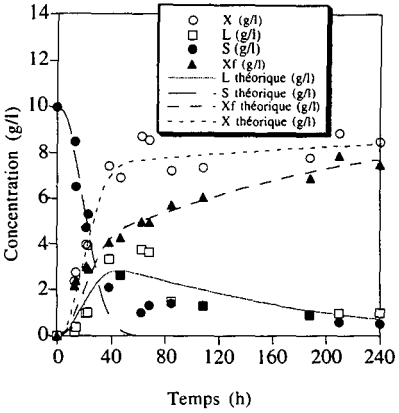
Le modèle final, obtenu à partir des équations de bilan de matière et des hypothèses faites sur le fonctionnement du réacteur, est décrit dans le Tableau V. 1.

Tableau V. 1
Présentation du modèle décrivant la croissance et l'accumulation-dégradation lipidique de la levure oléagineuse Y. lipolytica sur des graisses industrielles.

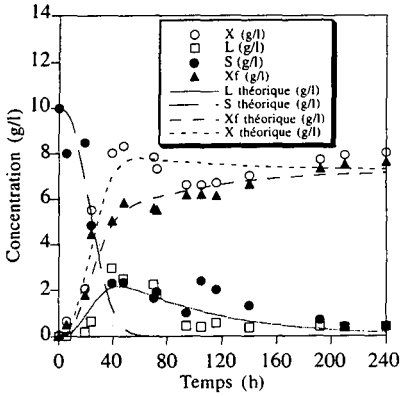
Consommation du substrat lipidique	$-\frac{dS}{dt} = \mu_{Xf(S)} \cdot Xf \cdot \frac{1}{Y_{Xf/S}} + \pi_L \cdot Xf \cdot \frac{1}{Y_{L/S}}$
Production de biomasse exempte de lipides	$\frac{dXf}{dt} = \mu_{Xf(S)} \cdot Xf + \mu_{Xf(L)} \cdot Xf$
Variation des lipides dans la cellule microbienne	$\frac{dL}{dt} = \pi_L \cdot Xf - \mu_{Xf(L)} \cdot Xf \cdot \frac{1}{Y_{Xf/L}}$
Vitesse spécifique de croissance par la consommation du substrat extacellulaire	$\mu_{Xf(S)} = \mu_{Xf(S)\,max} \cdot \frac{S}{S_0}$
Vitesse spécifique de croissance par la consommation des lipides cellulaires	$\mu_{Xf(L)} = \mu_{Xf(L)\,max} \cdot \frac{L}{L_{max}}$
Vitesse spécifique d'accumulation des lipides dans les cellules	$\pi_L = \pi_{L_{max}} \cdot \frac{S}{S_0}$

V.1.4. Application du modèle

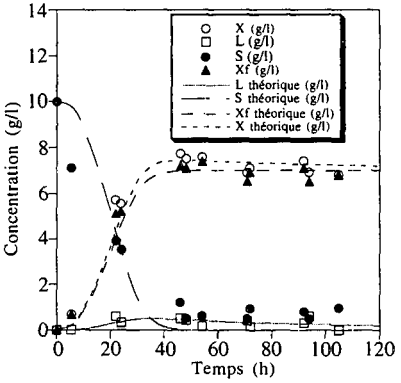
L'application du modèle sur les données expérimentales, a été basée sur les cinétiques obtenues lors du Chapitre II. Il s'agit des cultures en discontinu sur des lipides industriels (mélanges de stéarine et d'huile de colza hydrolysée chimiquement, concentration initiale en substrat lipidique 10 g/l, C/N molaire 35). La composition du substrat carboné affecte l'accumulation lipidique. Celle-ci est d'autant plus faible que le milieu de fermentation est riche en acide oléique. Néanmoins, le modèle a été appliqué dans tous les cas (même si l'accumulation lipidique est très faible). La méthode d'intégration de Runge-Kutta (ordre 4) a été utilisée pour déterminer l'évolution des concentrations (lambda initial 10^{-3}), alors que le processus d'optimisation des paramètres a été effectué par la méthode des moindres carrés. Les Figures V. 2a, 2b et 2c, présentent, de manière comparée, les résultats théoriques obtenus par le modèle et les données expérimentales, pour la biomasse totale (X), la biomasse exempte de lipides (Xf), le substrat résiduel (S) et les lipides cellulaires (L) dans trois cas caractéristiques (mélanges huile de colza oléique hydrolysée HCOH/stéarine 0/100, 50/50, 100/0).



2a



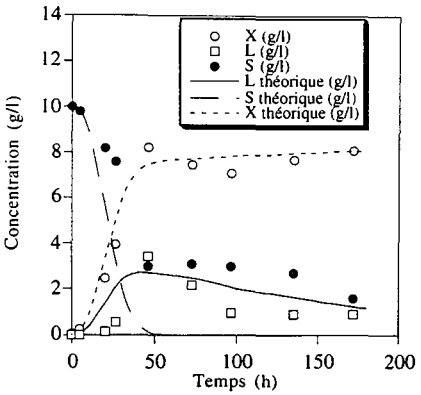
2b



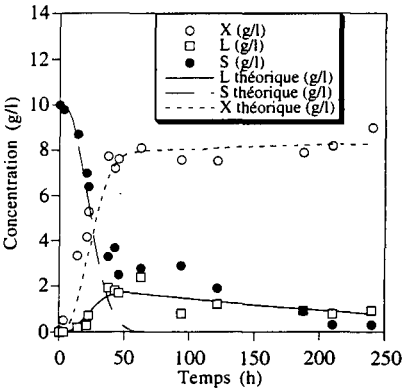
2c

Figure V. 2
Application du modèle sur X, Xf, S et L pour trois cultures de Y.lipolytica.
2a croissance sur huile de colza oléique hybrolysée (HCOH)/stéarine 0/100
2b croissance sur huile de colza oléique hybrolysée (HCOH)/stéarine 50/50
2c croissance sur huile de colza oléique hybrolysée (HCOH)/stéarine 100/0.

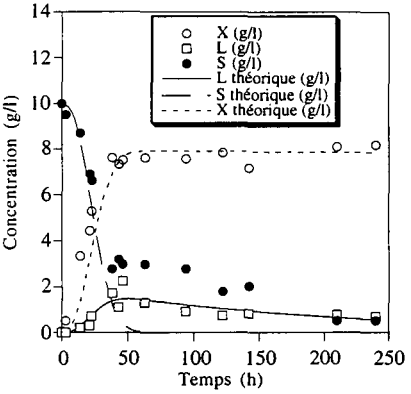
L'application du modèle proposé sur les autres mélanges HCOH/stéarine (X, S, et L) est présentée Figure V. 3a, 3b, 3c, 3d, 3e.


X (g/l)
L (g/l)
S (g/l)
L théorique (g/l)
S théorique (g/l)
X théorique (g/l)
Concentration (g/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
10
12
14
0
50
100
150
200

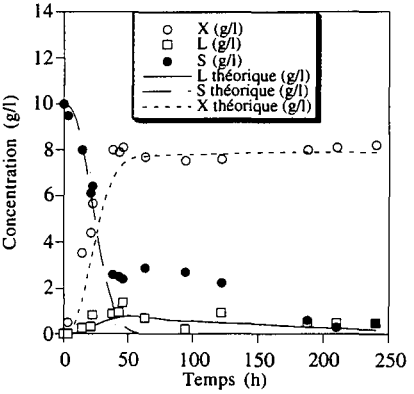
3a


X (g/l)
L (g/l)
S (g/l)
L théorique (g/l)
S théorique (g/l)
X théorique (g/l)
Concentration (g/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
10
12
14
0
50
100
150
200
250

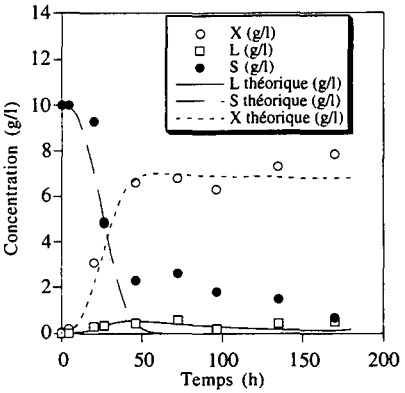
3b


X (g/l)
L (g/l)
S (g/l)
L théorique (g/l)
S théorique (g/l)
X théorique (g/l)
Concentration (g/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
10
12
14
0
50
100
150
200
250

3c


X (g/l)
L (g/l)
S (g/l)
L théorique (g/l)
S théorique (g/l)
X théorique (g/l)
Concentration (g/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
10
12
14
0
50
100
150
200
250

3d



3e

Figure V. 3
Application du modèle sur X, S et L pour des cultures de Y.lipolytica sur différents mélanges d'huile de colza oléique hydrolysée (HCOH) et de stéarine.
3a croissance sur huile de colza oléique hybrolysée (HCOH)/stéarine 25/75
3b croissance sur huile de colza oléique hybrolysée (HCOH)/stéarine 34/66
3c croissance sur huile de colza oléique hybrolysée (HCOH)/stéarine 40/60
3d croissance sur huile de colza oléique hybrolysée (HCOH)/stéarine 60/40
3e croissance sur huile de colza oléique hybrolysée (HCOH)/stéarine 75/25.

L'application du modèle sur les valeurs expérimentales présente :

χ^2 34,98 (35 degrés de liberté - D.L.) pour HCOH/stérine 0/100.

χ^2 42,21 pour HCOH/stéarine 25/75 (20 D.L.)

χ^2 63,79 pour HCOH/stéarine 34/66 (35 D.L.)

χ^2 64,65 pour HCOH/stéarine 40/60 (35 D.L.)

χ^2 40,9 pour HCOH/stéarine 50/50 (35 D.L.)

χ^2 51,36 pour HCOH/stéarine 60/40 (35 D.L.)

χ^2 19,86 pour HCOH/stéarine 25/75 (20 D.L.)

χ^2 14,69 pour HCOH/stéarine 100/0 (29 D.L.).

Il est à noter, par ailleurs, que la vitesse spécifique de croissance sur substrat lipidique extracellulaire est indépendante de la composition du substrat lipidique, puisque des valeurs similaires ont été obtenus dans tous les cas. La même observation peut être faite pour le rendement de conversion $Y_{Xf/S}$.

V.1.6. Comparaison avec les données de la littérature

Le Tableau V. 3 rassemble les valeurs comparées des paramètres estimées dans ce travail à celles définies dans la littérature.

Tableau V. 3

Comparaison entre les paramètres cinétiques estimés par le modèle pour la croissance de Y. lipolytica sur des lipides industriels avec ceux obtenus dans la littérature.

Paramètre	Présent travail		Littérature
L_{max} (g/l)	3,2[a]	2,7[b]	2,1 (Aggelis et al., 1995)[1]
			2,5-3,2 (Moreton, 1985)[2]
$\mu_{Xf(S)max}$ (h^{-1})	0,21[a]	0,20[b]	0,13 (Aggelis et Sourdis, 1997)[1]
			0,20 (Ykema et al., 1986)[3]
			0,15-0,25 (Granger et al., 1992)[4]
π_{Lmax} (h^{-1})	0,16[a]	0,10[b]	0,06 (Aggelis et Sourdis, 1997)[1]
			0,03 (Gill et al., 1977)[5]
$\mu_{Xf(L)max}$ (h^{-1})	$5,1x10^{-3}$[a]	$4x10^{-3}$[b]	$1,4x10^{-2}$ (Aggelis et Sourdis, 1997)[1]
$Y_{Xf/S}$ (g/g)	0,86[a]	0,78[b]	0,49-0,51 (Aggelis et Sourdis, 1997)[1]
			0,55 (Ykema et al., 1986)[3]
$Y_{L/S}$ (g/g)	0,63[a]	0,86[b]	0,58-0,60 (Aggelis et Sourdis, 1997)[1]
			0,41 (Ykema et al., 1986)[3]
			0,55 (Floetenmeyer et al., 1985)[6]
$Y_{Xf/L}$ (g/g)	1,37[a]	0,70[b]	0,63-0,66 (Aggelis et Sourdis, 1997)[1]
			1,7 (Raledge et Holdsworth, 1988)[3]

a. Croissance de la levure Y. lipolytica sur un mélange HCOH/stéarine 0/100

b. Croissance de la levure Y. lipolytica sur un mélange HCOH/stéarine 50/50

1. Déterminé pour Mucor circinelloides sur l'huile de tournesol
2. Déterminé pour Rhodosporidium toruloides sur glucose
3. Déterminé pour Apiotrichum curvatum sur glucose
4. Déterminé pour Rhodotorula glutinis sur glucose
5. Déterminé pour Candida 107 sur glucose
6. Déterminé pour Apiotrichum curvatum sur lactosérum

La vitesse spécifique maximale de formation de biomasse ($\mu_{Xf(S)max}$), présente des valeurs similaires quelle que soit la nature de la source carbonée utilisée (notons au passage que Mucor circinelloides, en tant que champignon, présente une vitesse specifique relativement plus faible comparée aux levures). Le rendement de conversion du substrat carboné en lipides cellulaires ($Y_{L/S}$) présente des valeurs relativement élevées aussi bien pour les substrats osidiques que pour les substrats lipidiques. La même observation peut être faite pour le rendement $Y_{Xf/S}$. En ce qui concerne le processus de dégradation des réserves lipidiques, les données bibliographiques montrent des similarités avec ce travail; elle s'accompagne, en général, d'une augmentation de la concentration de biomasse exempte de lipides; les lipides cellulaires constituent les précurseurs de la biosynthèse des matériaux cellulaires. De plus, la source carbonée intracellulaire est dégradée assez lentement mais elle est accompagnée d'un rendement $Y_{Xf/L}$ assez élevé (parfois plus élevé que $Y_{Xf/S}$). Une explication possible de ce phénomène a été préconisée par Aggelis et Sourdis, (1997) : quand la consommation des réserves lipidiques a lieu, l'incorporation du substrat lipidique extracellulaire est diminué; le tranport actif de chaînes aliphatiques dans la cellule, un phénomène énergetiquement coûteux, est quasiment complètement stoppé et le microorganisme utilise toute la quantité de ses graisses de réserve pour la creation de biomasse exempte de lipides.

V.2. Modélisation de la production d'acide citrique à partir du glycérol technique chez Yarrowia lipolytica

V.2.1. Introduction

Les travaux portant sur la production d'acide citrique par voie fermentaire sont nombreaux. Ce bioprocédé est basé sur l'utilisation des souches de Aspergillus niger et de Candida sp. (plus souvent de Yarrowia (Candida) lipolytica) (Millsom, 1989) sur différent substrats carbonés (sucres, hydrolysats, jus de fruits, lactosérum, hydrocarbures...). De même, plusieurs types de mise en culture (discontinu, discontinu alimenté, continu, recyclage cellulaire, immobilisation des cellules....) ont été proposés (Milssom, 1989). Par contre, les travaux portant sur la modélisation du comportement des souches productrices de cet acide, sont moins développés. Il s'agit, en général, des modèles physiologiques et métaboliques décrivant les flux carbonés à l'intérieur de la cellule de Aspergillus niger (Torres, 1994a; b; Torres et al., 1996) ou de Candida (Yarrowia - Saccharomycopsis) lipolytica (Aiba et Matsuoka, 1979; Kim et Roberts, 1993). De même, quelques modèles cinétiques décrivant la croissance et l'excrétion d'acide citrique (surtout chez des souches de Yarrowia (Candida) lipolytica) ont été proposés (Klasson et al., 1989; Moresi, 1994).

Le modèle proposé dans ce travail, constitue une première approche de la croissance de Y. lipolytica sur glycérol technique et de l'excrétion d'acide citrique en fermentation discontinue. Cette approche a pour base le modèle développé par Klasson et al., (1989), dans le cas de la croissance de Candida lipolytica sur glucose en fermentations discontinues et continues.

V.2.2. Phénomènes pris en compte et hypothèses

La croissance de la levure Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 sur des milieux osidiques en limitation d'azote, aboutit à une biosynthèse relativement importante d'acides organiques, qui provoque une chute de pH du milieu de culture. Afin de modéliser la croissance et la production d'acide citrique, il a été nécessaire de s'intéresser aux fermentations effectuées dans des milieux de culture tamponnés.

Dans toutes les cultures, la même allure cinétique est observée; lors des premières étapes de la fermentation, le microorganisme consomme des quantités significatives en substrat osidique afin de former de la biomasse. Quand la phase stationnaire arrive, l'excrétion de l'acide citrique (et d'autres acides organiques en quantités bien inférieures) est observée, avec, parfois, une augmentation legère de la concentration de la biomasse. La synthèse d'acide citrique démarre après la phase de la croissance à cause d'une limitation du milieu de culture par l'azote extracellulaire.

Toutes les expériences ont été réalisées en mode discontinu en fioles de 250 ml. Le milieu réactionnel est supposé parfaitement mélangé à volume constant, les pertes effectuées par évaporation étant négligées.

V.2.3. Description du modèle

Lors de ce type de fermentation, l'azote constitue le facteur qui limite la croissance cellulaire. La vitesse de croissance cellulaire rX (g/h) se trouve sous la formule suivante (Equation V.II.1) :

$$rX = \mu . X . V \qquad V.II.1$$

V (en l) est le volume actif de la fermentation.

μ est la vitesse spécifique de croissance cellulaire (h^{-1}), dépendante de la concentration de l'azote extracellulaire disponible, comme cela a été proposé par Galiotou-Panagiotou et al., (1998) (Equation V.II.2) :

$$\mu = \mu_{max} . \frac{N}{N_0} \qquad V.II.2$$

La vitesse spécifique de croissance cellulaire diminue en fonction de l'azote extracellulaire disponible (N en g d'azote total / l).

L'expression de la vitesse de consommation de substrat azoté rN (g/h) est présentée ci-dessous (Equation V.II.3) :

$$rN = \mu . X . V . \frac{1}{Y_{X/N}} \qquad V.II.3$$

Le rendement $Y_{X/N}$ correspond à la quantité, en g, de biomasse synthétisée par g d'azote extracellulaire consommé.

La vitesse de production d'acide citrique rCit est présentée ci-après (Equation V.II.4) :

$$rCit = \pi_{Cit} . X . V \qquad V.II.4$$

π_{Cit} est la vitesse spécifique de production d'acide citrique (g de citrate / g de biomasse . h). Lors de l'hypothèse émise afin de créer le modèle proposé, cette vitesse spécifique n'est pas dépendante de la croissance cellulaire, mais seulement du substrat carboné disponible. Il s'agit d'une hypothèse qui, en général, est en accord avec les

données bibliographiques, puisque la production d'acide citrique à partir des milieux osidiques limités en azote, s'effectue seulement lors de l'idiophase (métabolite non-associé à la croissance cellulaire) (Rane et Sims, 1993; Moresi, 1994). La représentation de la vitesse spécifique de production du citrate, ainsi, est la suivante (Equation V.II.5) :

$$\pi_{Cit} = \alpha \cdot \frac{Glol}{Glol_0} \qquad \text{V.II.5}$$

La vitesse de consommation du glycérol, rGlol (g/h), peut être considérée globalement comme la somme des vitesses du glycérol utilisé pour la croissance cellulaire et du glycérol transformé en acide citrique (Equation V.II.6) :

$$rGlol = \mu \cdot X \cdot V \cdot \frac{1}{Y_{X/Glol}} + \pi_{Cit} \cdot X \cdot V \cdot \frac{1}{Y_{Cit/Glol}} \qquad \text{V.II.6}$$

Le rendement $Y_{X/Glol}$ correspond à la quantité, en g, de biomasse synthétisée par g de glycérol consommé, alors que $Y_{Cit/Glol}$ représente la quantité, en g, de citrate formé par g de glycérol consommé.

A partir des équations du bilan de matière et compte tenu des hypothèses faites pour le fonctionnement du réacteur en discontinu, le modèle proposé est synthétisé dans le Tableau V. 4.

Tableau V. 4.
Présentation du modèle proposé décrivant la croissance et la production d'acide citrique de la levure Y. lipolytica à partir de glycérol industriel.

Consommation du glycérol	$-\frac{dGlol}{dt} = \mu \cdot X \cdot \frac{1}{Y_{X/Glol}} + \pi_{Cit} \cdot X \cdot \frac{1}{Y_{Cit/Glol}}$
Croissance cellulaire	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$
Formation d'acide citrique	$\frac{dCit}{dt} = \pi_{Cit} \cdot X$
Consommation d'azote	$-\frac{dN}{dt} = \mu \cdot X \cdot \frac{1}{Y_{X/N}}$
Vitesse spécifique de croissance cellulaire	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{N}{N_0}$
Vitesse spécifique de formation d'acide citrique	$\pi_{Cit} = \alpha \cdot \frac{Glol}{Glol_0}$

V.2.4. Application du modèle

L'application du modèle sur les données expérimentales, a été basée sur la cinétique définie dans la Figure III. 6. Il s'agit d'une culture avec une concentration initiale de glycérol de 80 g/l et un rapport molaire C/N 261. La méthode Runge-Kutta (ordre 4) a été utilisée afin d'intégrer les équations différentielles (lambda initial 10^{-3}), alors que le processus d'optimisation des paramètres a été effectué par la méthode des moindres carrés. Le résultat de l'application du modèle numérique développé sur les resultats expérimentaux, s'affiche Figure V. 3.

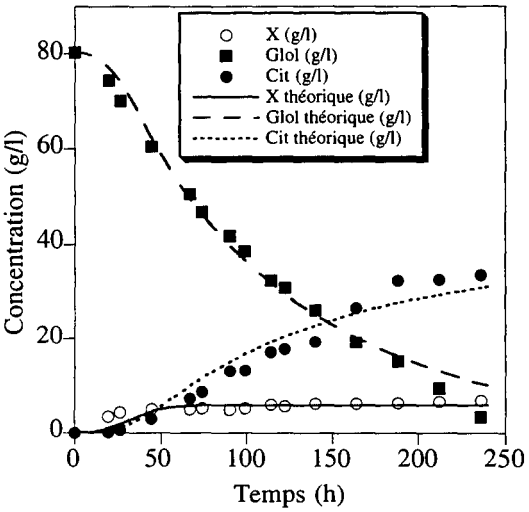


Figure V. 3
Application du modèle sur les données expérimentales pour la croissance de Y.lipolytica sur glycérol technique. Conditions de culture : milieu tamponné (pH 5-6), concentration initiale de glycérol 80 g/l, C/N molaire initial 261, température d'incubation 28°C.

L'application du modèle sur les valeurs expérimentales présente un χ^2 de 238 pour 40 degrés de liberté. On peut observer, un bon accord entre les données théoriques

et celles obtenues expérimentalement, qu'il s'agisse de l'évolution de la biomasse ou de citrate ou de glycérol technique.

V.2.5. Validation du modèle

Les paramètres optimisés sont les suivants :

- la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max})
- le rendement de formation de biomasse par le glycérol consommé ($Y_{X/Glol}$)
- le rendement de formation de biomasse par l'azote consommé ($Y_{X/N}$)
- le rendement de formation d'acide citrique par le substrat carboné consommé ($Y_{Cit/Glol}$)
- le facteur α (qui correspond à la vitesse spécifique maximale de production de citrate).

Les valeurs des paramètres optimisées ont été comparées à celles calculées à partir des données expérimentales, afin de valider le modèle développé. La présentation des résultats s'affiche dans le Tableau V. 5.

Tableau V. 5
Comparaison entre les valeurs des paramètres optimisées par le modèle et celles évaluées par les données expérimentales, lors de la croissance de Y. lipolytica sur glycérol technique. Conditions de culture : glycérol 80 g/l, C/N molaire initial 261, température d'incubation 28°C.

	Valeur optimisée	Valeur expérimentale
μ_{max} (h^{-1})	0,14±0.008	0,18
$Y_{X/Glol}$ (g/g)	0,46±0,024	0,43[1]
$Y_{X/N}$ (g/g)	36,1±0.18	36,7[1]
$Y_{Cit/Glol}$ (g/g)	0,54±0,024	0,50[2]
α (g/g.h)	$6,76x10^{-2}$±$3,8x10^{-3}$	n. d.

1. Paramètre estimé lors de la phase exponentielle de croissance
2. Estimé lors de la phase stationnaire
n. d. non déterminé

Les valeurs optimisées, et donc prédites, des paramètres sont très proches des valeurs obtenues à partir des données expérimentales. De plus, si l'on pose diverses contraintes, (p. e. changement des valeurs initiales des paramètres), le processus d'optimisation converge toujours vers les valeurs obtenues dans le Tableau V. 5.

La capacité prédictive du modèle a été validée en utilisant les mêmes valeurs des paramètres pour simuler une cinétique de fermentation comprenant initialement 120 g/l de

glycérol. Les valeurs expérimentales et les courbes théoriques sont comparées dans la Figure V. 4.

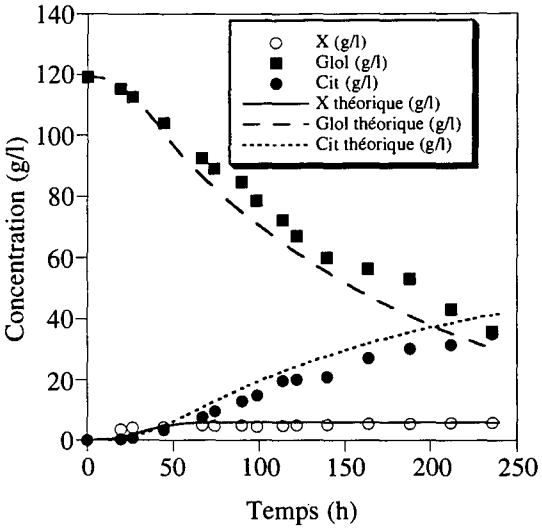


Figure V. 4
Prédiction du modèle pour l'évolution de la biomasse, du glycérol et de l'acide citrique. Conditions de culture : milieu tamponné (pH 5-6), concentration initiale de glycérol 120 g/l, C/N molaire initial 388, température d'incubation 28°C. Valeurs des paramètres obtenues par l'application du modèle sur les données expérimentales où concentration initiale de glycérol 80 g/l, C/N molaire initial 261.

La prédiction du modèle sur les valeurs expérimentals présente un χ^2 de 976.5 pour 40 degrés de liberté. Là encore, l'accord entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques paraît relativement satisfaisante.

V.2.6. Comparaison avec les données de la littérature

Le Tableau V. 6. nous permet de comparer les valeurs estimées des paramètres, lors de la modélisation de la croissance de la levure Y. lipolytica sur glycérol technique, à celles obtenues dans la littérature.

Tableau V. 6.

Comparaison entre les paramètres cinétiques estimés pour le modèle de croissance de Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 sur glycérol technique avec ceux obtenus dans la littérature.

Paramètre	Présent travail	Littérature
μ_{max} (h^{-1})	0,14	0,21 (Briffaud et Engasser, 1979a)[1]
		0,24 (Wojtatowicz et al., 1991)[2]
		0,28 (Klasson et al., 1989)[1]
		0,12 (Tisnadjaja et al., 1996)[3]
		0,10 (Legisa et Gradisnik-Grapulin, 1995)[4]
$Y_{X/Ose}$ (g/g)	0,46	0,37 (Briffaud et Engasser, 1979a)[1]
		0,40 (Klasson et al., 1989)[1]
		0,41 (Moresi, 1994)[1]
$Y_{X/N}$ (g/g)	36,1	45 (Hossain et al., 1984)[4, 5]
		40 (Briffaud et Engasser, 1979a)[1]
		35 (Rane et Sims, 1993)[1]
$Y_{Cit/Ose}$ (g/g)	0,54	0,33 (Aiba et Matsuoka, 1979)[1]
		0,75 (Briffaud et Engasser, 1979a)[1]
		0,48 (Gutierrez et al., 1993)[6]
		0,78 (Roukas et Kotzekidou, 1987)[7]
		0,60 (Mayilvahanan et al., 1996)[8]
α (g/g.h)	$6,76 \times 10^{-2}$	0,01 (Maddox et Kingston, 1983)[1]
		0,005 (Briffaud et Engasser, 1979a)[1]
		0,1 (Legisa et Gradisnik-Grapulin, 1995)[4]

1. Déterminé pour Yarrowia (Candida) lipolytica sur glucose
2. Déterminé pour Yarrowia (Candida) lipolytica sur des hydrolysats d'amidon
3. Déterminé pour Candida guillermondii sur glucose
4. Déterminé pour Aspergillus niger sur sucrose
5. Déterminé pour Aspergillus niger sur lactose
6. Déterminé pour Candida guillermondii sur galactose
7. Déterminé pour Aspergillus niger sur des sous-produits de brasseries
8. Déterminé pour Aspergillus niger sur de mélasses de canne

Comme cela a été déjà précisé, de nombreux travaux ont porté sur la production d'acide citrique par voie microbienne; ce processus s'effectue par l'intermédiaire des souches de Candida sp. ou de Aspergillus niger, principalement sur des milieux

osidiques. La vitesse spécifique de croissance, en général, présente des valeurs voisines à celles optimisées pour le modèle numérique, qu'il s'agisse de souches de Candida sp. ou de Aspergillus niger. La même observation peut être faite pour les rendements $Y_{X/Ose}$ et $Y_{X/N}$, estimés lors de la phase de production de biomasse. Par contre, le rendement de conversion $Y_{Cit/Ose}$ ainsi que la vitesse spécifique de production d'acide citrique, dépendent beaucoup de la souche employée ainsi que du mode de culture utilisé; c'est pourquoi des différences notables sont observées.

V.3. Conclusion

La simulation des fermentations s'avère relativement acceptable, et ce, malgé une approche globale de la modélisation. Notons, toutefois, que, pour ce qui concerne les fermentations utilisant un substrat lipidique, le modèle ne permet pas de représenter tout à fait correctement la diminution de la courbe de la biomasse totale lors de la phase de la consommation des lipides cellulaires. Parallèlement, ce modèle n'est pas adapté pour représenter la "traînée" du substrat lipidique au cours du temps.

Les valeurs des paramètres optimisées, sont relativement voisines de celles calculées à partir des données cinétiques.

Pour ce qui concerne la modélisation de la croissance cellulaire et la production d'acide citrique de Yarrowia lipolytica à partir du glycérol technique, les résultats sont assez satifaisants aussi bien d'un point de vue simulation que du point de vue de l'estimation des paramètres cinétiques.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

La réponse bio-physiologique (croissance cellulaire, morphologie, accumulation et composition des lipides intracellulaires, production d'acides organiques) de la levure oléagineuse Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 a été étudiée en présence de deux sources carbonées : l'une de nature lipidique et l'autre de nature osidique. Les lipides utilisés ont été la stéarine (un dérivé industriel de la graisse animale constituée surtout des acides palmitique et stéarique) et l'huile de colza oléique, hydrolysée chimiquement (constituée majoritairement d'acide oléique). Le glycérol technique a été le principal constituant osidique en comparaison avec le glucose. Le travail a consisté en une étude du comportement cinétique sur chaque type de substrat pris séparément, puis en mélanges, avant de déboucher sur une première ébauche de modélisation des cinétiques observées.

Croissance sur des milieux lipidiques. Y. lipolytica a présenté une croissance intéressante accompagnée d'une accumulation lipidique significative, quand la stéarine a été utilisée comme seul substrat carboné. La croissance n'a pas été suivie d'une acidification importante du milieu de culture. Le processus d'accumulation lipidique s'est montré sensible à la valeur du pH initial, la concentration d'azote extracellulaire ainsi que la température d'incubation. L'accumulation lipidique s'est déroulée en même temps que la croissance cellulaire, indépendamment de l'épuisement du milieu de culture par l'azote. Les meilleurs résultats au niveau de l'accumulation en lipides cellulaires, ont été obtenus dans les conditions suivantes : rapport initial stéarine/sulfate d'ammonium 10/0,5 g/g, rapport initial C/N 35-40).

La composition du substrat lipidique a influencé significativement le processus d'accumulation lipidique; des expériences effectuées sur des mélanges de stéarine avec l'huile de colza oléique hydrolysée, ont montré que des milieux riches en stéarine favorisaient l'accumulation lipidique. Par contre, des substrats composés majoritairement en acide oléique, étaient inadéquats pour ce processus. La composition des lipides cellulaires a été, également, affectée par l'utilisation du substrat carboné. Cependant, dans tous les cas, le microorganisme a montré une capacité peu habituelle à augmenter le pourcentage d'acide stéarique cellulaire au cours de la culture. Ainsi, des profils des lipides cellulaires avec des pourcentages élevés en acide stéarique ont été obtenus même si la concentration de cet acide n'était pas très importante dans le milieu de fermentation. Les lipides cellulaires ont présenté une similarité de composition globale avec le beurre de cacao.

La cinétique de l'évolution des acides gras libres du milieu de culture a montré une affinité importante de la souche par rapport aux acides gras insaturés (C18:1 et C18:2) et aux acides gras saturés de moyenne longueur de chaîne aliphatique (C12:0 et C14:0). La spécificité était moindre pour l'acide palmitique, et surtout pour l'acide stéarique. De plus, la cinétique d'évolution des acides gras intracellulaires a montré que la souche a présenté une préférence pour dégrader de l'acide oléique cellulaire par rapport à l'acide stéarique, bien que les quantités d'acide oléique aient été toujours bien inférieures.

Les lipides cellulaires sont composés majoritairement de triglycérides (45-55% en masse des lipides totaux - analyse effectuée quand les lipides cellulaires présentaient leur concentration maximale); de même, les acides gras libres constituent une partie importante (40% en masse). D'autres composants, en quantités minimes, sont les stérols et les lipides polaires. Il est à noter, que l'acide oléique se trouve en majorité dans la fraction des triglycérides, alors que celle des acides gras libres contient surtout du palmitate et du stéarate. Les triglycérides cellulaires présentent globalement une composition relativement similaire avec le beurre de cacao.

Dans la plupart des suivies cinétiques, trois phases bien séparées ont été observées; lors de la première phase (jusqu'à 40-50h après inoculation) le microorganisme a procédé à une consommation élevée du substrat lipidique, avec une formation simultanée de biomasse et des lipides cellulaires. Ensuite (50-100h), Y. lipolytica a consommé ses lipides cellulaires, en dépit d'une quantité de lipides extacellulaires relativement importante demeurant non-consommée dans le milieu de fermentation. Lors de cette phase, le microorganisme s'est mis à utiliser principalement la réserve lipidique intracellulaire. Lors de la dernière phase de la fermentation (100-240h), le microorganisme a redémarré l'assimilation du substrat extracellulaire alors que la quantité des lipides cellulaires restait presque constante. L'origine de la "cassure" de la consommation du substrat extracellulaire lors de la deuxième phase de la fermentation accompagnée de la consommation des réserves lipidiques, reste à éclaircir.

Une première explication du phénomène pourrait être qu'à partir de la deuxième phase de la fermentation, les capacités biosynthétiques de la population microbienne ne peuvent pas être soutenues seulement par la source carbonée extracellulaire. C'est pourquoi la réserve carbonée doit être supplementée par la biodégradation des réserves lipidiques. Cette supposition, a permis le développement d'un modèle numérique, décrivant la croissance cellulaire et l'accumulation/dégradation des réserves lipidiques chez Y. lipolytica. L'application du modèle sur les données expérimentales s'est montrée relativement satisfaisante pour le cas de la biomasse totale et les lipides cellulaires, mais moins convaincante pour ce qui concerne le substrat lipidique.

Croissance sur des milieux osidiques. La souche de la levure étudiée a montré de bonnes dispositions sur le glycérol industriel. Les paramètres de croissance sont similaires à ceux obtenus avec le glucose. Toutes les cultures ont été réalisées en utilisant des rapports molaires initiaux C/N élevés afin de favoriser l'accumulation des lipides intracellulaires. Cependant, le microorganisme n'a pas véritablement accumulé des réserves lipidiques. Dans tous les cas, des pourcentages de 5 à 10% (en masse) des lipides cellulaires rapportés à la matière sèche ont été observés. Ces lipides étaient constitués majoritairement de fractions polaires (phospholipides) et de stérols. Aucun triglycéride n'a été détecté. La composition des lipides cellulaires a été étudiée dans toutes les cultures effectuées sur glycérol, montrant une présence prédominante d'acides gras insaturés pendant toutes les étapes de la fermentation. La croissance sur glucose présentait de pourcentages relativement plus élevés en acide stéarique lors de la phase exponentielle de la croissance, alors que pendant la phase stationnaire, des pourcentages plus importants en acides gras insaturés (oléate et linoléate) ont été observés.

La limitation en azote, a conduit à la synthèse, relativement importante, d'acide citrique dans le milieu de fermentation. La croissance cellulaire de Y. lipolytica sur des milieux non tamponés a conduit à une production d'acide citrique beaucoup moins importante par rapport aux milieux tamponés (concentration maximale de citrate 10-15 g/l pour les milieux tamponés). La co-utilisation du glucose et du glycérol technique a montré que la vitesse de consommation du glycérol était beaucoup plus élevée par rapport à celle du glucose, le glycérol exerçant une action inhibitrice sur l'assimilation du glucose. L'augmentation de la concentration initiale du glycérol technique a conduit à une production intéressante d'acide citrique bien que non optimale. C'est pourquoi ce substrat, difficilement consommable par les souches microbiennes, paraît intéressant en vue de la synthése d'acide citrique.

Un modèle numérique décrivant la croissance cellulaire et la production d'acide citrique de cette souche à partir de glycérol industriel, a été développé et validé. Son application sur les valeurs expérimentales s'est montrée satisfaisante. De même, le modèle a présenté une capacité prédictive correcte.

Croissance sur des mélanges de stéarine avec des oses. L'association de stéarine à des substrats osidiques a permis une croissance cellulaire très appréciable. Le microorganisme a procédé à une consommation simultanée des deux types des sources carbonées dont il disposait (oses et acides gras libres). Néanmoins, comparé à la consommation du glucose, le glycérol a été assimilé avec une vitesse relativement plus importante (pour des expériences équivalentes de glucose et glycérol/stéarine). Dans le cas d'un substrat triple (stéarine, glucose, glycérol), le microorganisme a assimilé le

glucose après avoir consommé le glycérol alors que la consommation des acides gras avait lieu indépendamment de l'assimilation des sucres. En général, la consommation des composants osidiques a conduit à une production, relativement importante, d'acide citrique dans le milieu de fermentation.

L'accumulation lipidique a été influencée par la composition du milieu de culture; la co-utilisation de glycérol/stéarine a abouti à des concentrations plus élevées en lipides cellulaires ainsi qu'à des pourcentages plus importants des graisses rapportés à la matière sèche, comparée à celle de glucose/stéarine. Ainsi, le glycérol technique apparaît comme un substrat plus intéressant que le glucose, pour ce type de bioconversion.

Ce type de fermentation (mélange d'oses avec de la stéarine) conduit à une concentration en lipides cellulaires plus faible comparativement à celle observée avec la seule stéarine pour substrat. Néanmoins, une amélioration de la composition a été obtenue avec une augmentation significative des acides gras insaturés (C18:1 7-20% w/w, C18:2 3-7% w/w). Une graisse cellulaire avec une composition proche de celle de beurre de cacao a été synthétisée, alors que l'accumulation des réserves lipidiques était parfois un phénomène relativement prédominant ($K_{L/X}$ 0,25-0,33 g/g).

Concernant la morphologie de la souche, de changements ont été visualisés en fonction de la nature du substrat carboné utilisé. Ainsi, la croissance sur le glucose ou le glycérol technique a abouti à une morphologie unicellulaire oblongue. Par contre, la présence de graisse dans le milieu de culture a provoqué l'apparition d'une forme mycélienne de Y. lipolytica.

Les résultats obtenus au cours de ce travail laissent apparaître plusieurs perspectives. En ce qui concerne la production d'un succédané microbien de beurre de cacao à partir des co-produits industriels, la faisabilité de l'orientation du métabolisme cellulaire, en fonction des substrats utilisés, vers l'accumulation d'une graisse ressemblant à ce beurre, a été mise en évidence. Néanmoins, l'identification du (des) phénomène(s) mis en jeu, empêchant l'utilisation des chaînes aliphatiques extracellulaires et provoquant la consommation des lipides accumulés lors des dernières phases de la fermentation, reste à éclaircir. De même, l'étude cinétique et du comportement physiologique dans de conditions opératoires parfaitement contrôlées (utilisation de bioréacteurs) est une autre perspective essentielle pour, notamment, apprécier l'influence de l'aération sur la croissance cellulaire et la composition des graisses accumulées. Dans la même optique, le rôle et la maîtrise de l'émulsion, en fonction de la nature et de la

concentration de l'émulsifiant, sur la dispersion de la graisse et des levures, doivent être étudiés.

Concernant les aspects modélisation - simulation, ce travail a conduit à développer une première approche mathématique décrivant le phénomène d'accumulation/dégradation des réserves lipidiques à partir des milieux composés de graisses. Cette approche, trop globale et limitée pour ce qui touche à la simulation, doit être modifiée pour prendre en compte certains phénomènes biologiques. Ainsi, il est souhaitable de détailler l'assimilation de chacun des acides gras pour obtenir des meilleures performances de simulation et de prédiction. De plus, il apparaît nécessaire d'aller vers une analyse rigoureuse de la graisse intracellulaire produite. Dans la même optique, il serait utile de vérifier que les lipides produits ne contiennent pas de composés ayant des propriétés antinutritionnelles. Finalement, une étude des enzymes intracellulaires (ATP-citrate lyase, $\Delta 9$ et $\Delta 12$ déshygrogénase, iso-citrate déshydrogénase, etc) de la souche, apparaît intéressante, de façon à avoir une idée plus globale à propos du métabolisme cellulaire du microorganisme utilisée.

L'identification du phénomène à l'origine de la "cassure" de la consommation des lipides extracellulaires, le rôle de l'oxygénation dans la croissance cellulaire ainsi que la maîtrise de l'émulsion, associés aux résultats déjà existants, détermineront le meilleur type de mise en œuvre de fermentation. Il est à noter, néanmoins, que bien que la faisabilité de la production d'un succédané microbien de beurre de cacao à partir de co-produits industriels soit montrée, le coût du procédé n'est pas concurrentiel pour l'instant, même si le beurre de cacao a un coût très fluctuant. C'est pourquoi, dans ce cadre, l'utilisation d'autres substrats carbonés, encore moins coûteux par rapport à ceux utilisés lors de ce travail, doit être envisagé.

Le glycérol technique utilisé comme seule source carbonée, a constitué un substrat très adéquat pour la production d'acide citrique. Néanmoins, malgré les concentrations relativement importantes obtenues (33-35 g/l), les conditions opératoires de la fermentation sont loin d'être optimales (fermentations en fioles sans contrôle du pH, oxygénation relativement limitée, etc). Ces premiers résultats ainsi que le faible coût du glycérol, permettent d'envisager des études adaptées à la mise au point d'un procédé de synthèse d'acide citrique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.F.NOR. Receuil des normes françaises des corps gras / grains oléagineux et produits dérivés. 3ème edition, 1984, 60-233, pp. 95

Aggelis, G.; Pina, M.; Ratomahenina, R.; Arnaud, A.; Graille, J.; Galzy, P.; Martin-Privat, P. Perraud, J.P. Production d'huiles riches en acide gamma linolenique par diverses souches de Phycomycetes. *Oleagineux* **1987**, *42*, 379-386

Aggelis, G.; Ratomahenina, R.; Arnaud, A.; Galzy, P.; Martin-Privat, P.; Perraud, J.P.; Pina, M.; Graille, J. Etude de l'influence des conditions de culture sur la teneur en acide gamma linolenique de souches de Mucor. *Oleagineux* **1988,** *43*, 311-317

Aggelis, G.; Pina, M.; Graille, J. Localisation de l'acide gamma linolenique dans les myceliums et les spores chez deux Mucorales. *Oleagineux* **1990**, *45*, 229-232

Aggelis, G.; Komaitis, M.; Dimitroulias, G.; Pina, M.; Graille, J. Possibilite de production d'acide gamma linolenique par culture de Mucor circinelloides CBS 172-27 sur quelques huiles vegetales. *Oleagineux* **1991,** *46*, 208-212

Aggelis, G.; Komaitis, M.; Papanikolaou, S.; Papadopoulos, G. A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. I. Lipid accumulation during growth of Mucor circinelloides CBS 172-27 on a vegetable oil. *Gracas y Aceites* **1995a,** *46*, 169-173

Aggelis, G.; Komaitis, M.; Papanikolaou, S.; Papadopoulos, G. A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. II. Study of cellular lipids of Mucor circinelloides during growth on a vegetable oil. *Gracas y Aceites* **1995b,** *46*, 245-250

Aggelis, G.; Stathas, D.; Tavoularis, N.; Komaitis, M. Composition of lipids produced by some strains of Candida species. Production of single cell oil in chemostat culture. *Folia Microbiol.* **1996,** *41*, 299-302

Aggelis, G. Two alternative pathways for substrate assimilation by Mucor circinelloides. *Folia Microbiol.* **1996,** *41*, 254-256

Aggelis, G.; Papadiotis, G.; Komaitis, M. Microbial fatty acid specificity. *Folia Microbiol.* **1997,** *42*, 117-120

Aggelis, G.; Sourdis, J. Prediction of lipid accumulation - degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1997,** *72*, 159-165

Aggelis, G.; Athanassopoulos, N.; Paliogianni, A.; Komaitis, M. Effect of Teucrium polium L. extract on the growth and the fatty acid composition of Saccharomyces cerevisiae and Yarrowia lipolytica. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1998**, *73*, 195-198

Aiba, S.; Matsuoka, A. Identification of a metabolic model: citrate production from glucose by Candida lipolytica. *Biotechnol. Bioeng.* **1979,** *21*, 1373-1386

Alvarez, H.M.; Mayer, F.; Fabritius, D.; Steinbüchel, A. Formation of intracytoplasmic lipid inclusion by Rhodococcus opaccus strain PD630. *Arch. Microbiol.* **1996,** *165*, 377-386

Alvarez, H.M.; Kalscheuer, R.; Steinbüchel, A. Accumulation of storage lipids in species of Rhodococcus and Nocardia and effect of inhibitors and polyethylene glycol. *Fett* **1997,** *99*, 239-246

Asmer, H.J.; Lang, S.; Wagner, F.; Vray, V. Microbial production, structure, elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *65*, 1460-1466

Bajpai, P.K.; Bajpai, P.; Ward, O.P. Optimization of culture conditions for production of eicosapentaenoic acid by Mortierella elongata NRRL 5513. *J. Ind. Microbiol.* **1992**, *9*, 11-18

Barth, G.; Gaillardin, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica. *FEMS Microbiol. Rev.* **1997,** *19*, 219-237

Bear-Rogers, J. Nutritional attributes of fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988,** *65*, 91-95

Bhushan, B.; Hoondal, G.S. Short communication: Relationship between lipase production and pseudomycelia formation in a dimorphic Candida sp. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*. **1997**, *13*, 129-130

Biebl, H., Marten, S., Hippe, H.; Decker W.D. Glycerol conversion to 1-3 propanediol by newly isolated Clostridia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992,** *36*, 592-597

Biebl, H.; Marten, S. Fermentation of glycerol to 1-3 propanediol : Use of co-substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *44*, 15-19

Bloomer, S.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. Triglyceride interesterification by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990,** *67*, 519-524

Botha, A.; Strauss, T.; Kock, J.L.F.; Pohl, C.H.; Coetzee, D.J. Carbon source utilization and γ-linolenic production by Mucoralean fungi. *System. Appl. Microbiol.* **1997,** *20*, 165-170

Botham, P.; Ratledge, C. A biochemical explanation for lipid accumulation in Candida 107 and other oleaginous microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* **1979,** *114*, 361-375

Boulton, C.; Ratledge, C. Regulatory studies on citrate synthase in Candida 107, an oleaginous yeast. *J. Gen. Microbiol.* **1980,** *121*, 441-447

Boulton, C.; Ratledge, C. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP-citrate lyase. *J. Gen. Microbiol.* **1981,** *127*, 169-176

Briffaud, J.; Engasser, J.M. Citric acid production from glucose. I. Growth and excretion kinetics in a stirred fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* **1979,** *21*, 2083-2092

Briffaud, J.; Engasser, J.M. Citric acid production from glucose. II. Growth and excretion kinetics in a trickle-flow fermenter. *Biotechnol. Bioeng.* **1979,** *21*, 2093-2111

Brown, A.C.; Knights, B.A.; Conway, E. Hydrocarbon content of Botryococcus braunii. *Phytochemistry* **1969,** *8*, 543-547

Chang, M.K.; Abraham, G.; John, V.T. production of cocoa butter-like fat from interesterification of vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990,** *67*, 832-834

Chen, H.C.; Chang, C.C, Production of γ-linolenic acid by the fungus Cunninghamella echinulata CCRC 31840. *Biotechnol. Prog.* **1996,** *12*, 338-341

Choi, S.Y.; Ryu, D.Y.; Rhee, J.S. Production of microbial lipid. effects of growth rate and oxygen on lipid synthesi ans fatty acid composition of Rhodotorula gracilis. *Biotechnol. Bioeng.* **1982,** *14*, 1165-1172

Davies, R.J.; Holdswoth, J.E.; Reader, S.L. The effect of low oxygen uptake rate on the fatty acid profile of the oleaginous yeast Apiotrichum curvatum. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990,** *33*, 569-573

Davies R.J. Scale -up of yeast oil technology. In: *Industrial applications of Single Cell Oils;* Kyle, D.J. and Ratledge, C. Ed.; American oil chemists` society: Champaign, 1992; pp 196-218

Davies, J.; Holdsworth, J. Synthesis of lipids in yeasts, biochemistry, physiology and production. *Adv. Appl. Lipid Res.* **1992,** *1*, 119-159

DeBell, R.M.; Jack, R.C. Stereospecific analysis of major glycerolipids of Phycomyces blakesleeanus sporangiophores and mycelium. *J. Bacteriol.* **1975,** *124*, 220-224

Desphande, M.; Daniels, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by Candida bombicola using animal fat. *Bioresource Technol.* **1995**, *54*, 143-150

du Preez, J.C.; Immelman, M.; Kock, J.L.F.; Kilian, S.G. The effect of acetic acid concentration on the growth and production of gamma-linolenic acid by Mucor circinelloides CBS 203.28 in fed-batch culture. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **1997,** *13*, 81-87

Emelyanova, E. Lipid and γ-linolenic acid production by Mucor inaquisporus. *Process Biochemistry* **1997,** *3*, 173-177

Evans, C.T.; Scragg, A.H.; Ratledge, C. A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts. *Eur. J. Biochem.* **1983,** *130*, 195-204

Evans, C.T.; Ratledge, C. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **1984,** *130*, 1693-1704

Evans, C.T.; Ratledge, C. The role of the mitochondrial NAD^+ isocitrate dehydrogenase in lipid accumulation by the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides CBS 14. *Can. J. Microbiol.* **1985,** *31*, 479-484

Finnerty, W.R. The application of hydrocarbon-utilizing microorganisms for lipid production. In: *Biotechnology for the oils and fats Industry;* Ratledge, C.; Rattray, J.B.M.; Dawson, P.S.S. Ed.; American oil chemists` society: Champaign, 1984; pp 199-215

Floetenmeyer, M.D.; Glatz, B.A.; Hammond, E.G. Continuous culture fermentation of the whey permeate to produce microbial oil. *J. Dairy Sci.* **1985**, *68*, 633-637.

Folch, J.; Lees, M.; Slane-Stanley, J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497-509

Galiotou-Panagiotou, M.; Kalatzi, O.; Aggelis, G. Modelling of simultaneous production of polygalactorunase and exopolysaccharide by Aureobasidium pullulans ATHUM 2915. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1998,** *73*, 155-162

Gierhart, D.I. UK Patent 2091, 285A, **1982**

Gierhart, D.I. UK Patent 2091, 286A, **1982**

Gill, C.; Hall, M.; Ratledge, C. Lipid Accumulation in an Oleaginous Yeast with possession of ATP:Citrate lyase. *Appl. Envir. Microbiol.* **1977,** *33*, 231-239

Glatz, B.A.; Hammond, E.G.; Hsu, K.H.; Baehman, L.; Bati, N.; Bednarski, W.; Brown, D.; Floetenmeyer, M. Production and modification of fats and oils by yeast fermentation. In: *Biotechnology for the oils and fats Industry;* Ratledge, C.; Rattray, J.B.M.; Dawson, P.S.S. Ed.; American oil chemists` society: Champaign, 1984; pp 163-176

Granger, L.M.; Perlot, P.; Goma, G.; Pareilleux, A. Kinetics of growth and fatty acid production of Rhodotorula glutinis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992,** *37,* 13-17

Gutierrez, N.; McKay, I.; French, C.; Brooks, J.; Maddox, I. Repression of galactose utilization by glucose in a citrate-producing yeast Candida guilliermondii. *J. Ind. Microbiol.* **1993**, *11*, 143-146

Hamid, S.; Khan, S.A.; Saeed, M.; Iqbal, M.Z. Lipid production by Candida curvata. *Fett* **1995,** *97*, 545-548

Hamid, S.; Khan, S.A.; Iqbal, M.Z. Lipid production by Lipomyces lipoferus. *Fett* **1995,** *97*, 449-452

Hamissa, F.A.; Radwan, A. Production of citric acid from cane molasses on a semi-pilot scale. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1977**, *23*, 325-329

Hansson, L.; Dostalek, M. Influence of cultivation conditions on lipid production by Cryptococcus albidus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1986,** *24*, 12-18

Hansson, L.; Dostalek, M.; Sörenby, B. Production of γ-linolenic acid dy the fungus Mucor rouxii in fed-batch and continuous culture.*Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989,** *31*, 223-227

Helme, J.P. The essential fatty acids: The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acids of the n-3 and n-6 families. *Revue Française des Corps Gras* **1986,** *33*, 107-114

Holdsworth, J. E.; Ratledge, C. Lipid turnover in oleaginous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **1988,** *134*, 339-346

Holdsworth, J. E.; Veenhuis, M.; Ratledge, C. Enzyme activities in oleaginous yeasts accumulating and utilizing exonenous or endogenous lipids. *J. Gen. Microbiol.* **1988,** *134*, 2907-2915

Homann, T.; Tag, C.; Biebl, H.; Decker, W. D.; Schink, B. Fermentation of glycerol to 1-3 propanediol by Klebsiella and Citrobacter strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990,** *33*, 121-126

Hossain, M.; Brooks, J.D.; Maddox, I. The effect of the sugar source on citric acid production by Aspergillus niger. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1984,** *19*, 393-397

Immelman, M.; du Preez J.C.; Kilian S.G. Effect of C:N ratio on gamma-linolenic acid production by Mucor circinelloides grown on acetic acid. *System. Appl. Microbiol.* **1997,** *20*, 158-164

Kamisaka, Y.; Yokochi, T.; Nakahara, T.; Suzuki, O. Incorporation of linoleic acid and its conversion to γ-linolenic acid in fungi. *Lipids* **1990,** *25*, 54-60

Kendrick, A.; Ratledge, C. Lipid formation in the oleaginous mould Entomophthora exitalis grown in continuous culture: effects of growth rate, temperature and dissolved

oxygen tension on polyunsaturated fatty acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *37*, 18-22.

Kim, S.T.; Oh, D.K.; Lee, K.H.; Kim, J.H. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by Torulopsis bombicola in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *48*, 23-26

Kim, E.K.; Roberts, R.S. Rate equations for the vigorous stationary phase fermentation of citric acid by Saccharomycopsis lipolytica. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37;* 985-988

King, P.P. Biotechnology. An industrial view. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1982,** 32, 2-8

Klasson, T.K.; Clausen, E.C.; Gaddy, J.L. Continuous fermentation for the production of citric acid from glucose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1989,** *21*, 491-509

Koritala, S.; Bagby, M.O. Microbial conversion of linoleic and linolenic acids to unsaturated hydroxy fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992,** *69*, 575-578

Legisa, M.; Gradisnik-Grapulin, M. Sudden substrate dilution induces a higher rate of citric acid production by Aspergillus niger. *Appl. Envir. Microbiol.* **1995**, *61*, 2732-2737

Lindberg, A.M.; Hansson, L. Production of γ-linolenic acid by the fungus Mucor rouxii on cheap nitrogen and carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991,** *36,* 26-28

Maddox, I.S.; Kingston, P.J. Use of immobilized cells of the yeast Saccharomycopsis lipolytica, for the production of citric acid. *Biotechnol. lett.* **1984,** *5*, 795-798

Matsuo, T.; Terashima, M.; Hashimoto, Y.; Hasida, W. US Patent 4308, 350, **1981**

Mayilvahanan, D.; Annadurai, G.; Raju, V.; Chellapandian, M.; Krishnan, M.R.V.; Jayramanan, K. Citric acid production. 1. Strategies for reduction in cycle time for targeted yields. *Bioprocess Eng.* **1996**, *15*, 232-326

Meesters, P.A.E.P.; Huijberts, G.N.M.; Eggink, G. High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast Cryptococcus curvatus using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996,** *45*, 575-579

Meesters, P.A.E.P.; van der Wal, H.; Weusthuis, R.; Eggink, G. Cultivation of the oleaginous yeast Cryptococcus curvatus in a new reactor with improved mixing and mass transfert characteristics (SUPER - R). *Biotechnol. techn.* **1996,** *10*, 277-282

Menzel, K.; Zeng, A. P.; Deckwer, W.D. Enzymatic evidence for an involvement of pyruvate dehydrogenase in the anaerobic glycerol metabolism of Klebsiella pneumoniae. *J. Biotechnol.* **1997,** *56*, 135-142

Meyer, K.H.; Schweizer E. Control of fatty-acid synthetase levels by exogenous long-chain fatty acids in the yeasts Candida lipolytica and Saccharomyces cerevisiae. *Eur. J. Biochem.* **1976,** *65*, 317-324

Milsom, P.E. Organic acids dy fermentation, especially citric acid. In Food biotechnology Vol. 1 King, R.D.; Cheetham, P.S.J. Ed.; New York, 1987; pp 273-306

Montet, D.; Ratomahenina, R.; Galzy, P.; Pina, M.; Graille, J. A study of the influence of the growth media on the fatty acid composition in Candida lipolytica DIDDENS and LODDER. *Biotechnol. lett.* **1985,** *7*, 733-736

Moresi, C. Effect of glucose concentration on citric acid production by Yarrowia lipolytica - kinetics of the trophophase, citrate lag phase and idiophase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1994**, *60*, 387-395

Moreton, R.S. Modification of fatty acid composition of lipid accumulating yeasts with cyclopropene fatty acid desaturase inhibitors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985,** *22*, 41-45

Nevoigt, E.; Stahl, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, *21*, 231-241

Novotny, C.; Dolezalova, L.; Lieblova, J. Dimorphic growth and lipase production in lipolytic yeasts. *Folia Microbiol.* **1994**, *39*, 71-73

Pagot, Y.; Belin, J.M. Fatty acid cellular metabolism and lactone production by the yeast Pichia guilliermondii. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996,** *45*, 349-354

Pagot, Y.; Endrizzi, A.; Nicaud, J.M.; Belin, J.M. Utilization of an auxotrophic strain of the yeast Yarrowia lipolytica to improve γ-decalactone production yields. *Lett. Appl. Microbiol.* **1997,** *25*, 113-116

Papanikolaou, S.; Blanchard, F.; Chevalot, I.; Aggelis, G.; Komaitis, M.; Marc, I. High production of single cell oil (S.C.O.) by Yarrowia lipolytica growing on an industrial derivative of animal fat (a, soumis)

Papanikolaou, S.; Chevalot, I.; Aggelis, G.; Komaitis, M.; Marc, I. Production of a cocoa-butter substitute from Yarrowia lipolytica growing on industrial fats (b, soumis)

Papanikolaou, S.; Muniglia, L.; Chevalot, I.; Aggelis, G.; Marc, I. Yarrowia lipolytica as a potential producer of citric acid from raw glycerol (c, soumis)

Petitdemange, E.; Dürr, C.; Abbad-Andaloussi, S., Raval, G. Fermentation of raw glycerol to 1-3 propanediol by new strains of Clostridium butyricum. *J. Ind. Microbiol.* **1995,** *15*, 498-502

Radwan, S.S., Soliman, A.H. Arachidonic acid from fungi utilizing fatty acids with shorter chains as sole sources of carbon and energy. *J. Gen. Microbiol.* **1988,** *134*, 387-393

Ratledge, C. Microbial conversions of alkanes and fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984,** *61*, 447-453

Ratledge, C. Boulton, C.A. Fats and Oils. In: *Comprehensive biotechnology, the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and*

medecine; Cooney, C.L.; Humphrey, A.E. Ed.; Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Frankfurt, 1985; pp 983-1003

Ratledge, C. Lipid biotechnology, a wonderland for the microbial physiologist. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1987**, *64*, 1647-1656

Ratledge, C. Tailor made oils and fats - Possibilities for microbial oils. *Revue Française des Corps Gras* **1992,** *39*, 325-332

Ratledge, C. Single cell oils - have they a biotechnological future? *TIBTECH* **1993**, *11*, 278-284

Ratledge, C. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In: *Technological advances in improved and alternative sources of lipids;* Kamel, B. S.; Kakuda, Y. Ed.; London: Blackie academic and professional, 1994; pp 235-291

Rattray, J.; Schibeci, A.; Kidby, D. Lipids of yeasts. *Bacteriological Reviews* **1975,** *39*, 197-231

Rane, K., Sims, K. Production of citric acid by Candida lipolytica Y 1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. *Enzyme Microb. Technol.* **1993,** *15*, 646-651

Rane, K., Sims, K. Oxygen uptake and citric acid production by Candida lipolytica Y 1095. *Biotechnol. Bioeng.* **1994,** *43*, 131-137

Rane, K.; Sims, K. Citric acid production by Candida lipolytica Y 1095 in cell recycle and fed-batch fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46*, 325-332

Ringo, E.; Jostensen, J.P.; Olsen, R.E. Production of eicosapentanoic acid by freshwater Vibrio. *Lipids* **1992,** *27*, 564-566

Roukas, T.; Kotzekidou, P. Influence of some trace metals and stimultants on citric acid production from brewery wastes by Aspergillus niger. *Enzyme Microb. Technol.*, **1987,** *9*, 291-294

Roukas, T.; Kotzekidou, P. Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. *Enzyme Microb. Technol.*, **1997,** *21*, 273-276

Roux, M.P.; Kock, J.L.F.; du Preez, J.C.; Botha, A. The influence of dissolved oxygen tension on the production of cocoa butter equivalents and gamma-linolenic acid by Mucor circinelloides. *System. Appl. Microbiol.* **1995,** *18*, 329-334

Saha, M.L.; Takahashi, F. Continuous citric acid fermentation by magnetic rotating biological contactors using Aspergillus niger AJ 117173. *J. Ferment. Bioeng.* **1997,** *84*, 244-248

Sajbidor, J.; Certik, M.; Dobronova, S. Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to Mucorales. *Biotechnol. lett.* **1988,** *10*, 347-350

Samelis, J.; Aggelis, G.; Metaxopoulos, J. Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of Greek dry sausages. *Meat Science* **1993,** *35*, 371-385

Saxena, V.; Sharma, C.D.; Bhagat, S.D.; Saini, V.S.; Adhikari, D.K. Lipid and fatty acid biosynthesis by Rhodotorula minuta. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 501-505

Seto, A.; Wang, H.L.; Hesseltine, C.W. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of Chlorella minutissima. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984,** *61*, 892-894

Shaw, R. The occurence of γ-linolenic acid in fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **1965,** *98*, 230-237

Shimizu, S.; Kawashima, H.; Akimoto, K.; Yamada, H. Production of eicosapentaenoic acid by Mortierella fungi. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988,** *66*, 1455-1459

Shimizu, S.; Akimoto, K.; Kawashima, H.; Shinmen, Y.; Yamada, H. Production of diomo-γ-linolenic acid by Mortierella alpina 1S-4. *J. Am. Oil Chem. Soc.*. **1989**, *66*, 237-241

Shinmen, Y.; Shimizu, S.; Akimoto, K.; Kawashima, H.; Yamada, H. Production of arachidonic acid by Mortierella fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989,** *31*, 11-16

Singh, A.; Ward, O.P. production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by Mortierella aplina ATCC 3222. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997,** *48*, 1-5

Smit, E.J.; Van der Westhuizen, J.P.J.; Kock, J.L.F.; Lategan, P.M. A yeast identification method: the influence of a culture age on the cellular long-chain fatty acid composition of 3 selected basidiomycetous yeasts. *System. Appl. Microbiol.* **1987**, *10*, 38-41

Smit, H.; Ykema, A.; Verbree, E.C.; Verwoert, I.I.G.S.; Kater, M.M. Production of cocoa butter equivalents by yeast mutants. In: *Industrial production of S.C.O.;* Kyle; D.J.; Ratledge, C. Ed.; Champaign, 1992; pp 185-195

Tatsumi, C.; Hashimoto, Y.; Terashima, M.; Matsuo, T. US Patent, 4032, 405, **1979**

Thorpe, R.F.; Ratledge, C. Fatty acid distribution in triglycerides of yeasts grown on glucose and n-alkanes. *J. Gen. Microbiol.* **1972,** *75*, 151-163

Tisnadjaja, D.; Gutierrez, N.; Maddox, I. Citric acid production in a bubble-column reactor using cells of the yeast Candida guilliermondii immobilized by adsorption into sawdust. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *19*, 343-347

Torres, N. Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by Aspergillus niger. I. Model definition and stability of the steady state. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44*, 104-111

Torres, N. Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by Aspergillus niger. II. Sensitivity analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44*, 112-118

Torres, N.; Voit, E.; Alcon, C.G. Optimization of nonlinear biotechnological processes with linear programming: application to citric acid production by Aspergillus niger. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 247-258

Totani, N.; Oba, K. A simple method for production of arachidonic acid by Mortierella alpina. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, *28*, 135-137

Wentworth, S.; Cooper, D. Self-cycling fermentation of a citric acid producing strain of Candida lipolytica. *J. Ferm. Bioeng.* **1996**, *81*, 400-405

Wojtatowicz, M.; Rymowicz, W.; Kautola, H. Comparison of different strains of the yeast Yarrowia lipolytica for citric acid production from glucose hydrol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, *31*, 165-174

Yamauchi, H.; Mori, H.; Kobayashi, T.; Shimizu, S. Mass production of lipids by Lipomyces starkeyi in microcomputer aided fed-batch culture. *J. Ferment. Technol.* **1983**, *61*, 275-280

Yano, I.; Nicholls, B.W.; Morris, L.J.; James, A.T. The distribution of cyclopropane and cyclopropene fatty acids in higher plants (Malvaceae). *Lipids*, **1972**, *7*, 30-34

Ykema, A.; Verbree, E.C.; Verseveld, H.W. ; Smit, H. Mathematical modelling of lipid production by oleaginous yeasts in continuous cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1986**, *52*, 491-506

Ykema, A.; Verbree, E.C.; Kater, M.M.; Smit, H. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast Apiotrichum curvatum in wheypermeate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, *29*, 211-218.

Ykema, A.; Verbree, E.C.; Nijkamp, H.J.J.; Smit, H. Isolation and characterization of fatty acid auxotrophs from the oleaginous yeast Apiotrichum curvatum. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989,** *32*, 76-84

Ykema, A.; Verbree, E.C.; Verwoert, I.I.G.S.; Van der Linden, K.H.; Nijkamp, H.J.J.; Smit, H. Lipid production of revertants of Ufa mutants from the oleaginous yeast Apiotrichum curvatum. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990,** *33*, 176-182

Yoon, S.H.; Rhee, J.S. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of Rhodotorula glutinis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1983,** *60*, 1281-1286

Zinjarde, S.; Pant, A.; Desphande, M. Dimorphic transition in Yarrowia lipolytica isolated from oil-polluted sea water. *Mycol. Res.* **1998**, *102*, 553-558.

NOMENCLATURE

NOMENCLATURE

X - biomasse totale, g/l

L - lipides cellulaires, g/l

X_f - biomasse exempte de lipides, estimée après soustraction des lipides cellulaires (L) par la biomasse totale (X), g/l

S - substrat lipidique, g/l

P - produit, g/l

Glc - Glucose, g/l

Glol - Glycérol, g/l

Cit - Acide citrique, g/l

$Y_{X/S}$ - rendement, g de biomasse totale formée par g de substrat lipidique consommé

$Y_{Xf/S}$ - rendement, g de biomasse exempte de lipides formée par g de substrat lipidique consommé

$Y_{X/Glc}$ ($Y_{X/Glol}$) ($Y_{X/Ose}$) - rendement, g de biomasse formée par g de glucose ou glycérol ou de l'ose consommé

$Y_{Xf/L}$ - rendement, g de biomasse exempte de lipides formée par g de lipides cellulaires consommés

$Y_{Cit/Glc}$ ($Y_{Cit/Glol}$) ($Y_{Cit/Ose}$) - rendement, g de citrate produit par g de glucose ou glycérol ou de l'ose consommé

$Y_{L/S}$ - rendement, g des lipides cellulaires accumulés par g de substrat lipidique consommé

$Y_{X/N}$ - rendement, g de biomasse formé par g d'azote extracellulaire consommé

$K_{L/X}$ - coefficient, g des lipides cellulaires accumulés par g de biomasse totale correspondante

π_L - vitesse spécifique d'accumulation des lipides dans les cellules, g lipides / g biomasse exempte de lipides . h

π_{Lx} - vitesse spécifique moyenne de production de lipides cellulaires, g lipides / g biomasse totale . h

π_{Cit} - vitesse spécifique de production d'acide citrique, estimée lors de la phase exponentielle de production, g d'acide citrique / g de biomasse . h

α - facteur qui correspond à la vitesse spécifique maximale de production de citrate, g d'acide citrique / g de biomasse . h

v_{Glol} - vitesse spécifique de consommation de glycérol, g de glycérol consommé / g de biomasse totale correspondante . h

v_{Glc} - vitesse spécifique de consommation de glucose, g de glucose consommé / g de biomasse totale correspondante . h

ν_S - vitesse spécifique de consommation de stéarine, mg de stéarine consommé / g de biomasse totale correspondante . h

$\mu_{Xf(S)}$ - vitesse spécifique de formation de biomasse exempte de lipides par la consommation du substrat lipidique (h^{-1})

$\mu_{Xf(L)}$ - la vitesse spécifique de formation de biomasse exempte de lipides par la consommation des réserves lipidiques (h^{-1})

μ - la vitesse spécifique de croissance (h^{-1})

rXf - vitesse de formation de biomasse exempte de lipides (g/h)

rS - vitesse de consommation du substrat lipidique (g/h)

rGlol - vitesse de consommation du glycérol (g/h)

rX - vitesse de croissance cellulaire (g/h)

rN - vitesse de consommation du substrat azoté (g/h)

rCit - vitesse de production d'acide citrique (g/h)

V - volume actif dans la fermentation en discontinu (l)

$r_{Substrat}'''$ - vitesse de consommation de substrat par unité de volume (g/l.h)

$r_{Produit}'''$- vitesse de production de métabolite par unité de volume (g/l.h)

0, max et *f* sont des indices correspondant à la quantité initiale, maximale et finale des élements dans les cinétiques.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur RIBA Jean-Pierre, Professeur, ENSIGC Toulouse,
Monsieur AGGELIS Georges, Maître de Conférences, Université Agronomique d'Athènes (Grèce),
Monsieur GERMAIN Pierre, Professeur, ENSAIA/INPL

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur PAPANIKOLAOU Séraphim

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :
"**Étude du comportement physiologique d'une souche de *Yarrowi lipolytica* à partir des co-produits industriels : production orientée de lipides cellulaires.**"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : "**BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES**"

Fait à Vandoeuvre le, **1er Décembre 1998**
Le Président de l'I.N.P.L.,

J. HARDY

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

RESUME

La réponse biochimique de la levure oléagineuse Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 sur différentes sources carbonés est étudiée. Le microorganisme présente une croissance cellulaire importante, accompagnée d'une accumulation élevée en lipides, lorsque la stéarine (acides gras libres saturés) sert de substrat. Le processus d'accumulation lipidique est influencé par le pH du milieu, la quantité d'azote extracellulaire, la température ainsi que la concentration initiale en stéarine.

Y. lipolytica présente une importante croissance sur des mélanges stéarine/huile de colza oléique hydrolysée. L'accumulation des graisses est correlée à la présence de stéarine dans le milieu. Des lipides cellulaires, composés majoritairement de triglycérides et présentant une composition totale proche du beurre de cacao, sont synthétisés. La souche procède à une consommation de ses réserves lipidiques, alors qu'une quantité encore importante de substrat extracellulaire n'est pas consommée. Un modèle mathématique décrivant ce phénomène, dans une première approche, est développé.

La croissance cellulaire est également importante dans les milieux osidiques, composés de glycérol technique et/ou de glucose, avec des paramètres de croissance similaires pour les deux substrats. Malgré les rapports molaires C/N élevés, Y. lipolytica n'accumule pas de graisses; par contre, une formation importante d'acide citrique est observée. Les lipides cellulaires analysés, montrent la prédominance d'acides gras insaturés. La croissance de la souche sur glycérol, a été modélisée.

L'utilisation de mélanges oses/stéarine variés, présente des résultats divers mais intéressants. Le glycérol s'avère un co-substrat plus adéquat que le glucose, en permettant une accumulation lipidique plus importante. Dans tous les cas, la concentration des lipides cellulaires est moindre si on la compare à l'utilisation de la seule stéarine. Cependant, la composition des lipides présente une meilleure similitude avec le beurre de cacao.

MOTS-CLEFS: Yarrowia lipolytica, croissance, cinétique, graisse animale, huile végétale, glycérol technique, acide citrique, succédané de beurre de cacao

ABSTRACT

The biochemical behaviour of the oleaginous Yarrowia lipolytica LGAM S(7)1 is studied on different carbon substrates. Significant cell growth and high lipid accumulation are observed on stearin (industrial fat composed of saturated free fatty acids). Lipid accumulation is influenced by the initial pH value, the extracellular nitrogen availability, the incubation temperature as well as the initial stearin concentration of the culture medium.

Significant cell growth is observed on mixtures of stearin and hydrolyzed oleic rapeseed oil. Nevertheless, lipid accumulation is correlated with the presence of stearin into the culture medium. Cellular lipids composed mainly of triglycerides and presenting a total fatty acid composition close to the cocoa-butter are synthetized. Y. lipolytica consumes its accumulated lipids, although significant extracellular substrate amounts remain unconsumed. A first approach of a mathematical model development is proposed.

High cell growth is observed on osidic substrates composed of raw glycerol and/or glucose, with similar kinetic parameters obtained. Although increased initial C/N molar ratios are employed, cellular fat accumulation is not observed; the nitrogen limitation allows a significant citric acid excretion into the culture medium. The cellular lipids analyzed, show a predominance of the unsaturated fatty acids. Furthermore, a mathematical model describing growth on raw glycerol is developed.

The use of stearin/oses mixtures presents interesting results. Raw glycerol seems a more adequate substrate than glucose, as higher lipid accumulation is observed. Whatever the stearin/ose mixture employed, the accumulated fats a present a lower concentration than that obtained on stearin used as sole substrate. However, an amelioration of the cellular lipid composition is observed (increased similarities with the cocoa-butter).

KEY-WORDS: Yarrowia lipolytica, growth, kinetics, animal fat, vegetable oil, raw glycerol, citric acid, cocoa-butter substitute