



HAL
open science

Nouvelle approche de la cinétique fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* et de la conduite d'un procédé semi-continu : modélisation de la croissance basée sur le bilan énergétique de la levure, commande prédictive et floue

Ridha Mosrati

► To cite this version:

Ridha Mosrati. Nouvelle approche de la cinétique fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* et de la conduite d'un procédé semi-continu : modélisation de la croissance basée sur le bilan énergétique de la levure, commande prédictive et floue. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1993. Français. NNT : 1993INPL127N . tel-01751254

HAL Id: tel-01751254

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751254>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

A Henda ...

*Pour sa grâce,
sa tendresse,
et sa patience.*

*À mes parents,
mes frères,
et ma petite soeur*

*Pour leur dévouement
et leur soutien permanent...*

A U A N 7 - P R O P O S

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe "Génie des Procédés Biologiques et Alimentaires" (GPBA), groupe du "Laboratoire des Sciences du Génie Chimique" de Nancy. Je tiens à remercier Madame Annie MARC, responsable de l'équipe GPBA, et Monsieur Daniel TONDEUR, directeur du LSGC, de m'avoir accueilli dans ce laboratoire et pour tous les efforts qu'ils ont déployé afin d'assurer de meilleures conditions de travail aussi bien scientifiques que matérielles, grâce à leur bonne humeur et leur qualité d'écoute.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur Ivan MARC, Chargé de recherches CNRS au LSGC (NANCY), Directeur de la présente thèse pour sa grande modestie, pour son accueil chaleureux et pour l'aide financière qu'il a bien voulu assuré durant cette thèse. Je lui suis reconnaissant pour ses compétences scientifiques et pédagogiques. J'associe à ces remerciements Monsieur Christian FOMTEIX, Maître de conférences à l'ENSAIA (NANCY), codirecteur de cette thèse pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée et pour le temps qu'il m'a consacré afin de mener à bien ce travail, notamment dans l'aspect contrôle-commande. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont toujours témoigné à ce travail.

Je remercie et félicite les acteurs de la coopération entre notre laboratoire et le laboratoire d'automatique et de recherches appliquées (LARA) de Nancy : Messieurs Claude HUMBERT, Professeur à l'ESTIM, Driss MEHDJ, Professeur à l'université de Poitiers, Michel LAMOTTE, Directeur de recherche au CNRS et Mohamed MAHJOUR, Docteur de l'université Nancy 1.

Je remercie Monsieur Jean-Marc ENGASSER, Professeur à l'ENSAIA (NANCY), de m'avoir accueilli dans la formation doctorale, qu'il dirige, et d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur Jean-Bernard GROS, Professeur à l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand) et renouvelle mes remerciements à Monsieur Michel LAMOTTE, d'avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de thèse.

Je remercie Monsieur Pierre GERMAIN, Professeur à l'ENSAIA (NANCY) pour toute l'aide et les conseils éclairés qu'il m'a apportés et d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude à Monsieur Mohamed GHOULE, Maître de conférences à l'ENSAIA (NANCY), pour son soutien, ses conseils scientifiques et sa précieuse collaboration tout au long de ce travail.

Je sais gré à Monsieur Joseph BONDRAUT, Directeur de recherche au LSGC, pour l'intérêt qu'il témoigne à mon travail et de m'avoir offert l'occasion de participer à d'autres travaux scientifiques, et m'a permis ainsi d'acquérir de nouvelles connaissances, notamment dans le domaine des cultures des micro-organismes recombinés.

Je remercie toute l'équipe de la halle des biotechnologies pour leur soutien et la formidable ambiance de travail et d'amitié qu'ils ont su assurer. A la technique, pour leur efficacité, Fabrice BLANCHARD et Evelyne RONAT. Pour leur sympathie et leur humour, Frédérique BICKING, Nathalie LAURENT, Nassim CHOUAKRI, Gilles STIEN et Eric PERRIN. J'associe à mes remerciements, pour leur amitié, l'équipe des cultures cellulaires.

PLAN GENERAL

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

PARTIE 1

<i>Validation de mesures et analyse cinétique de bioprocédés par filtrage numérique non stochastique.....</i>	<i>5</i>
---	----------

<i>Calcul de l'équilibre Liquide-Vapeur.....</i>	<i>17</i>
--	-----------

<i>Entraînement de l'acétaldéhyde par aération : Cinétique et Modélisation.....</i>	<i>28</i>
---	-----------

PARTIE 2

<i>Culture de Saccharomyces cerevisiae en réacteur discontinu aéré I : Croissance sur glucose, Flux de carbone et Energie cellulaire.....</i>	<i>49</i>
---	-----------

<i>Culture de Saccharomyces cerevisiae en réacteur discontinu aéré II : Croissance sur éthanol, Stoechiometrie et Energie cellulaire.....</i>	<i>67</i>
---	-----------

<i>Considérations fonctionnelles du rôle de l'ATP et du NADH pour la modélisation du métabolisme et la croissance de Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>81</i>
---	-----------

<i>Modélisation de la croissance aérobie de S. cerevisiae en réacteur discontinu : Métabolisme, Energie et Structure cellulaire.....</i>	<i>102</i>
--	------------

PARTIE 3

<i>Recherche Analytique des Conditions de conduite Optimale d'une fermentation semi-continue de levure</i>	<i>126</i>
--	------------

<i>Contrôle d'une fermentation semi-continue de levure à l'aide d'une Commande Prédicative.....</i>	<i>134</i>
---	------------

<i>Fuzzy Control of baker's yeast fed-batch bioprocess : a Robustness Study.....</i>	<i>145</i>
--	------------

CONCLUSION GENERALE	161
---------------------------	-----

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis quelques dizaines d'années, de gros efforts ont été consentis pour l'amélioration de la connaissance et la maîtrise des processus microbiologiques et de leur mise en œuvre. Plusieurs disciplines scientifiques concourent au progrès des bioprocédés telles la microbiologie, le génie des procédés, l'automatique, l'informatique....

Les recherches biologiques fondamentales, et le développement des capteurs ainsi que des outils de mesure, ont contribué à une meilleure connaissance des micro-organismes, d'une part, et d'autre part, à innover dans leur utilisation. Par contre, l'optimisation et l'automatisation, partielle ou totale, des bioprocédés visent à :

- garantir au produit fini la conformité et la qualité requises de manière reproductible,
- assurer la rentabilité maximale du procédé.

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes dont quelques espèces sont utilisées industriellement. C'est le cas, notamment, de *Saccharomyces cerevisiae*. Outre son utilisation courante dans la panification et la fermentation alcoolique, cette levure est considérée comme un micro-organisme modèle pour des recherches fondamentales et appliquées.

Les potentialités biologiques de cette levure ont suscité beaucoup d'intérêt. Les connaissances acquises sur ce micro-organisme sont nombreuses tant sur le plan biologique que sur le plan procédé. Cependant, elles ont été, pour la plupart, obtenues dans l'objectif d'élucider un problème ou de répondre à une question précise. De ce fait, certains phénomènes, notamment biologiques, n'étaient pas suffisamment étudiés, bien qu'ils puissent jouer un rôle important. Ainsi, l'évolution des concentrations intracellulaires des molécules énergétiques et carbonées (ATP, NADH, acétyl-CoA ...) est rapportée dans la littérature. Mais, ces travaux donnent une idée plutôt approximative sur les concentrations intra-cellulaires. Ceci rend difficile l'exploitation de ces résultats.

Sans doute, la quantification précise de molécules intracellulaires, aussi bien que des activités enzymatiques, n'est pas aisée. Mais, il est évident que l'obtention de telles informations serait d'un réel intérêt pour la compréhension du rôle de ces composés et la modélisation des mécanismes de régulation.

L'amélioration et la mise au point de techniques, directes ou indirectes, d'observation et de quantification apparaissent primordiales pour une meilleure connaissance et maîtrise des processus microbiologiques.

Dans le cadre de cette thèse, l'objectif du travail est d'apporter une contribution à la connaissance physiologique et la mise en œuvre de cette levure. On s'intéressera à :

- i) rassembler, harmoniser et structurer la connaissance, déjà acquise, sur cette levure,
- ii) développer et/ou améliorer l'exploitation et le traitement mathématique des données et des mesures expérimentales,
- iii) apporter de nouvelles connaissances sur la croissance et les mécanismes régulateurs que met en jeu ce micro-organisme,
- iv) synthétiser et formuler l'ensemble des connaissances acquises dans d'un modèle,
- v) étudier la faisabilité et les performances de nouvelles techniques de commande appliquées au procédé de culture de levure en réacteur semi-continu alimenté.

ORGANISATION DE LA THESE :

Les objectifs de ce travail ont été abordés en trois sections distinctes. La première concerne le développement de méthodes de traitement de mesures expérimentales. La deuxième partie présente les résultats des cultures réalisées. Les aspects cinétiques, énergétiques, physiologiques et la modélisation y sont étudiés. Enfin la troisième section est consacrée à une étude comparative de techniques de commande d'un procédé de culture de levure en réacteur semi-continu.

Traitement des mesures :

Les résultats bruts issus d'une expérience sont, généralement, entachés de bruit et d'erreur. Le traitement de ces résultats, dans le but d'extraire l'information utile, est une étape essentielle, car elle détermine la validité des résultats et de leur interprétation. Généralement, le filtrage de données bruitées utilise des informations sur la mesure et le bruit, tel un modèle de référence ou une pré-estimation. Dans le cas des cultures de micro-organismes, il est difficile d'avoir une information *a priori*, et il devient nécessaire de procéder autrement afin de traiter les résultats. A ce titre, une méthode permettant de contourner cette difficulté, sera proposée.

Un autre aspect de traitement des données est celui de la quantification des fuites et pertes des composés volatils. La culture aérobie de la levure s'accompagne de la production d'acétaldéhyde. Cette molécule est très volatile. Les quantités entraînées hors du réacteur dépendent des conditions de culture. Dans le but d'estimer ces pertes et d'en tenir compte dans les bilans de matière, une étude complète de ce phénomène d'entraînement sera réalisée.

Cinétique, énergétique cellulaire, physiologie et modélisation :

La plupart des travaux concernant *Saccharomyces cerevisiae* s'accordent sur certaines caractéristiques globales de sa croissance. Quand elle est cultivée sur un milieu riche en glucose, cette levure produit de l'éthanol : c'est la "fermentation". Ce phénomène se caractérise par un faible rendement de conversion du glucose en biomasse (0,12-0,16 g/g). Contrairement à la respiration, lorsque la concentration du glucose est inférieure à 0,1-0,5 g/l, ce rendement

est de l'ordre de 0,5. En absence de glucose, la levure peut assimiler l'éthanol avec un rendement global de l'ordre de 0,55 à 0,65 g/g. Les cinétiques rapportées dans la littérature diffèrent, souvent, d'un auteur à l'autre. Bien que cela puisse être expliqué par la variation des souches de levures étudiées, ou des conditions de leur mise en culture, certaines questions restent posées. Elles concernent :

- l'existence d'un rendement constant de conversion du glucose en éthanol,
- la détermination de l'étape ou le mécanisme clé déclenchant la voie fermentaire,
- la signification de la maintenance cellulaire. Est-elle constante ou variable, et si elle varie, comment et dans quelle proportion,
- la différence de la vitesse spécifique d'assimilation d'oxygène sur éthanol et sur glucose,
- les mécanismes mis en jeu par la levure pour s'adapter à l'assimilation de l'éthanol .

Dans cette partie, nous aborderons ces interrogations parmi d'autres, et nous essayerons d'apporter des réponses précises, et en cohérence avec la littérature quand cela est possible.

A cet effet, notre travail sera développé en quatre d'étapes successives :

i) les résultats expérimentaux seront soumis à une validation par des bilans de matière globaux. Ensuite, un modèle mécanistique sera proposé dans lequel les principales voies métaboliques sont représentées par des schémas réactionnels strictes. Ces bilans devront prendre en compte les molécules énergétiques mises en jeu au cours de ces processus métaboliques (ATP, NADH) et les principaux intermédiaires carboné (pyruvate, acétate, acétaldéhyde, acétyl-CoA).

ii) nous déterminerons la maintenance et certains paramètres cinétiques de la croissance de la levure sur glucose et sur éthanol,

iii) une analyse physiologique détaillée sera effectuée en se basant sur l'ensemble des résultats cinétiques obtenus. Nous essayerons de comprendre les phénomènes énergétiques et les mécanismes de contrôle essentiels, et postulerons les hypothèses correspondantes,

iv) un modèle mathématique, basé sur le bilan de matière et d'énergie cellulaire, sera proposé afin de tester la validité de nos hypothèses.

Commande du procédé de culture de levure en réacteur semi-continu :

La culture de levure en réacteur semi-continu est un procédé très utilisé dans les industries de valorisation de sous-produits agro-alimentaires en biomasse. Assez récemment, ce même procédé est utilisé pour la production de molécules à haute valeur ajoutée avec des levures recombinées.

Toutefois, la conduite optimale de ce procédé est assez difficile, du fait que le comportement physiologique de la levure de boulangerie est très sensible au glucose. Des

concentrations résiduelles en glucose supérieures à 0,1 - 0,5 g/l, suffisent pour induire la voie de "fermentation". Le pilotage de ce type de procédé réside dans le calcul du débit d'alimentation du réacteur par une solution mère très concentrée en glucose (200-300g/l). Plusieurs techniques de commande peuvent être utilisées pour piloter le débit (entrée du système) en fonction de l'état du procédé. Industriellement, les régulateurs du type PID (Proportionnel Intégral et Dérivé) sont les plus répandus. Cependant, des nouvelles techniques, utilisées dans d'autres domaines d'application en général plus simples, sont apparues.

Nous présentons, ici, une étude comparative, par simulation, de trois types de commandes à modèles internes. Ces commandes diffèrent, principalement, les unes des autres au niveau des modèles de comportement.

Pour commencer, nous effectuerons une recherche analytique de la stratégie et de la loi de commande théorique optimale à partir d'un modèle de connaissance dit physiologique. La solution mathématique à ce problème sera considérée comme "référence" afin d'étudier et comparer les performances des autres commandes dans les mêmes conditions.

Ensuite, nous mettrons au point une commande prédictive généralisée (GPC) basée sur un modèle de comportement de type (boîte noire) linéaire autoregréssif corrélé (C.A.R.I.M.A.). Les performances de cette technique seront comparées à celles d'une commande PID.

Enfin, nous aborderons la commande du procédé de culture en réacteur semi-continu par une approche de "logique floue". Le modèle de comportement est établi sous forme de règles de décision, dites "linguistiques". Les techniques de transformation et de traitement de ce type d'information y sont, également, développées.

PARTIE 1

SOMMAIRE

Validation de mesures et analyse cinétique de bioprocédés par filtrage numérique non stochastique.....	5
RESUME	5
I. INTRODUCTION	5
II. METHODOLOGIE.....	6
II.1. Le filtre passe-bas	6
II.2. Lissage pour interpolation et calcul de variations.....	7
II.3. Organigramme de la procédure de traitement.....	8
III. RESULTATS ET DISCUSSION	8
IV. CONCLUSION	14
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	15
Calcul de l'équilibre Liquide - Vapeur.....	17
I. EXPRESSION DE LA CONSTANTE D'EQUILIBRE.....	17
I.1. Calcul de Φ^V	17
I.2. Calcul de Φ^L	18
I.3. Calcul de ϕ^L	19
II. RESULTATS ET DISCUSSION	21
II.1. Le coefficient d'activité ϕ^L	21
II.2. Le rapport Φ^L^*/Φ^V	22
II.3. Le volume molaire de la phase liquide v_l	24
II.4. Erreur relative maximale sur la constante d'équilibre	24
II.5. Effet des électrolytes sur la constante d'équilibre.....	25
II.6. Calcul d'erreur sur le coefficient global de transfert	26
III. CONCLUSION.....	27
Entraînement de l'acétaldéhyde par aération :	
Cinétique et Modélisation.....	28
RESUME.....	28
INTRODUCTION	28
I. MATERIEL ET METHODES.....	29
II. BILAN DE MATIERE ET EXPRESSION DE f ET DE K.....	29
III. CALCUL DE LA CONSTANTE D'EQUILIBRE m	32
IV. RESULTATS ET DISCUSSION	34
IV.1 Système " Eau-Acétaldéhyde"	34
IV.2 Système " Milieu de culture - Acétaldéhyde".....	39
V. CONCLUSION.....	44
REFERENCES.....	47

Validation de mesures et analyse cinétique de bioprocédés par filtrage numérique non stochastique.

RESUME :

Les cultures microbiennes sont des processus multivariables, complexes et hautement non-linéaires. L'observation échantillonnée et l'analyse de ces systèmes se heurtent à des problèmes de validation des données expérimentales, particulièrement, en absence de modèle de référence. Ici, une méthode numérique mixte, n'utilisant pas de modèle de référence, est proposée. Cette méthode utilise un filtre fréquentiel à mémoire finie, du type passe-bas. Les mesures filtrées sont, ensuite, lissées par des polynômes locaux glissant par recouvrement. Une application a été développée sur une culture de levure en réacteur discontinu, et a permis l'estimation des variables d'états et des paramètres cinétiques des processus expérimentaux observés.

I. INTRODUCTION :

Lors de l'étude d'un système physique, des bruits de différentes origines peuvent interférer sur les mesures. La qualité et la fiabilité de l'exploitation de ces données sont tributaires, en grande partie, des méthodes d'extraction de l'information utile. Le traitement du signal regroupe l'ensemble de ces méthodes qui ont connu un essor grâce aux progrès de l'analyse numérique et de l'informatique [8,11]. Ces techniques ont été, pour l'essentiel, appliquées à l'électricité, la télécommunication et en aéronautique [3,7,15]...

Depuis une trentaine d'années, ces méthodes n'ont cessé de s'étendre à d'autres domaines, notamment les procédés chimiques et biochimiques. Grâce à l'amélioration de l'instrumentation de ces procédés [4], le flux d'information est devenu considérable, nécessitant son traitement et sa structuration. Ces dernières opérations sont particulièrement complexes dans le cas des bioprocédés et suggèrent des approches singulières et adaptées [9,10,14]. De nombreux travaux ont été entrepris dans cet objectif [1,5,6,12] et ont contribué à l'amélioration de ces procédés.

Ce travail est une contribution, et une application, d'un aspect du traitement du signal aux biotechnologies. Son objectif est la mise au point d'une méthode de traitement et de validation de mesures expérimentales brutes afin de les préparer aux analyses cinétiques

ultérieures. Cette étape est capitale dans la mesure où elle conditionne, directement, les interprétations biologiques conséquentes et la modélisation du ou des processus mis en jeu. La méthode proposée est une procédure enchaînant un filtre passe-bas à un lissage polynomial. Le filtre a pour rôle de soustraire les signaux de hautes fréquences, assimilés aux bruits. Ce type de filtrage a l'avantage de s'affranchir, d'une part, des propriétés statistiques du bruit, et d'autre part, des prédictions *a priori* (pré-estimation). Le lissage est utilisé dans le but unique d'identifier une expression polynomiale locale du signal filtré avec un degré de corrélation maximum. La dérivation analytique de cette expression permet d'estimer, avec une bonne précision, les variations instantanées de la variable étudiée. Dans ce cadre, des exemples d'application sur des mesures réelles obtenues à partir de résultats de culture de levure de boulangerie sur glucose sont présentés.

II. METHODOLOGIE :

II.1. Le filtre passe-bas :

Le choix du filtre numérique passe-bas a été retenu pour différentes raisons. En particulier, ce filtre n'utilise pas les propriétés statistiques du bruit. Celles-ci sont, souvent, difficilement quantifiables en raison de la multitude des sources de bruitage interférant sur le système. Dans ce cas le signal est traité, uniquement, en fonction de sa composition fréquentielle. Le signal est transformé en une somme de fonctions sinusoïdales ayant chacune une pulsation propre. Ce filtre, par sa structure, permet de soustraire au signal brut la composante de fréquence donnée. D'une manière générale, on cherche à éliminer toute une bande de haute fréquence assimilée à la résultante des bruits affectant le signal utile. De plus, cette famille de filtres a l'avantage, d'une part, de la facilité du réglage et de l'adaptation, vu le nombre restreint de paramètres requis, et d'autre part, profite de l'aisance de programmation sur les calculateurs numériques.

Le filtre passe-bas utilisé est défini par la combinaison linéaire symétrique suivante :

$$\overline{y}(t) = \sum_{i=-n}^{i=n} A_i y(t+i\Delta t) \quad (1)$$

où : les $y(t+i\Delta t)$ représentent une série de mesures successives, régulièrement échantillonnées à une cadence Δt , encadrant la valeur $y(t)$ à filtrer ($i = 0$),
 A_i sont des coefficients de pondération définissant le filtre,
 $(-n, n)$ définit l'horizon du filtre : $2n + 1$ est le nombre de coefficients, avec $n \geq 0$,
 $\overline{y}(t)$ est la valeur filtrée de $y(t)$.

La synthèse du filtre est l'identification des coefficients " A_i ". Le principe de cette recherche consiste à minimiser la distance séparant la fonction de transfert du filtre analogique de la fonction de transfert du filtre numérique (1).

Généralement, l'étude des propriétés de la fonction de transfert d'un système est réalisée avec des transformées en Z (pour une mesure $y(t+i\Delta t)$ est associé Z^i , où Z est complexe) ou en ω (pour $y(t+i\Delta t)$ on associe $e^{j\omega(t+i\Delta t)}$, ω étant la pulsation du signal entrant). Dans les deux cas de transformation, les résultats aboutissant à la synthèse du filtre, sont les mêmes. Les coefficients du filtre sont donnés par l'expression suivante [13] :

$$A_i = \frac{\pi}{2i} \frac{\sin(\omega_1 i\Delta t) + \sin(\omega_2 i\Delta t)}{\pi^2 - (i\Delta t)^2 (\omega_1 - \omega_2)^2} \quad (2)$$

où : ω_1 et ω_2 sont les pulsations qui définissent la plage de coupure du filtre.

Ainsi, à travers ces coefficients A_i , le filtre prendra en compte la cadence d'échantillonnage Δt , et les propriétés fréquentielles du signal, ω_1 et ω_2 . Pour Δt et (ω_1, ω_2) donnés, l'efficacité du filtre ne dépendra plus que de son horizon, $2n+1$, qui sera défini en fonction de la taille de la série de mesures à traiter.

II.2. Lissage pour interpolation et calcul de variations :

Le lissage, utilisé dans ce travail, est du type polynôme local. La procédure consiste à identifier un polynôme $P(t)$ de degré " p " qui décrit analytiquement une série de mesures filtrées successives de taille " m " telle que $m \geq p+1$. La variation du signal en fonction du temps est, alors, obtenue par dérivation de $P(t)$, t étant la variable temporelle. Une fois cette opération réalisée, cette même procédure est appliquée à la série de mesures suivante. Enfin, pour assurer la continuité du lissage, le glissement d'une série à la suivante a été effectué avec recouvrement partiel de la nouvelle série par l'ancienne. Cette solution permet de réduire l'erreur sur le calcul des variations et de garantir la continuité aux extrémités de la série lissée. Les coefficients, a_i , du polynôme sont donnés par l'expression suivante [13] :

$$\begin{pmatrix} a_0 \\ a_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ a_p \end{pmatrix} = (Q^T Q)^{-1} Q^T \begin{pmatrix} \overline{y_1} \\ \overline{y_2} \\ \cdot \\ \cdot \\ \overline{y_m} \end{pmatrix} \quad (3)$$

où : $\overline{y_i}$ est la mesure filtrée de $y(t + i\Delta t)$, $1 \leq i \leq m$
 Q^T est la matrice transposée de Q .
 $(Q^T Q)^{-1} Q^T$ est la pseudo-inverse de la matrice Q .
 Q est une matrice rectangulaire $(m, p+1)$ définie comme suit :

$$Q = \begin{bmatrix} 1 & t_1 & t_1^2 & \cdot & \cdot & t_1^p \\ 1 & t_2 & t_2^2 & \cdot & \cdot & t_2^p \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & t_m & t_m^2 & \cdot & \cdot & t_m^p \end{bmatrix}$$

avec $t_i = t + i\Delta t$, "m" est la taille de la série à lisser, "p" est le degré du polynôme $P(t)$.

II.3. Organigramme de la procédure de traitement :

Le traitement d'une série de mesures s'effectue en deux étapes successives, comme le montre la figure 1. Dans un premier temps, la procédure de filtrage est initialisée par des valeurs approximatives de ω_1 et ω_2 , pour Δt et n donnés. Les valeurs filtrées, $\overline{y_i}$, sont ensuite comparées aux mesures brutes. Si le résultat n'est pas satisfaisant, ω_1 et ω_2 seront réajustées jusqu'à suppression des bruits et obtention de valeurs régulières et représentatives du signal initial. Dans un deuxième temps, les valeurs filtrées finales sont subdivisées en fenêtres, de taille "m" avec ou sans recouvrement, puis lissées. Le polynôme obtenu, à chaque étape de lissage, est dérivé analytiquement pour calculer les variations instantanées du signal. Ce même polynôme peut être utilisé pour générer des valeurs intermédiaires en cas de besoin. A partir du signal filtré et de la mesure de sa variation, l'ensemble de ces informations peut être utilisé pour des analyses cinétiques et des interprétations biologiques.

II. RESULTATS ET DISCUSSION :

Dans ce travail, un exemple d'application est présenté. Il s'agit de la bioconversion du glucose par une levure de boulangerie, en réacteur discontinu. Ce type de processus présente des difficultés pratiques de traitement de données. Ces problèmes sont dus à la non-linéarité et la non-stationnarité des phénomènes biologiques mis en jeu. En effet, ces cultures, comme toute autre prolifération microbienne, sont des transformations autocatalysées à cinétiques complexes. Les cellules, catalyseurs de la bioconversion, modifient la composition du milieu de culture par consommation du substrat et production de métabolites. Cette évolution du milieu

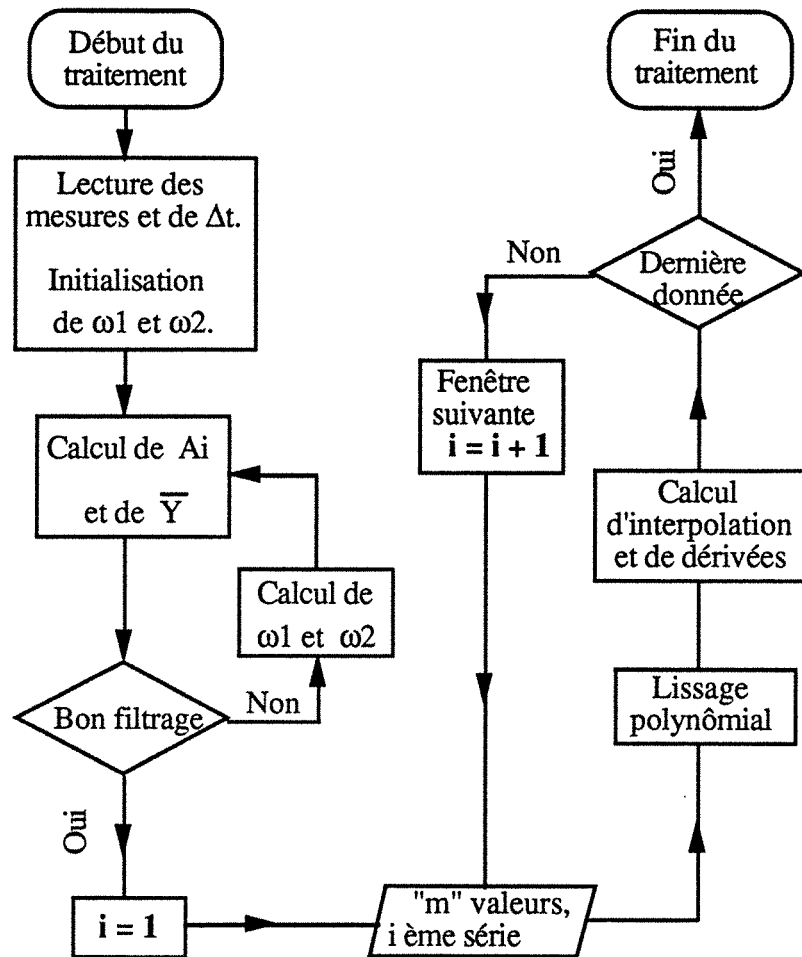


Figure 1 : Organigramme simplifié des étapes de traitement des mesures brutes.

réactionnel provoque, en retour, la modification de l'activité et des propriétés catalytiques du micro-organisme lui-même.

La bioconversion aérobie du glucose par la levure de boulangerie conduit, essentiellement, à la production de nouvelles cellules, biomasse, et d'éthanol. Ces cellules consomment, également, de l'oxygène et produisent du dioxyde de carbone. L'étude et le suivi de ce processus sont rendus possibles par la mesure de la concentration des différents constituants et la détermination de leurs vitesses spécifiques de production ou de consommation. Le cas choisi concerne une culture réalisée à 20 g/l de glucose initial, en réacteur discontinu. Les résultats, issus de cette expérience, ont été traités dans les conditions suivantes :

- i) Pour le filtre : $\omega_1 = 0,1$ rad/h; $\omega_2 = 0,3$ rad/h; $\Delta t = 0,25$ h et $n = 6$.
- ii) Pour le lissage polynomial : $p = 3$; $m = 5$. Le recouvrement est de 80%.

La figure 2 montre l'évolution des concentrations mesurées du glucose, de la biomasse et de l'éthanol en comparaison avec les valeurs traitées, courbes continues. Les mesures brutes et filtrées des vitesses de consommation de l'oxygène ainsi que de production du CO₂ sont présentées dans la figure 3. Le quotient respiratoire, QR : rapport de ces deux vitesses (CO₂/O₂), est une variable indicatrice de l'état du métabolisme de la levure. Un QR élevé signifie une forte déviation du flux de glucose vers la production d'éthanol. Par contre, des valeurs de QR voisines de l'unité traduisent une croissance exclusivement respiratoire. Cette variable peut être utilisée pour le contrôle de ce procédé [2]. Toutefois, la mesure brute du QR n'est pas directement exploitable à cause du bruit amplifié provenant des erreurs cumulées sur les vitesses du CO₂ et de O₂ d'où la nécessité d'un traitement. La figure 3 montre, en effet, que les valeurs du QR, obtenues après filtrage des vitesses du CO₂ et de O₂, sont nettement plus régulières que les mesures brutes. Cette première étude comparative, entre les mesures et leurs estimées, montre l'intérêt de ce type de filtrage qui, d'une part, s'affranchit du modèle de référence, et d'autre part, fournit des résultats très satisfaisants, pouvant être analysés.

L'étape suivante consiste à calculer, par lissage, les variations instantanées de chaque composé à partir des valeurs filtrées. Dans le cas d'un réacteur discontinu, ces variations sont identiques aux vitesses de production ou de consommation du composé suivi. Ces vitesses rapportées à la biomasse totale, deviennent des vitesses spécifiques d'utilisation, pour le glucose, et de production, pour la biomasse et l'éthanol (figure 4). A partir de ces informations, une analyse cinétique du processus peut être réalisée. Par exemple, on observe que ces vitesses évoluent au cours du temps de culture. Chaque vitesse passe par une valeur maximale : 0,6 h⁻¹ pour la biomasse, 1,8 g/g/h pour l'éthanol et 5,7 g/g/h pour le glucose. La figure 5 montre que la cinétique de production de l'éthanol apparaît proportionnelle à celle de l'utilisation du glucose. Cette constatation peut se traduire par un rendement global de conversion constant, égal à 0,39 g d'éthanol par g de glucose. On peut, également, observer qu'en dessous d'un flux minimum de glucose, égal à 0,4 g/g/h, l'éthanol n'est pas produit. Le QR est alors compris entre 1 et 1,5, traduisant un métabolisme respiratoire.

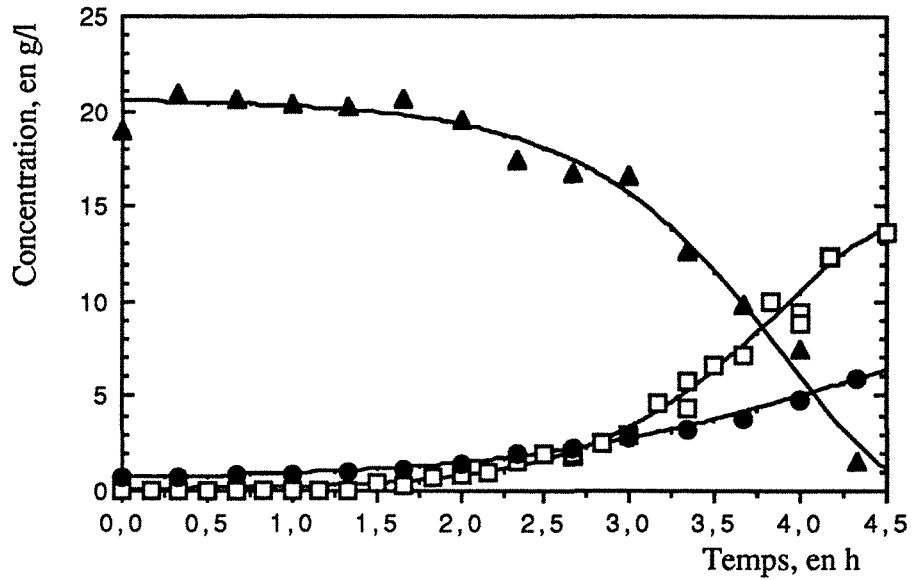


Figure 2 : Evolution des concentrations du glucose (▲), de la biomasse x2 (●) et de l'éthanol x2 (□) en fonction du temps de fermentation, comparées aux données filtrées (traits).

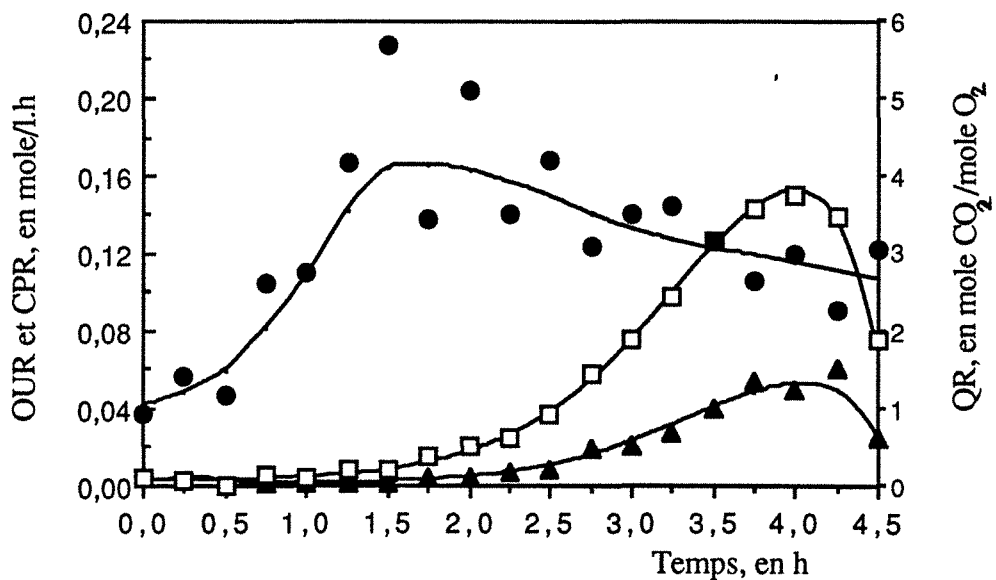


Figure 3: Evolution des vitesses de consommation de l'oxygène, OUR (▲), de production du CO₂, CPR (□) et du quotient respiratoire, QR (●) comparés aux mesures filtrées (traits).

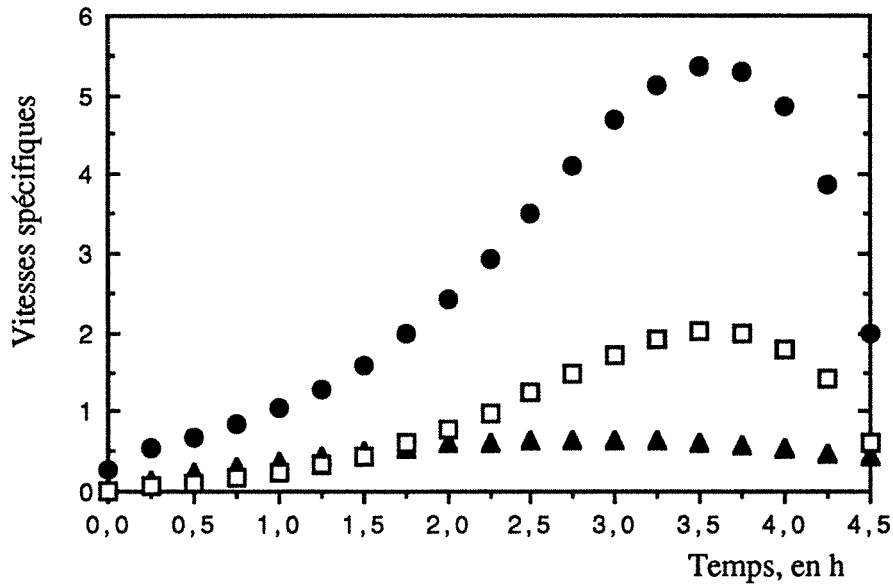


Figure 4 : Evolution des vitesses spécifiques calculées, en g de produit par g de matière sèche et par heure. Biomasse (▲), éthanol (◻) et glucose (●).

De la même façon, la cinétique de la croissance cellulaire peut être étudiée en rapport avec d'autres variables du système. La figure 6 montre l'évolution de la vitesse spécifique de croissance en fonction de la consommation du glucose. Contrairement à l'éthanol, la stœchiométrie Biomasse/Glucose varie au cours de la culture. Selon la vitesse d'assimilation du sucre, la croissance cellulaire peut être découpée en deux phases. La première est linéaire lorsque la vitesse d'utilisation du glucose est inférieure à 1,2 g/g/h. Dans la deuxième phase, la croissance se dissocie de l'assimilation du glucose et reste relativement stable, puis diminue en fin de culture. Cette chute de la croissance ne peut pas être due à une limitation en glucose puisqu'il continue à être assimilé à des vitesses élevées (> 1,5 g/g/h). Par contre, il peut s'agir d'une inhibition causée par l'accumulation de l'éthanol dans le milieu réactionnel. Le tracé de l'inverse de la vitesse spécifique de croissance en fonction de l'éthanol produit (figure 7), permettra de préciser la nature et l'ordre de grandeur de cette inhibition. Dans le cas de cette expérience, l'éthanol inhiberait la croissance selon un effet du type :

$$\mu = \mu^m \frac{K_i}{K_i + Eth} \quad \text{où} \quad \begin{cases} \mu & : \text{vitesse spécifique de croissance,} \\ \mu^m & : \text{vitesse théorique maximale,} \\ Eth & : \text{concentration de l'éthanol,} \\ K_i & : \text{la constante d'inhibition.} \end{cases}$$

L'inversion de cette équation, permet de linéariser $\frac{1}{\mu}$ en fonction de Eth, pour déterminer, par exemple, les valeurs de $\mu^m = 0,75 \text{ h}^{-1}$ et de $K_i = 13,1 \text{ g/l}$ d'éthanol. Cette équation est représentée par une droite dans la figure 7.

L'utilisation de la méthode proposée peut conduire à une exploitation plus approfondie des résultats expérimentaux pour une meilleure compréhension et pour la détermination de corrélations quantitatives caractéristiques des phénomènes mis en jeu. La culture de levure, en réacteur discontinu, est un processus en régime transitoire au cours duquel peuvent être étudiées l'évolution de plusieurs variables telles que les concentrations et, surtout, les vitesses de réactions. L'obtention de corrélations et l'estimation de paramètres cinétiques, présentées dans cet exemple, illustrent l'intérêt de la technique pour la validation et l'exploitation de données brutes.

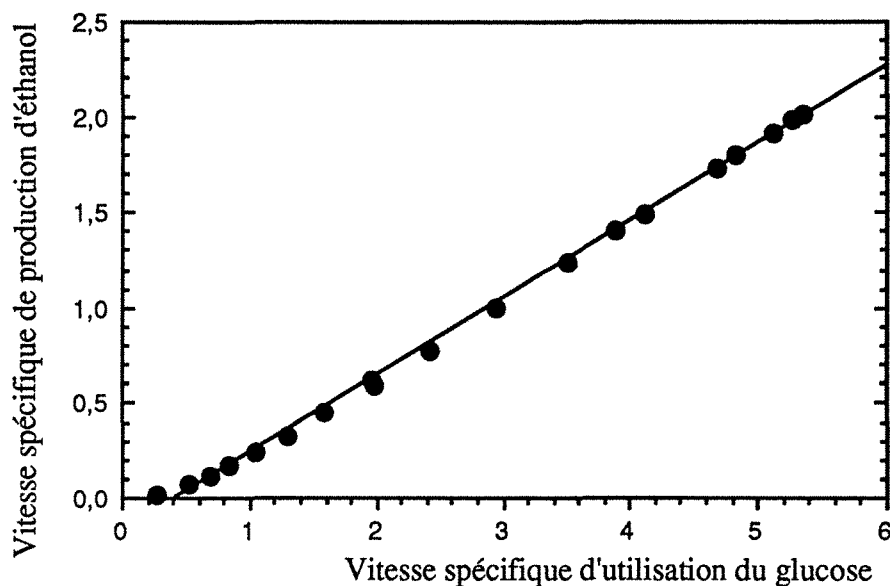


Figure 5 : Détermination du rendement de conversion du glucose en éthanol par représentation des vitesses spécifiques instantanées, en g/g/h.

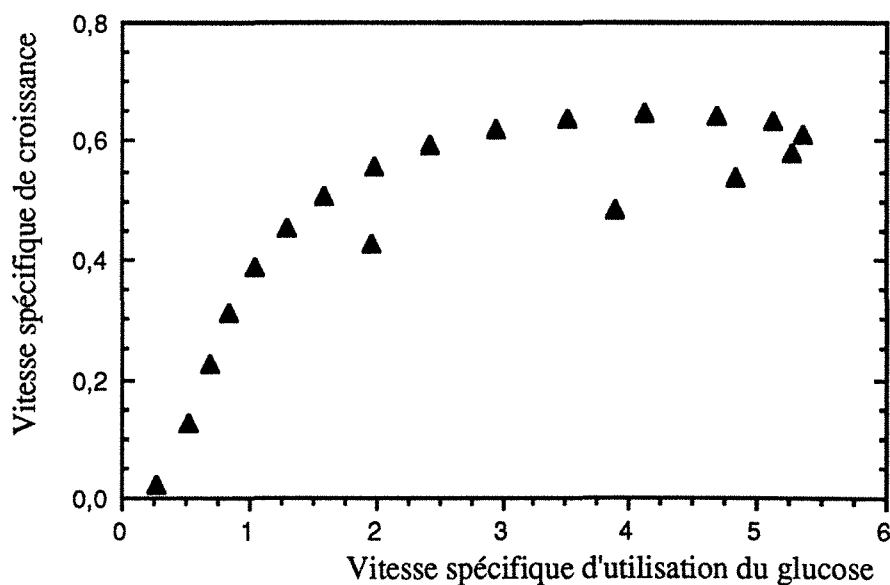


Figure 6 : Evolution de la vitesse de croissance en deux phases avec la vitesse d'utilisation du glucose (vitesses spécifiques exprimées en g/g/h).

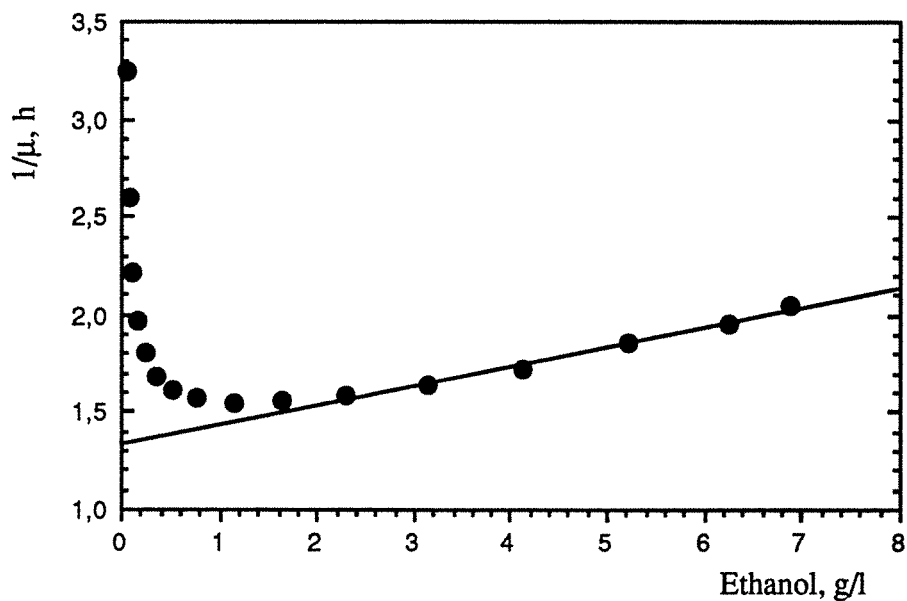


Figure 7 : Evolution de l'inverse de la vitesse spécifique de croissance, $1/\mu$, en fonction de la concentration d'éthanol produit : mise en évidence d'un effet inhibiteur.

CONCLUSION :

La structuration de la connaissance sous forme de lois et de modèles représente souvent l'objectif d'un travail scientifique pour prédire l'évolution des processus réactionnels et les asservir. Pour cela, les trois étapes de la méthode scientifique, à savoir l'expérimentation, l'analyse et la modélisation, doivent être effectuées avec rigueur. On s'aperçoit rapidement que la validité des hypothèses et des lois, issues d'un tel travail, dépend directement de la qualité des résultats expérimentaux. Quand ils sont bruités et peu précis, ces résultats rendent la tâche du scientifique plus difficile, d'où la nécessité d'un outil d'aide à l'exploitation de données. C'est dans ce contexte que la technique proposée a été mise au point. Elle a été conçue de manière à contourner deux difficultés principales qui sont la connaissance *a priori* du processus (absence de modèle) et les propriétés statistiques du bruit interférant sur les mesures. Cette méthode utilise un filtre passe-bas suivi d'un lissage polynômial. C'est une procédure relativement facile à mettre au point et à programmer.

Dans l'exemple traité, des corrélations et des paramètres cinétiques ont été déterminés à partir de données expérimentales concernant une culture de levure sur glucose en réacteur discontinu. Les résultats obtenus montrent l'intérêt et l'efficacité de la technique. Cette méthode apporte une solution très satisfaisante, en particulier pour le calcul de variations instantanées, données nécessaires à la compréhension et à la modélisation d'un processus dynamique tel que les bioprocédés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1- Bastin, G, Dochain, D., "On-line estimation of microbial specific growth rates", *Automatica*, 22 (1986) 705-709 .
- 2- Bellgardt, K.-H., Kuhlmann, W., Meyer, H.-D., Schügerl, K., Thoma, M., " Application of an extended Kalman filter for state estimation of a yeast fermentation", *I.E.E. Proc.*, 133 (1986) 226-234.
- 3- Bryson, A. E., Henrikson L. J., "Estimation using sampled data containing sequentially correlated noise", *J. of Space-craft and Rockets*, 5 (1968) 662-681 .
- 4- Erikson, L. E., Stephanopoulos, G., "Biological reactors", Chap 13 in "Chemical reaction and reactor engineering", Carberry, J. J., Varma, A., Dekker, M., Inc., New York, (1985).
- 5- Ghoul, M., Dardenne, M., Fonteix, C., Marc, A., "Extended Kalman filtering technique for the on-line control of OKT3 hybridoma cultures", *Biotechnol. Tech.*, 5 (1990) 367-370.
- 6- Gu, M. B., Park, M. H., Kim, D.-I., "Growth rate control in fed-batch cultures of recombinant producing hepatitis B surface antigen (HBsAg)", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35 (1991) 46-50.
- 7- Gunckel, T. L., "Orbit determination using Kalman's method", *J. of the Navigation (U.S.A.)*, 10 (1963) 273-289.
- 8- Helms, H. D., "Fast Fourier transform method of computing difference equations and simulating filter", *IEEE tr. on Audio and Electroacoustics*, AU15, (1967) 85-91.
- 9- Lee, S. C., Wang, Y. B., Chang, H. N., "Adaptive control of dissolved oxygen concentration in a bioreactor", *Biotechnol. Bioeng.*, 37 (1990) 597-607.
- 10- Munack, A., Manfred T., "Application of modern control for biotechnological processes", *I.E.E. Proc.*, 133 (1986) 194-198.
- 11- Nowak, D. J., Schmid, P. E., "Introduction to digital filters", *IEEE tr. on Electromagnetic Compatibility*, EMC10, (1968) 209-226.
- 12- O' Connorg, M., Sanchez-Riera, F., Coony, C. L., "Design and evaluation of control strategies for high cell density", *Biotechnol. Bioeng.*, 39 (1992) 293-304.
- 13- Radix, J.-C., "Introduction au filtrage numérique", pp. 30-35, pp. 68-69, Eyrolles, Paris, 1970.
- 14- Sonnleitner, B., Käppeli, O., "Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its respiratory capacity : formulation and verification of a hypothesis", *Biotechnol. Bioeng.*, 28 (1986) 927-937.
- 15- Sutherland, A. A.-Jr, "The Kalman filter in tarsnfert alignment inertial guidance systems", *J. of Space-craft and Rockets*, 5 (1968) 1175-1192.

INTRODUCTION

Lors de la croissance de la levure de boulangerie sur glucose ou sur éthanol, il y a production d'acétaldéhyde. Cette molécule est un intermédiaire métabolique carrefour entre la voie de la fermentation du glucose et celle de la respiration de l'éthanol. Au cours de la croissance de la levure, l'acétaldéhyde est produit à faible quantité dans le milieu de cultures (de quelques mg/l à 1 g/l). L'évolution de sa concentration, au cours d'un bioprocédé, peut fournir de précieuses indications physiologiques et énergétiques sur l'état et l'activité du micro-organisme. Or, vu sa volatilité élevée (point d'ébullition : 20,2 °C) et en présence d'aération continue du milieu réactionnel, une fraction de la quantité d'acétaldéhyde produite va se trouver transférée vers les bulles gazeuses, l'air, puis entraînée à l'extérieur du réacteur. L'étude, avec précision, de la cinétique réelle de production ou de consommation de cette molécule, nécessite la quantification des pertes par entraînement.

L'objectif du présent travail est, précisément, la quantification et la modélisation de l'entraînement de l'acétaldéhyde. Deux parties sont développées :

- La première consiste à calculer la constante d'équilibre de l'acétaldéhyde entre la phase liquide et gaz du réacteur. Ce calcul sera développé dans le cas du système " Eau, Acétaldéhyde et Air ", puis sera étendu au système " Milieu de culture, Acétaldéhyde et Air ".

- La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'influence du débit d'air, du volume liquide, de l'agitation et de la température sur l'entraînement. Un modèle sera proposé afin de rendre compte de ces influences et prédire les cinétiques de transfert de l'acétaldéhyde dans le cas des deux systèmes étudiés.

Calcul de l'équilibre liquide-vapeur de l'acétaldéhyde.

I. EXPRESSION DE LA CONSTANTE D'EQUILIBRE :

Le calcul des équilibres de phase des systèmes à constituants multiples est basé sur le concept du potentiel chimique dû à J. W. Gibbs. Il a démontré qu'à l'équilibre, les potentiels chimiques de chaque constituant sont, comme la température et la pression, égaux dans toutes les phases en présence. En pratique, une autre grandeur dérivée du potentiel chimique est utilisée : c'est la fugacité, introduite par D. N. Lewis. Tout comme pour le potentiel chimique, à l'équilibre, les fugacités d'un même constituant dans les différentes phases sont égales. Dans le cas des équilibres liquide - vapeur, l'égalité des fugacités pour un composé donné, conduit à l'expression suivante [10] :

$$y P \Phi^V = x \varphi^L \Phi^L \quad (1)$$

Où : x est la fraction molaire du composé, en équilibre, dans la phase liquide.

y est fraction molaire du constituant dans la phase vapeur.

P est la pression totale du système.

Φ^V est le coefficient de fugacité dans la phase vapeur.

φ^L est le coefficient d'activité dans la phase liquide.

Φ^L est la fugacité de référence dans la phase liquide.

La constante d'équilibre peut, ainsi, être exprimée comme suit :

$$M = \frac{y}{x} = \frac{\varphi^L \Phi^L}{P \Phi^V} \quad (2)$$

Les méthodes de calcul des quantités φ^L , Φ^L et Φ^V ont été, largement, explicitées et détaillées [22]. Dans le cas de ce travail, la phase vapeur sera composée d'air et d'acétaldéhyde. La phase liquide est binaire, composée d'eau et d'acétaldéhyde.

I.1. Calcul de Φ^V :

La thermodynamique fournit une relation pour le calcul du coefficient de fugacité en fonction du volume molaire partiel du constituant i , \bar{v}_i , :

$$\ln \Phi_i^V = \frac{1}{RT} \int_0^P (\bar{v}_i - \frac{R}{P}) dP \quad (3)$$

Le volume molaire partiel peut être obtenu par différenciation de l'équation d'état de la phase vapeur, sous forme de l'équation du viriel limitée aux deux premiers termes :

$$Pv = RT + B^M P \quad (4)$$

où v est le volume molaire du mélange gazeux, B^M est le second coefficient du viriel du mélange. Dans le cas du mélange Acétaldéhyde - Air, les équations (3) et (4) appliquées à l'acétaldéhyde conduisent, simplement, à :

$$\ln \Phi_1^V = [B_{11} + (1-y_1)^2 (2 B_{12} - B_{11} - B_{22})] \frac{P}{RT} \quad (5)$$

B_{ij} sont les seconds coefficients du viriel, parfaitement calculables selon des corrélations [10,11] utilisant les propriétés critiques des corps purs (Tableau 1) mis en jeu, avec l'indice 1 pour l'acétaldéhyde et 2 pour l'air.

	Tc degré K	Pc mm Hg	v_c m ³ /kmole	ω , facteur acentrique de Pitzer	μ , moment dipolaire en debyes
Acétaldéhyde	461,0	42332,0	0,1540	0,3030	2,5
Air	132,5	28644,4	0,0921	0,0305	0
Mélange	247,2	34310,9	0,9635	0,1668	0

Tableau 1 : Valeurs des propriétés critiques des constituants purs et du mélange [13,21].

I.2. Calcul de Φ^L :

Φ^L est, ici, une fugacité de référence ramenée à la pression réelle du système. Cette fugacité est fonction de plusieurs paramètres, notamment, de la pression de saturation de l'acétaldéhyde pur :

$$\Phi^L = \Pi^S \exp \left[\frac{B_{11} \Pi^S + v^{oL}(P-\Pi^S)}{RT} \right] \quad (6)$$

où : Π^S est la pression de saturation de l'acétaldéhyde pur.

v^{oL} est le volume molaire de l'acétaldéhyde à saturation de la solution.

L'acétaldéhyde est totalement miscible dans l'eau et ne présente pas de phénomène de saturation en solution aqueuse. v^{oL} devient, simplement, le volume molaire de l'acétaldéhyde pur et liquide à la température du système ($v^{oL} = 0,5644 \text{ m}^3/\text{kmole}$). Afin de faciliter l'analyse

des résultats, on utilisera la fugacité de référence sous sa forme réduite :

$$\Phi^{L*} = \frac{\Phi^L}{\Pi^S} \quad (7)$$

Les valeurs de pression de saturation en fonction de la température, Π^S , sont obtenues de la littérature sous forme de données numériques [2,18,22]. Ces données sont traitées et proposées, ici, selon la relation de Harlacher (la température est en K, Π^S en mmHg) :

$$\text{Ln} (\Pi^S) = - 23,8060 + \frac{936,5791}{T} + 5,5774 \text{Ln} (T) + \frac{382836,5092}{T^2} \quad (8)$$

Les résultats de simulation, issus de cette relation (8), s'accordent parfaitement avec les données expérimentales, de la littérature, dans le domaine des températures étudiées (Figure 1).

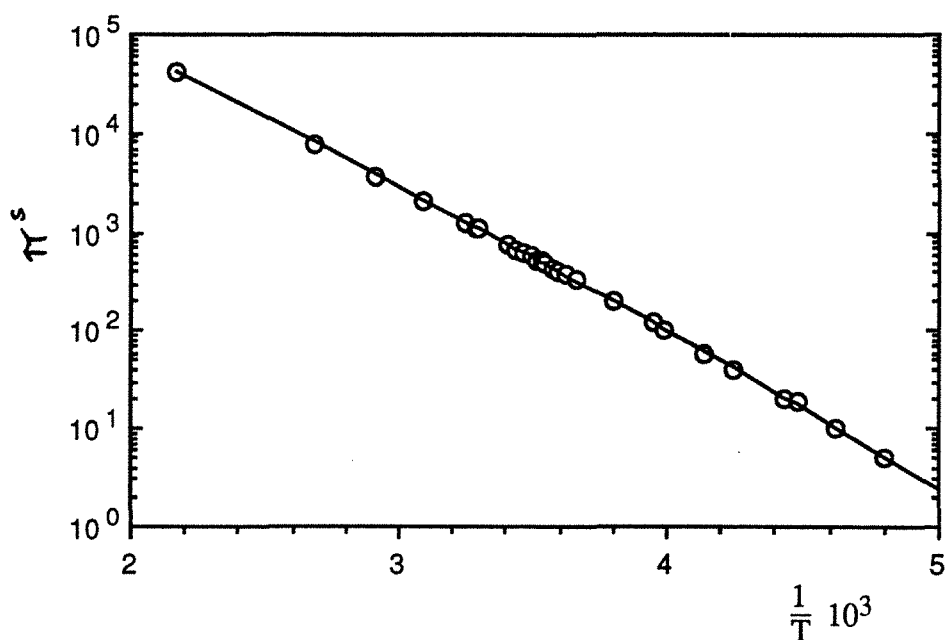


Figure 1: Comparaison des valeurs expérimentales [2,18,22] (symboles) aux valeurs calculées (trait) des pressions de saturation de l'acétaldéhyde pur.

I.3. Calcul de φ^L :

φ^L est le coefficient d'activité de l'acétaldéhyde dans l'eau. Ce coefficient peut être calculé selon plusieurs méthodes, dont une, très utilisée : la méthode NRTL (non-random two liquids) [10,14,15]. Dans ce travail, φ^L est calculée selon cette dernière approche. Le coefficient d'activité de l'acétaldéhyde dans l'eau, φ^L , est donné par l'expression suivante :

$$\text{Ln} (\varphi^L) = (1-x)^2 \left[\tau_{21} \left(\frac{G_{21}}{x + (1-x) G_{21}} \right)^2 + \frac{\tau_{12} G_{12}}{(1-x + x G_{12})^2} \right] \quad (9)$$

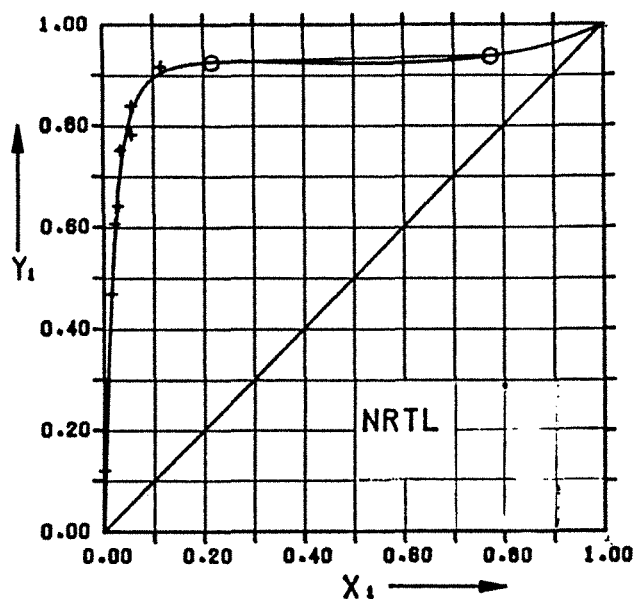
où : x est la fraction molaire d'acétaldéhyde.
 τ_{ij} et G_{ij} sont les paramètres de l'équation NRTL.

Ces paramètres sont fonction de trois constantes empiriques C_1 , C_2 et C_3 :

$$\tau_{12} = \frac{C_1}{RT} \quad \text{et} \quad \tau_{21} = \frac{C_2}{RT}$$

$$G_{12} = \exp(-C_3 \tau_{12}) \quad \text{et} \quad G_{21} = \exp(-C_3 \tau_{21})$$

Dans le cas du système Eau - Acétaldéhyde, les valeurs de ces trois constantes sont les suivantes : $C_1 = 615,7461$, $C_2 = 1297,371$ et $C_3 = 0,2827$. La figure 2 montre que la prédiction théorique de l'équilibre suit parfaitement les résultats expérimentaux [5].



*Figure 2 : Prédiction de l'équilibre liquide - vapeur par la méthode NRTL [5].
 $C_1 = 615,7461$, $C_2 = 1297,371$ et $C_3 = 0,2827$.*

Enfin, la constante d'équilibre, M , peut être exprimée, également, par le rapport des concentrations d'acétaldéhyde C_l et C_g , respectivement, dans la phase liquide et vapeur :

$$\begin{cases} x = C_l \nu_l & (\nu_l \text{ est le volume molaire de la phase liquide}) \\ y = C_g \frac{RT}{P} \end{cases}$$

Par substitution des expressions de x et y dans l'équation (2) et en tenant compte de (7), on obtient la constante d'équilibre pour les concentrations :

$$m = \frac{C_g}{C_l} = \phi^L \frac{\Phi^{L*}}{\Phi^V} \frac{\Pi^S}{RT} \nu_l \quad (10)$$

II. RESULTATS ET DISCUSSION :

II.1. Le coefficient d'activité ϕ^L :

Selon le modèle NRTL, ϕ^L a été calculé en faisant varier la température et la composition en acétaldéhyde de la phase liquide. Le coefficient d'activité diminue aussi bien avec les températures qu'avec les concentrations croissantes en acétaldéhyde (figure 3). Etant donné qu'au cours des fermentations la concentration en acétaldéhyde est faible ($x \leq 10^{-4}$), ce domaine de concentration a été plus particulièrement investi. La figure 4 montre que le coefficient d'activité dépend, surtout, de la température. Le tableau 2 résume l'ensemble de ces variations et des écarts relatifs maximum si ϕ^L est supposé indépendant de la composition.

ϕ^L	Température, °C					
	20	25	30	35	40	45
$\phi^{L\infty}(x = 0)$	20,223	19,304	18,453	17,664	16,930	16,247
$\phi^L(x = 10^{-3})$	19,853	18,959	18,130	17,360	16,645	15,979
$\bar{\phi}^L$	20,038	19,132	18,292	17,512	16,788	16,113
Ecart en %	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8

Tableau 2 : Approximation du coefficient d'activité par une valeur moyenne, $\bar{\phi}^L$, à faible concentration en acétaldéhyde et à différentes températures.

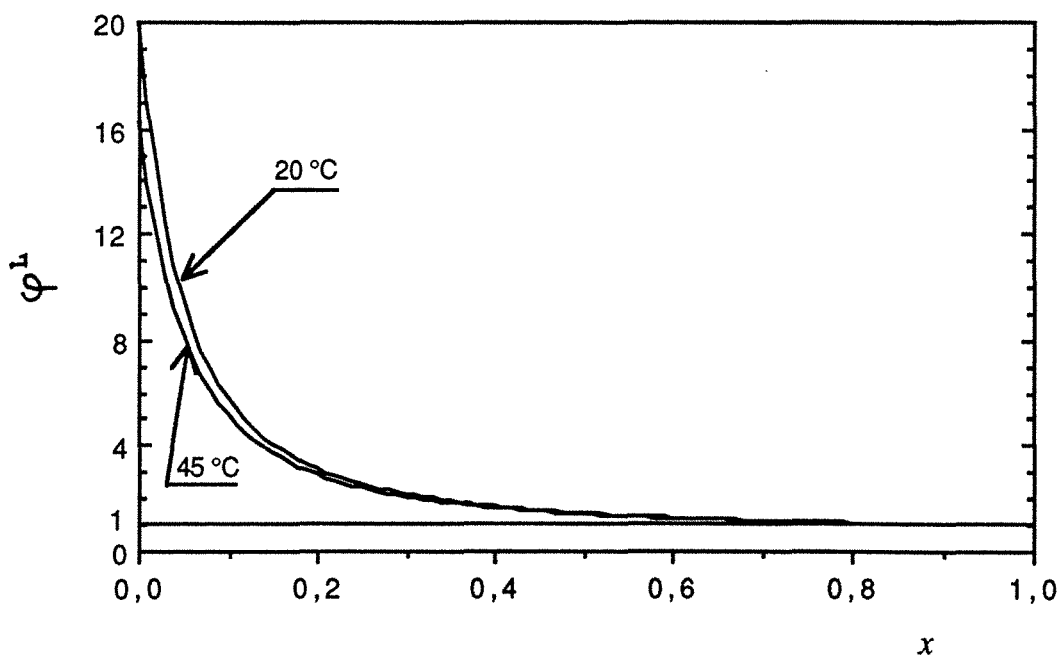


Figure 3 : Influence de la composition sur le coefficient d'activité de l'acétaldéhyde dans l'eau et à différentes températures.

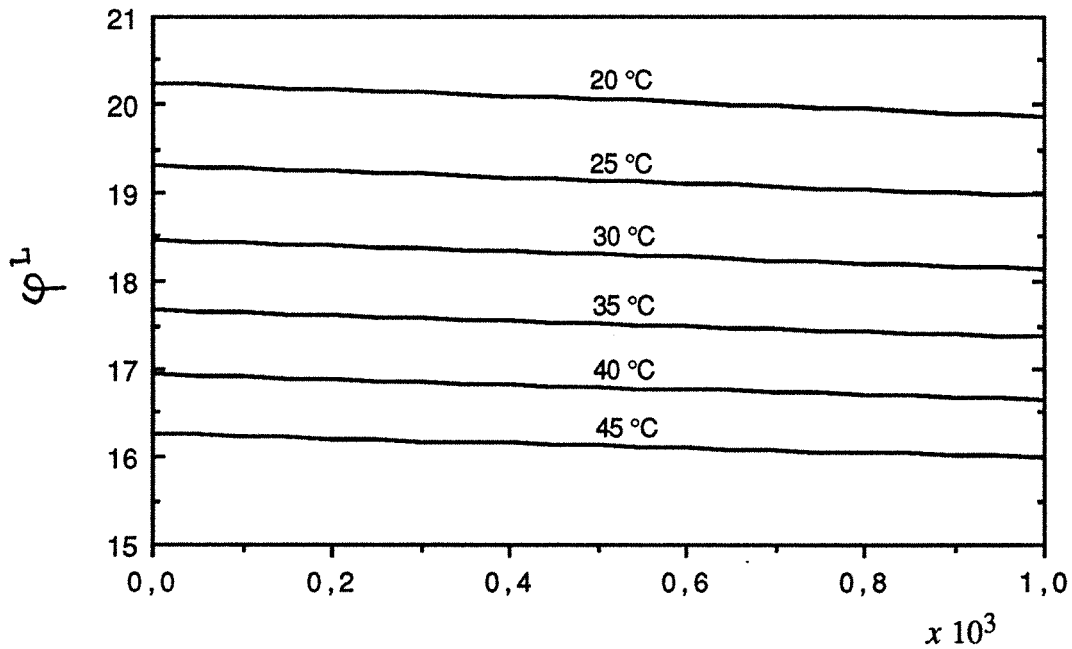


Figure 4 : Influence de la température sur le coefficient d'activité de l'acétaldéhyde pour des compositions molaires inférieures à 10^{-3} .

II.2. Le rapport Φ^{L^*}/Φ^V :

Quand ce rapport tend vers l'unité, il traduit l'idéalité de la phase vapeur. En effet, cette quantité a été calculée en fonction de compositions et températures variables. La figure 5 montre que ce rapport reste très proche de l'unité. Pour plus de précision, la figure 6 montre que dans le domaine de concentrations inférieures à 1 g/l ($x \leq 10^{-4}$), ce rapport est indépendant de la concentration, mais diminue avec des températures croissantes. Les comparaisons des valeurs minimales et maximales de Φ^{L^*}/Φ^V sont reportées dans le tableau 3 ainsi que les valeurs moyennes et les écarts relatifs.

Φ^{L^*}/Φ^V	Température, °C					
	20	25	30	35	40	45
Pour $x = 0$	1,011932	1,011640	1,011331	1,010981	1,010564	1,010048
Pour $x = 10^{-3}$	1,011908	1,011617	1,011309	1,010961	1,010544	1,010030
Moyenne	1,011920	1,011629	1,011320	1,010971	1,010554	1,010039
Ecart en ‰	1,2	1,1	1,1	1,0	1,0	0,9

Tableau 3 : Approximation du rapport Φ^{L^*}/Φ^V par une valeur moyenne à faible concentration en acétaldéhyde et à différentes températures.

Les résultats, présentés dans le tableau 3, permettent de retenir une valeur moyenne de Φ^{L^*}/Φ^V égale à 1,011 avec une écart relatif maximum de 0,1%. Φ^{L^*}/Φ^V devient indépendant de la température et de la concentration en acétaldéhyde dans les conditions de travail suivantes : $20\text{ °C} \leq T \leq 45\text{ °C}$ et $0 \leq x \leq 10^{-3}$.

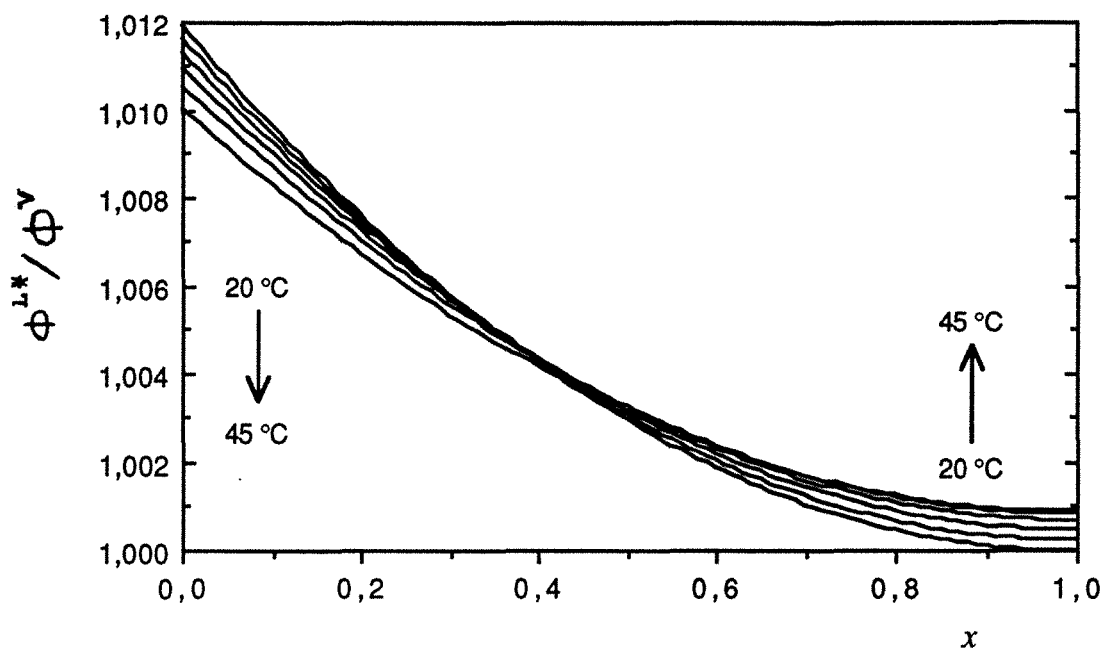


Figure 5 : Influence de la température et de la composition sur le rapport Φ^{L^*}/Φ^V .

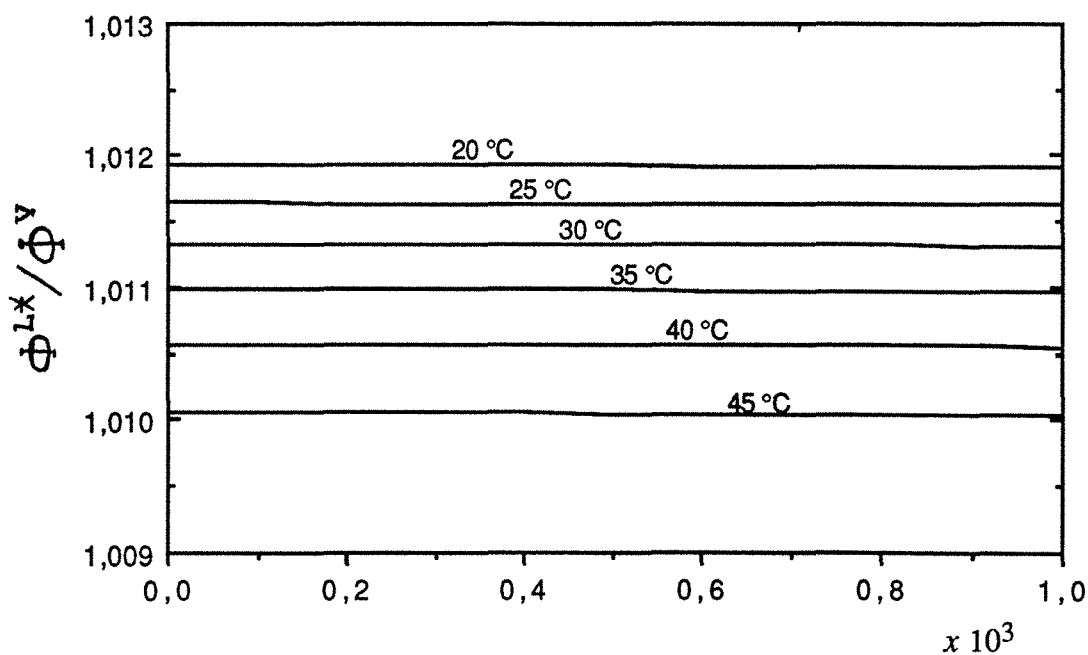


Figure 6 : Influence de la température sur le rapport Φ^{L^*}/Φ^V à des compositions molaires inférieures à 10^{-3} .

II.3. Le volume molaire de la phase liquide v_l :

Le volume molaire global de la phase liquide est fonction de la composition des différents constituants en présence. L'application de l'équation de l'énergie libre de Gibbs à cette phase liquide permet de tenir compte des volumes de mélanges :

$$G = \sum_i x_i \mu_i$$

où : G est l'énergie libre totale de Gibbs et μ_i est le potentiel chimique du constituant i .

Par différenciation de G , par rapport à la pression, on obtient le volume molaire de la solution :

$$v_l = \frac{\partial G}{\partial P} = \sum_i x_i \frac{\partial \mu_i}{\partial P}$$

où le terme $\frac{\partial \mu_i}{\partial P}$ représente le volume molaire partiel du constituant i , qu'on peut également écrire sous la forme suivante :

$$v_{i,l} = \frac{\partial \mu_i}{\partial P} = v_i^o + \frac{RT}{\phi_i^L} \frac{\partial \phi_i^L}{\partial P}$$

où : v_i^o est le volume molaire du constituant à l'état pur et à l'état de référence, ϕ_i^L est son coefficient d'activité pris dans les conditions effectives de mélange. Le volume molaire total peut s'écrire, alors, comme suit :

$$v_l = \sum_i x_i v_{i,l} = \sum_i x_i v_i^o + RT \sum_i x_i \frac{\partial \ln \phi_i^L}{\partial P}$$

Etant donné que, d'une part, le coefficient d'activité varie très peu avec la pression et que, d'autre part, la concentration en acétaldéhyde est très faible, le volume molaire de la solution peut être assimilé à celui du solvant pur qui est l'eau, soit 18 l/kmole. Dans ce cas, l'erreur est de 0,1 % par rapport au volume molaire réel qui est de 17,96 l/kmole.

Concernant le milieu de culture complet, on peut, également, prendre le volume molaire de l'eau pure mais avec une erreur globale de 0,7 %.

II.4. Erreur relative maximale sur la constante d'équilibre :

Le calcul d'erreur est un outil qui permet de prédire la précision et le niveau de signification des résultats afin de déterminer la marge de confiance de ces derniers. Dans le cas de la constante d'équilibre, qui est un produit de différents termes, son erreur relative est la

somme des erreurs relatives de chacun des termes du produit :

$$\frac{\Delta m}{m} = \frac{\Delta \phi_L}{\phi_L} + \frac{\Delta(\Phi^{L^*}/\Phi^V)}{\Phi^{L^*}/\Phi^V} + \frac{\Delta v_1}{v_1} + \frac{\Delta \Pi^S}{\Pi^S}$$

$$\frac{\Delta m}{m} \text{ (en \%)} = 0,9 + 0,1 + 0,7 + 0,1 = 1,8 \%$$

Finalement, l'erreur relative maximale m peut être arrondie à 2 %. Ce résultat est tout à fait satisfaisant et permet de justifier les approximations proposées. Ainsi, la constante d'équilibre, considéré dans ces conditions, devient simplement fonction de la température. Le tableau 4 résume les valeurs de m pour les différentes températures étudiées. m est donné avec quatre chiffres significatifs conformément au calcul d'erreur.

II.5. Effet des électrolytes sur la constante d'équilibre dans le milieu de culture :

La présence d'électrolytes dans un système binaire tel que Eau - Acétaldéhyde, modifie l'équilibre par un effet de sels (salting-out). Afin de prédire cet équilibre en solution électrolytique, Van Krevlen et Hoftijzer [23] ont proposé la corrélation suivante :

$$\log_{10} \left[\frac{m}{m_0} \right] = h I$$

où m_0 est la constante d'équilibre dans l'eau pure, I est la force ionique de la solution et h est un facteur de contribution des différentes espèces en solution.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2$$

$$h = h_+ + h_- + h_g$$

où : C_i est la concentration de l'ion i , Z_i est sa valence.

h_+ est la contribution des cations, h_- pour les anions et h_g pour les constituants volatils. Les contributions de différentes espèces d'ions et de molécules volatiles sont données dans la littérature [3].

Compte tenu de la composition du milieu de fermentation, utilisé dans ce travail, cette corrélation a permis d'obtenir le rapport m/m_0 égal à 1,31. Les valeurs de la constante d'équilibre pour le milieu de fermentation, en fonction de la température, sont reportés dans le tableau 4.

	Température, °C					
	20	25	30	35	40	45
<i>m</i> (eau)	0,0150	0,0170	0,0191	0,0215	0,0240	0,0267
<i>m</i> (milieu)	0,0197	0,0233	0,0250	0,0282	0,0314	0,0350

Tableau 4 : Constante d'équilibre de l'acétaldéhyde partagé entre l'eau, ou le milieu de fermentation, et l'air à différentes températures.

II.6. Calcul d'erreur sur le coefficient global de transfert d'acétaldéhyde :

On montrera, dans la partie "Entraînement de l'acétaldéhyde par aération", que le coefficient de transfert de l'acétaldéhyde peut être calculé par l'expression suivante :

$$K = \frac{f}{m - \frac{f}{Q/V_1}}$$

où : *f* et *K* sont, respectivement, les coefficients d'entraînement et de transfert, h^{-1}
Q est le débit d'air injecté dans la phase liquide, l/h
V_l est le volume de la phase liquide, *l*
m est la constante d'équilibre, adimensionnelle

L'erreur relative sur la valeur de *K* peut être obtenue à partir d'un développement approprié à son expression :

$$\frac{\Delta K}{K} = \frac{\Delta f}{f} + \frac{\Delta(m - \frac{f}{Q/V_1})}{m - \frac{f}{Q/V_1}}$$

Par développement du deuxième terme on obtient :

$$\Delta(m - \frac{f}{Q/V_1}) = \Delta m + \frac{f}{Q/V_1} (\frac{\Delta f}{f} + \frac{\Delta Q}{Q} + \frac{\Delta V_1}{V_1})$$

L'expression finale de l'erreur relative sur *K* est la suivante :

$$\frac{\Delta K}{K} = \frac{\Delta f}{f} + \frac{1}{m - \frac{f}{Q/V_1}} [\Delta m + \frac{f}{Q/V_1} (\frac{\Delta f}{f} + \frac{\Delta Q}{Q} + \frac{\Delta V_1}{V_1})]$$

Dans le cadre des expériences réalisées pour la détermination du coefficient de transfert de l'acétaldéhyde, l'ensemble des résultats a permis de définir l'encadrement suivant :

$$2 \leq m \frac{f}{Q/V_1} \leq 5$$

L'étude des deux cas limites $m/\frac{f}{Q/V_1} = 2$ et $m/\frac{f}{Q/V_1} = 5$ conduit, respectivement, aux expressions suivantes de l'erreur relative :

$$\frac{\Delta K}{K} = 2 \frac{\Delta m}{m} + 2 \frac{\Delta f}{f} + \frac{\Delta Q}{Q} + \frac{\Delta V_1}{V_1}$$

$$\frac{\Delta K}{K} = \frac{5}{4} \frac{\Delta m}{m} + \frac{5}{4} \frac{\Delta f}{f} + \frac{1}{4} \frac{\Delta Q}{Q} + \frac{1}{4} \frac{\Delta V_1}{V_1}$$

En remplaçant les différentes erreurs relatives élémentaires par leurs valeurs ($\frac{\Delta m}{m} = 2\%$, $\frac{\Delta f}{f} = 0,1\%$, $\frac{\Delta Q}{Q} = 0,1\%$ et $\frac{\Delta V_1}{V_1} = 0,1\%$) pour chacun des cas limites, l'erreur relative sur K est de 4,4 % pour $m/\frac{f}{Q/V_1} = 2$, et de 2,7 % pour $m/\frac{f}{Q/V_1} = 5$.

On retiendra, ainsi, une erreur maximale de 5% sur les valeurs calculées de K. L'analyse des valeurs de la constante de transfert, en considérant une erreur relative de 5%, suggère que ces valeurs soient représentées avec un seul chiffre significatif après la virgule.

III. CONCLUSION :

Dans cette partie, l'objectif était de calculer la constante d'équilibre de l'acétaldéhyde se trouvant partagé entre une phase liquide aqueuse (l'eau pure ou milieu de culture) et une phase vapeur constituée d'air. Cette constante d'équilibre est un paramètre essentiel pour le calcul de la cinétique de transfert de l'acétaldéhyde par entraînement.

En effet, grâce à un développement fondamental et rigoureux, basé sur des lois et concepts thermodynamiques, cet objectif a été atteint. Les effets des constituants électrolytiques présents dans le milieu de fermentation a été, également, pris en compte.

Enfin, les résultats obtenus ont été soumis à une analyse d'erreur, d'une part, dans le but d'apprécier la part d'incertitude sur ces résultats, et d'autre part, pour établir l'incidence de l'effet cumulé des erreurs propagées sur le calcul du coefficient de transfert. On retiendra de ce travail les valeurs de la constante d'équilibre et l'erreur sur le coefficient de transfert, de 5%, nécessaires au développement de la partie suivante, consacrée à la modélisation du transfert de l'acétaldéhyde.

Entraînement de l'acétaldéhyde par aération : Cinétique et Modélisation.

RESUME :

L'acétaldéhyde est une molécule intervenant dans des réactions métaboliques clés et pouvant être excrétée par les cellules vivantes. Sa grande volatilité favorise son transfert de la phase liquide vers la phase gazeuse dans le cas de procédés aérés. L'emploi d'un "capteur à membrane" a permis d'étudier précisément la cinétique de transfert : d'abord, dans le cas du système acétaldéhyde en solution dans l'eau puis, avec le système acétaldéhyde-milieu de culture de levures. L'influence, sur le transfert, de différents paramètres opératoires tels la température, le débit d'aération, le volume de liquide et la vitesse d'agitation a été quantifiée. Les mesures expérimentales ont permis de définir un coefficient d'entraînement, f , auquel est associé un coefficient global de transfert d'acétaldéhyde, K , obtenu à partir de bilans de matière. Un modèle relativement simple rendant compte de l'influence des divers paramètres opératoires a été établi pour représenter la cinétique d'entraînement de l'acétaldéhyde à la vapeur, dans le cas des deux systèmes. Ce modèle présente une très bonne aptitude de simulation des phénomènes observés. Il a été validé dans des conditions opératoires variées.

INTRODUCTION :

Les "capteurs à molécules volatiles" [9,20] sont nés de la nécessité de disposer de systèmes de mesure pour le contrôle en ligne de bioprocédés au cours desquels les cellules produisent ou consomment des composés volatils [4,12,19] : éthanol, acétaldéhyde, cétones et alcools supérieurs. Ces capteurs ont l'avantage de mesurer de faibles concentrations avec une période d'échantillonnage de l'ordre de 3 à 10 mn, permettant ainsi un suivi précis et efficace du procédé [6,7]. Par ailleurs, l'utilisation de ces capteurs a ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude de la cinétique et du métabolisme cellulaires relatifs à ces molécules [4,9].

Cependant, si cet outil permet la mesure de la concentration "in situ" d'un composé volatil en solution, l'interprétation cinétique et biologique nécessite de connaître la totalité des quantités produites ou consommées et d'intégrer, par conséquent, la fraction de molécules entraînées hors du réacteur. L'aération, voire la simple production du CO_2 dans le cas des bioprocédés anaérobies, conduit à un entraînement partiel des composés volatils dans les effluents gazeux. Afin d'effectuer des bilans métaboliques de matière sur les produits volatils qui soient corrects, il est nécessaire de prendre en compte les pertes dues à l'entraînement à la

vapeur, d'où le besoin d'étudier et de modéliser ce phénomène. Parmi ces composés volatils, l'acétaldéhyde est un intermédiaire métabolique particulièrement important dans le monde cellulaire, qui peut s'accumuler ou disparaître du milieu de culture en fonction de l'état physiologique du micro-organisme.

Ce travail est consacré à l'étude de l'entraînement, par aération, de l'acétaldéhyde en solution aqueuse pure, cas de référence, et en milieu synthétique pour la culture de levure, cas d'application. L'objectif est de quantifier cet entraînement et de modéliser l'influence des principaux paramètres susceptibles d'évoluer au cours d'un bioprocédé, sur le transfert d'acétaldéhyde entre le milieu liquide et l'air. Dans ce travail, une étude systématique de l'influence du débit d'air, du volume liquide, de l'agitation et de la température est réalisée. La synthèse des résultats expérimentaux est présentée de manière simplifiée, en terme de coefficient d'entraînement, f , et de coefficient global de transfert d'acétaldéhyde, K .

I. MATERIEL ET METHODES :

Composition du milieu de culture : 10 g/l de glucose, 6 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/l de KH_2PO_4 , 1,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l de NaCl , 0,1 g/l de CaCl_2 , 0,03 g/l de citrate de fer, 0,05 g/l de m-Inositol, 0,01 g/l d'acide nicotinique et de 3 g/l d'extrait de levure. Ce milieu est complété par des traces de vitamines et d'oligo-éléments [4,9].

Les expériences ont été réalisées à différents débits d'air, volumes de liquide, agitations et températures. La concentration initiale en acétaldéhyde est de 1 g/l, soit une fraction molaire dans la phase liquide de $4 \cdot 10^{-4}$. Le choix de cette valeur permet de travailler dans la gamme de concentrations rencontrées au cours des procédés de fermentation alcoolique. Le réacteur utilisé est un CHEMAP de 20 l de capacité maximale, équipé d'une turbine d'agitation "EFFIGAS" (0 à 800 tr/mn) et d'une régulation de température ($\pm 0,2$ °C). La pression dans le réacteur est maintenue égale à la pression atmosphérique (754 à 763 mm Hg). Les concentrations d'acétaldéhyde sont mesurées toutes les 10 mn grâce à un capteur à membrane hydrophobe plane en Poly-Tétra-Fluoro-Ethylène [4,9].

II. BILAN DE MATIERE ET EXPRESSION DE f ET DE K :

Le réacteur, supposé parfaitement agité, est schématisé dans la figure 1. Q est le débit d'air, en l/h, injecté dans la phase liquide de volume V_l , en l, et supposé identique en sortie du réacteur. Le volume de la phase gaz, V_g , représente la différence entre le volume total du réacteur, 20 l, et le volume de la phase liquide V_l . C_l et C_g , en g/l, sont les concentrations d'acétaldéhyde, respectivement, dans les phases liquide et gaz du réacteur.

En considérant une vitesse de transfert d'acétaldéhyde entre le liquide et le gaz

d'aération, les bilans de matière sont réalisés, séparément, sur les deux phases du réacteur. Ceci conduit aux expressions suivantes :

i) Dans la phase liquide :

$$\frac{d(C_l V_l)}{dt} = - V_l K (C_g^* - C_g) - J_s \quad (1)$$

ii) Dans la phase gaz :

$$\frac{d(C_g V_g)}{dt} = V_l K (C_g^* - C_g) - Q C_g \quad (2)$$

Où : J_s est le flux d'acétaldéhyde traversant la membrane du capteur, en g/h.

C_g^* est la concentration d'acétaldéhyde dans la phase gaz en équilibre avec C_l à température et à pression données : $C_g^* = m C_l$, m étant la constante d'équilibre.

K est le coefficient global de transfert, en h^{-1} .

Q , débits volumiques gazeux à l'entrée et à la sortie du réacteur supposés égaux, en l/h.

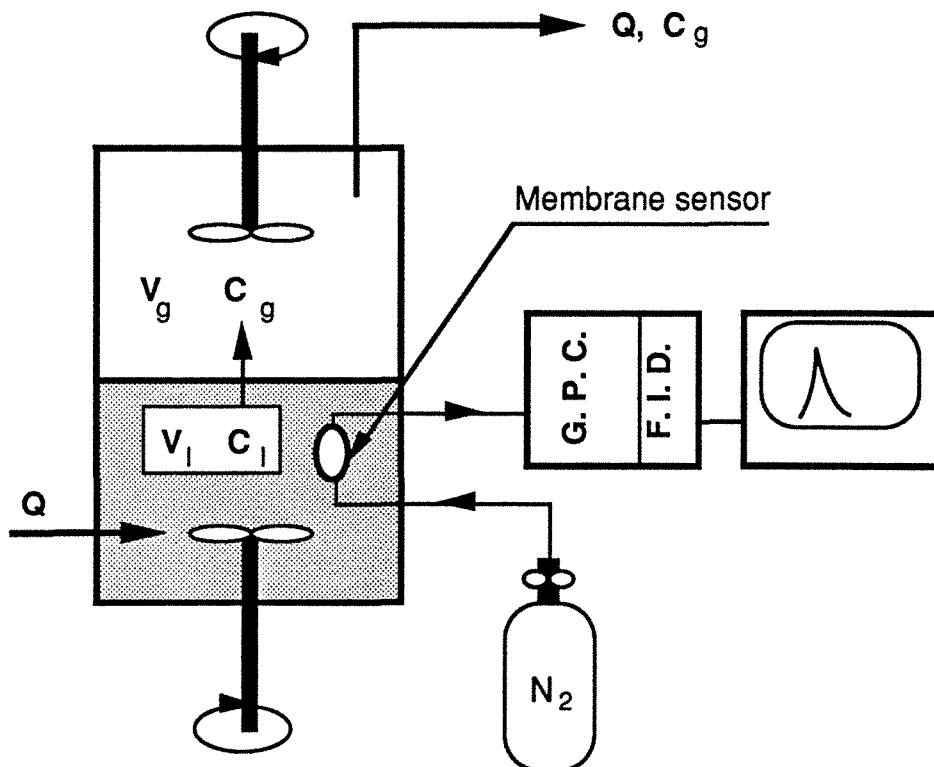


Figure 1 : Schéma du dispositif expérimental et définition des variables.

Des expériences préliminaires, réalisées en absence d'aération, ont montré que les pertes, J_s , dues au capteur sont négligeables (figure 2). De même, on négligera la variation de la quantité d'acétaldéhyde dans la phase gaz qui est très faible sur des intervalles de temps relativement petits (10 mn). On obtient, ainsi, l'égalité suivante :

$$V_1 K (C_g^* - C_g) = Q C_g \quad (3)$$

En remplaçant C_g^* par $m C_l$, l'équation (3) conduit à l'expression de C_g :

$$C_g = \frac{m K V_1}{K V_1 + Q} C_l \quad (4)$$

L'équation (1) est réarrangée en tenant compte de (4). A volume constant, la variation de la concentration d'acétaldéhyde dans la phase liquide est donnée par l'expression suivante :

$$\frac{dC_l}{dt} = - Q/V_1 \frac{m K}{K + Q/V_1} C_l \quad (5)$$

On pose " f ", le coefficient d'entraînement, égal à :

$$f = - \frac{d[\ln C_l]}{dt} = Q/V_1 \frac{m K}{K + Q/V_1} \quad (6)$$

Ainsi, dans des conditions expérimentales définies et selon l'expression (6), f serait constant et correspond à la pente du tracé du logarithme de la concentration C_l en fonction du temps. En effet, tous les tracés obtenus sont des droites (figure 3) et justifient, par conséquent et d'une manière globale, l'ensemble des hypothèses de travail proposées. Le coefficient f est déterminé expérimentalement et permet de calculer le coefficient de transfert global K :

$$K = \frac{f}{m - \frac{f}{Q/V_1}} \quad (7)$$

III. CALCUL DE LA CONSTANTE D'EQUILIBRE m :

Le calcul de K, équation (7), nécessite la connaissance de la valeur de m pour chaque expérience. La constante d'équilibre, non disponible directement dans la littérature, a pu être obtenue par des calculs appropriés [8]. Ces calculs ont une base thermodynamique qui repose sur l'égalité des potentiels chimiques de la phase liquide et de la phase gaz, du constituant en équilibre. Ce critère conduit à l'égalité des fugacités des deux phases. Ainsi, un modèle général de prédiction des équilibres a pu être formulé [10], valable aussi bien pour les solutions idéales que réelles. la constante d'équilibre est, alors, donnée par l'expression suivante :

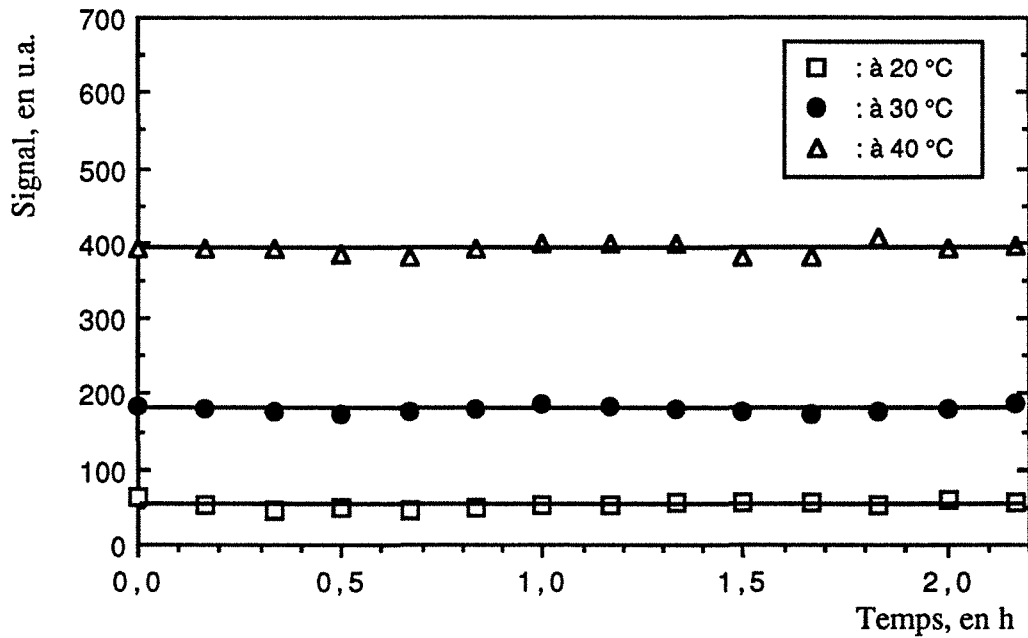


Figure 2 : Stabilité du signal détecté, en absence d'aération, à différentes températures. Cas du mélange milieu de fermentation-acétaldéhyde . Agitation : 300 tr/mn, volume de liquide : 12 l

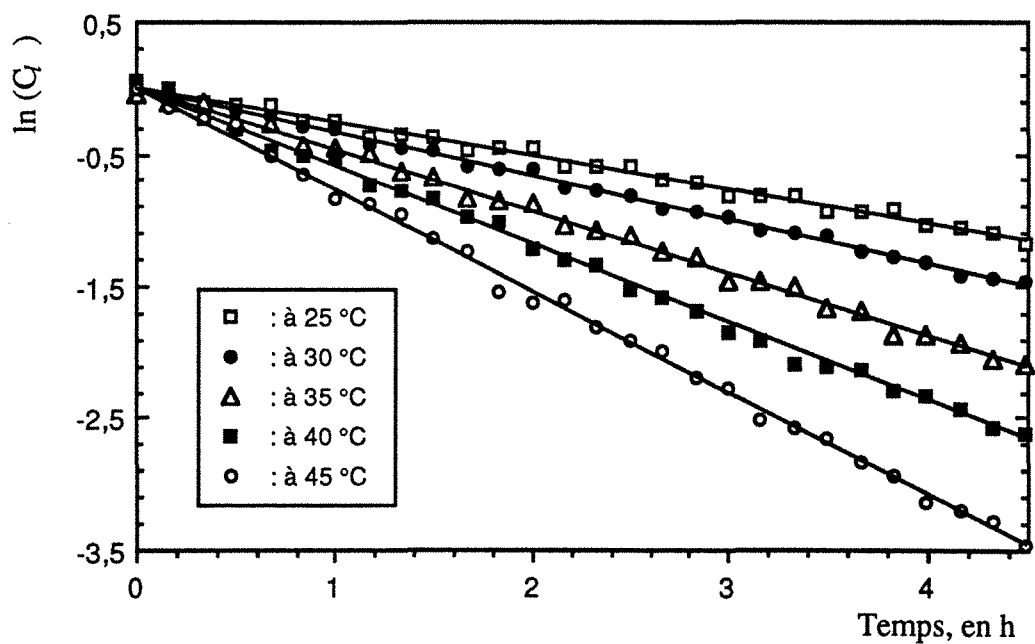


Figure 3 : Tracé des courbes $\ln(C_1)$ en fonction du temps, à différentes températures .

Cas du mélange eau - acétaldéhyde à différentes températures .

$Q = 720$ l/h, $V_1 = 12$ l, vitesse d'agitation = 500 tr/mn.

$$M = \frac{y}{x} = \frac{\phi^L \Phi^L}{P \Phi^V} \quad (8)$$

- où :
- ϕ^L est le coefficient d'activité de l'acétaldéhyde dans la phase liquide.
 - Φ^V est le coefficient de fugacité dans la phase vapeur.
 - Φ^L est la fugacité de référence dans la phase liquide.
 - P est la pression totale du système.
 - x et y sont les fractions molaires, respectivement, dans les phases liquide et gaz.

" m " peut être déduit de l'équation (8) en effectuant les substitutions suivantes :

$$\begin{cases} x = C_l \nu_l \\ y = C_g \frac{RT}{P} \end{cases}$$

D'où l'expression finale de m :

$$m = \frac{C_g}{C_l} = \phi^L \frac{\Phi^{L*}}{\Phi^V} \frac{\Pi^s}{RT} \nu_l \quad (9)$$

- où :
- ν_l est le volume molaire global de la phase liquide.
 - Φ^{L*} est le rapport Φ^L/Π^s
 - R est la constante des gaz parfaits.
 - T est la température absolue.

A partir de différentes données bibliographiques [2,3,5,13,18] et de méthodes de prédiction des équilibres liquide-gaz [10,11,14,15], l'ensemble des valeurs de m, calculées [8] à différentes températures rencontrées dans ce travail, est reporté dans le tableau 1.

	20 °C	25°C	30°C	35 °C	40 °C	45°C
<i>m_{eau}</i>	0,0150	0,0170	0,0191	0,0215	0,0240	0,0267
<i>m_{milieu}</i>	0,0197	0,0223	0,0250	0,0282	0,0314	0,0350

*Tableau 1 : Valeurs de la constante d'équilibre, m, à différentes températures :
m_{eau} : pour "eau - acétaldéhyde, M_{milieu} : pour " milieu de culture - acétaldéhyde"*

IV. RESULTATS ET DISCUSSION :

Ce travail est présenté en deux parties, système "eau-acétaldéhyde" et système "milieu de culture-acétaldéhyde". Les résultats expérimentaux sont résumés dans des tableaux donnant la valeur de f en fonction du facteur étudié. Ensuite, K est calculé et représenté graphiquement, selon la corrélation proposée, en fonction du facteur étudié. Dans tout ce travail, le nombre N désignera une valeur réduite de la vitesse d'agitation définie comme suit :

$$N = \frac{n}{1000}$$

où : n est la vitesse d'agitation, en tr/mn
1000 est un facteur réducteur, choisi par commodité:

IV.1 SYSTEME "EAU-ACETALDEHYDE :

IV.1.1 Influence de l'agitation :

Dans les conditions suivantes : $V_1 = 12$ l, $Q = 720$ l/h et $T = 30$ °C, l'agitation du réacteur a été fixée à différentes valeurs : 300, 400, 500, 600 et 700 tr/mn. Selon le tableau 2, f augmente avec la vitesse d'agitation.

N	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
f, en h ⁻¹	0,2988	0,3041	0,3324	0,3570	0,4326

Tableau 2 : Valeurs de f en fonction de la vitesse d'agitation réduite, N , obtenues avec le système "eau-acétaldéhyde". $V_1 = 12$ l, $Q = 720$ l/h, $T = 30$ °C.

Le coefficient de transfert, K , a été calculé à partir de l'équation (7), en prenant m égale à m_{eau} . Ce coefficient est représenté dans la figure 4 selon une corrélation du type :

$$K = A (B + N^\alpha) \quad (10)$$

où : $\alpha = 5,2$
 $A = 96,69$ (dépend de V_1 , de Q et de la température)
 $B = 0,218$

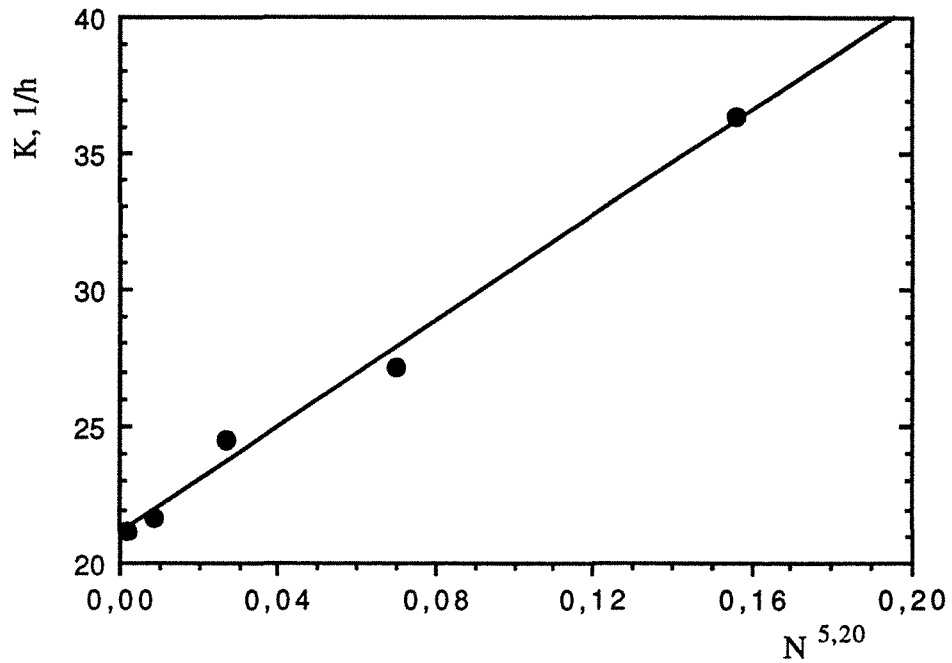


Figure 4 : Influence de l'agitation sur le coefficient de transfert, K , dans le cas du système eau - acétaldéhyde : $N = \text{Agitation (tr/mn)} \cdot 10^{-3}$, $Q = 720 \text{ l/h}$, $V_l = 12 \text{ l}$, $T = 30^\circ\text{C}$.

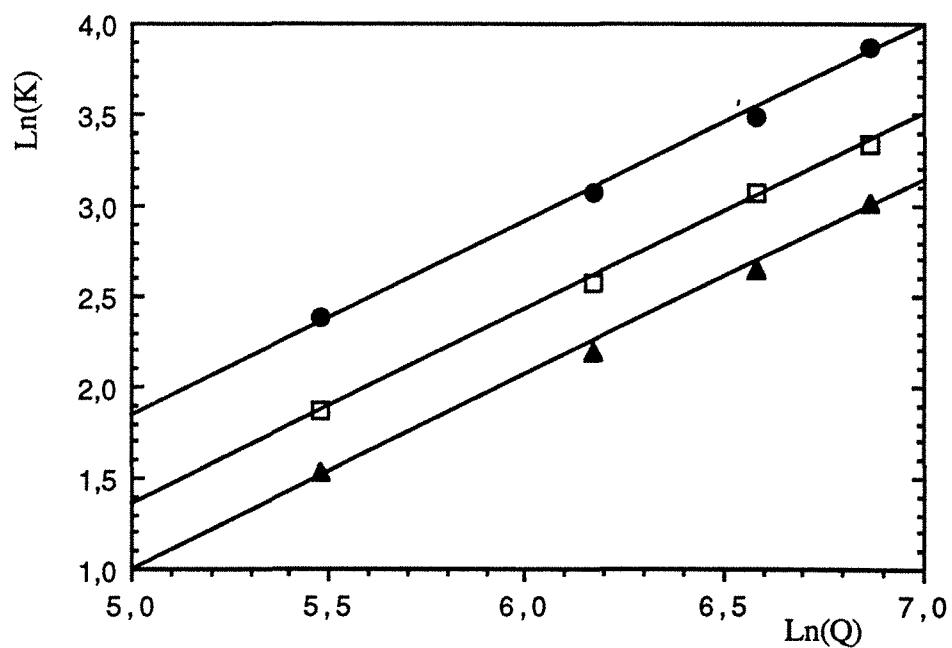


Figure 5 : Influence de l'aération, pour différents volumes de liquide, sur le coefficient de transfert, K . Cas du système eau - acétaldéhyde : Agitation 300 tr/mn, $T = 30^\circ\text{C}$.

(●) $V_l = 8 \text{ l}$, (□) $V_l = 12 \text{ l}$, (▲) $V_l = 16 \text{ l}$.

Ce résultat montre que l'agitation stimule le transfert selon un effet de puissance, α , approprié. Il est connu [1,16,17] que l'agitation améliore les vitesses de transferts par augmentation des aires d'échange entre les phases gaz et liquide. En absence d'effet mécanique, l'agitation s'effectue par simple brassage et barbotage du gaz dans le liquide. Ce phénomène est pris en compte dans la constante B.

IV.1.2 Influence du débit gazeux et du volume liquide :

Plusieurs séries d'expériences ont été réalisées à une température de 30 °C et à une agitation de 300 tr/mn (soit $N=0,3$). La valeur de f a été déterminée pour chaque couple de facteurs (V_1, Q) en faisant varier le débit d'air, Q , et le volume de liquide, V_1 . Ce facteur f décroît avec le volume V_1 , alors qu'il augmente avec le débit d'air Q (tableau 3).

Volume, en l	Débit d'air, en l/h			
	240	480	720	960
8	0,1642	0,3031	0,4578	0,6506
12	0,0935	0,1900	0,3041	0,3981
16	0,0667	0,1309	0,2051	0,2893

*Tableau 3 : Influence du débit d'air et du volume de liquide sur le coefficient d'entraînement, f (h^{-1}). Cas du système "eau-acétaldéhyde".
 $n = 300$ tr/mn, température = 30 °C.*

La valeur du coefficient K a été déterminée pour chaque valeur du couple (V_1, Q). Les tracés de $\ln(K)$ en fonction de $\ln(Q)$, à volume constant (figure 5), et de $\ln(K)$ en fonction de $\ln(V_1)$, à débit constant (figure 6), montrent que K peut s'écrire sous la forme (11).

$$K = k Q^\beta V_1^\gamma \quad (11)$$

où : $\beta = 1,07$
 $\gamma = -1,24$
 $k = 0,4064$ (constante dépendant de la température et de l'agitation)

On retrouve, là encore, des influences connues [1,16,17], concernant l'effet stimulateur du débit gazeux et d'inertie due au volume liquide, sur le coefficient de transfert K .

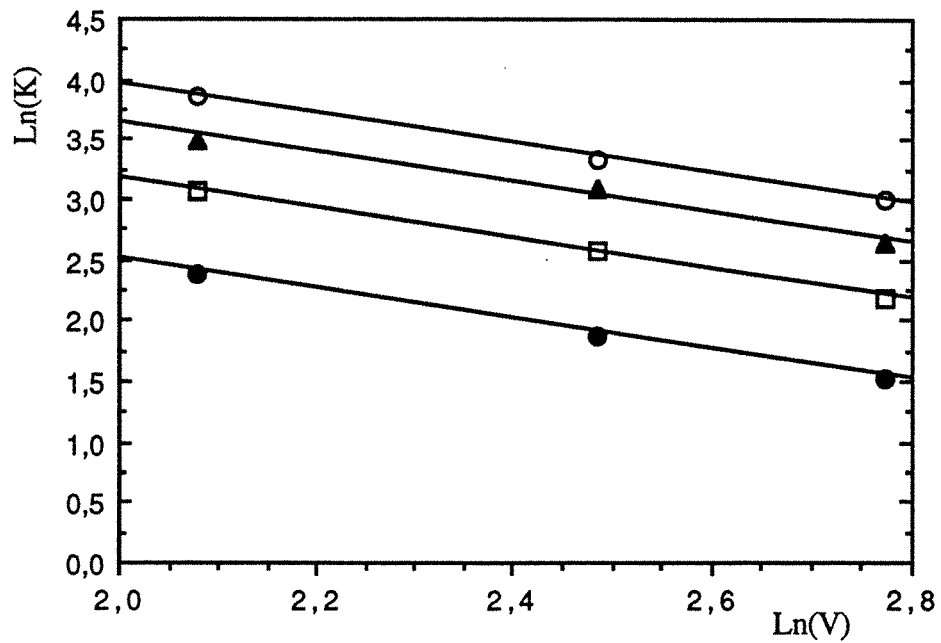


Figure 6 : Influence du volume, à différentes aérations, sur le coefficient de transfert. Cas du système eau - acétaldéhyde à 300 tr/mn et à 30°C. (\bullet) $Q = 240$ l/h, (\square) $Q = 480$ l/h, (\blacktriangle) $Q = 720$ l/h, (\circ) $Q = 960$ l/h.

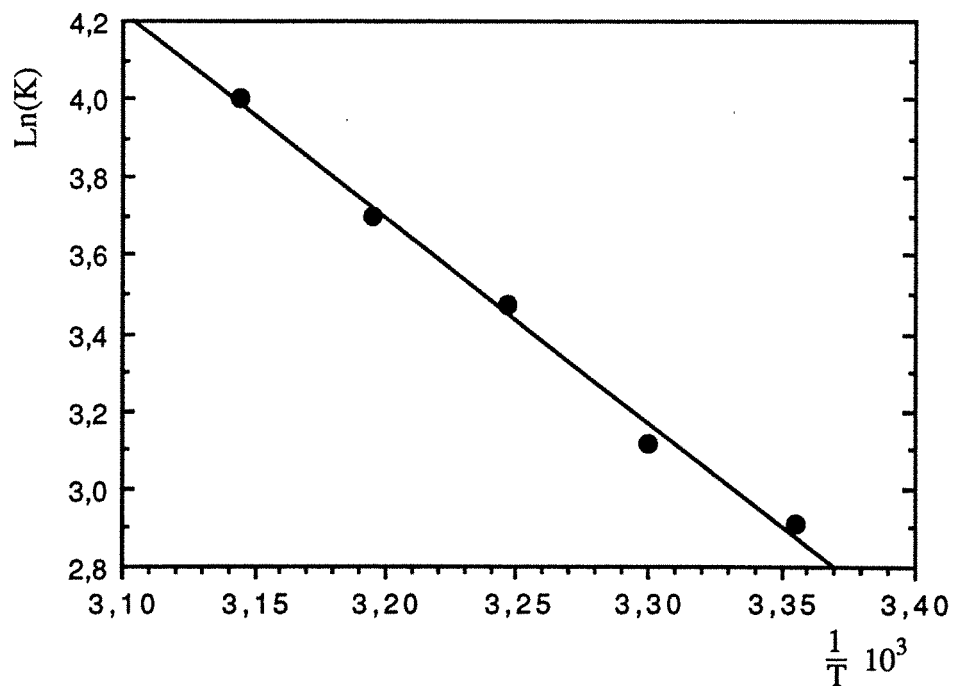


Figure 7 : Influence de la température sur le coefficient de transfert. Cas du mélange eau - acétaldéhyde : $Q = 720$ l/h, $V_1 = 12$ l, vitesse d'agitation = 500 tr/mn.

IV.1.3 Influence de la température :

Le coefficient d'entraînement, f , dépend de la température selon la variation de la constante d'équilibre, m , et du coefficient de transfert, K . Ce dernier dépend implicitement des propriétés rhéologiques du système, notamment de la viscosité et du coefficient de diffusion qui sont, eux-mêmes, fonction de la température.

Dans le cas de la constante d'équilibre, l'effet de la température a été pris en compte dans l'expression globale (11) et résumé dans le tableau 1. Concernant l'effet de la température sur K , il n'y a pas de règle générale car les phénomènes sont beaucoup plus complexes. Néanmoins, des corrélations empiriques peuvent être utilisées dans ce cas afin de prédire la valeur du coefficient de transfert dans le domaine de température étudié. De simples extrapolations devront, donc, être évitées.

Des expériences d'entraînement ont été effectuées à différentes températures alors que l'agitation, le débit d'air et le volume ont été fixés, respectivement, à 500 tr/mn, 720 l/h et 12 l. Le coefficient f augmente, normalement, avec la température comme le montre le tableau 4.

Température, °C	25	30	35	40	45
f, h^{-1}	0,2382	0,3132	0,4501	0,5791	0,7644

*Tableau 4 : Evolution du coefficient d'entraînement en fonction de la température.
Cas du système "eau-acétaldéhyde". $Q = 720$ l/h, $V_l = 12$ l, $n = 500$ tr/mn.*

Les valeurs de K ont été déterminées à partir des données fournies dans le tableau 4. Plusieurs types de fonctions polynomiales ont été testées afin de corrélérer le coefficient de transfert à la température. La représentation du logarithme népérien de K en fonction de l'inverse de la température absolue a donné le meilleur degré de corrélation comme l'illustre la figure 7. L'effet de la température sur K peut être représenté par l'équation suivante :

$$\ln(K) = \ln(k) - \lambda/T \quad (12)$$

où : $\lambda = 5255,4$ et $\ln(k) = 20,511$.

Dans le cas du mélange liquide "eau - acétaldéhyde", la constante de transfert, K , de l'acétaldéhyde vers l'air est fonction des effets cumulés de l'agitation, de l'aération, du volume et de la température. Sa valeur pourra être calculée à partir de l'équation globale suivante :

$$K = 63.10^6 \exp\left[-\frac{5255,4}{T}\right] Q^{1,07} V_l^{-1,24} (0,218 + N^{5,20}) \quad (13)$$

Cette corrélation (13) est propre à la géométrie du réacteur, mais aussi au système "eau-acétaldéhyde" étudié. La modification de la composition de la phase liquide peut conduire à la

variation du transfert liquide-gaz de l'acétaldéhyde. D'ailleurs, les premiers effets de la composition de la phase liquide se manifestent sur la constante d'équilibre (Tableau 1). Il est donc important de quantifier ce transfert quand l'acétaldéhyde est en solution dans le milieu de travail afin d'effectuer des bilans de matière réels et précis, notamment dans le cas d'un bioprocédé. De ce fait, l'étude du transfert de l'acétaldéhyde en milieu de culture a été réalisée. Les résultats sont présentés dans la partie qui suit.

IV.2 SYSTEME " MILIEU DE CULTURE - ACETALDEHYDE" :

Plusieurs expériences d'entraînement d'acétaldéhyde, en milieu de fermentation, ont été effectuées en faisant varier le débit d'air, le volume liquide, la vitesse d'agitation et la température. Les tableaux 5 et 6 rassemblent les valeurs du coefficient d'entraînement, f , en fonction de conditions expérimentales variables. L'influence du volume liquide a été vérifiée par une expérience supplémentaire réalisée à 30 °C, avec un débit d'air de 720 l/h, une agitation de 400 tr/mn et enfin un volume liquide de milieu de culture de 12 l. Dans ce cas, la valeur de f obtenue est 0,3698 h⁻¹.

Le coefficient de transfert, K , est calculé à partir de l'équation (7) où la constante d'équilibre, m , est donnée par le tableau 1 en fonction de la température ($m = m_{milieu}$).

	Q = 600 l/h		Q = 1200 l/h	
	300 tr/mn	600 tr/mn	300 tr/mn	600 tr/mn
20 °C	0,2361	0,2715	0,3852	0,4427
30 °C	0,3659	0,4311	0,6842	0,8073
40 °C	0,7083	0,7315	1,1977	1,3795

Tableau 5 : Influence du débit d'air, de l'agitation et de la température sur f , en h⁻¹, en milieu de culture, $V_l = 10$ l.

Débit d'air en l/h	Agitation en tr/mn			
	300	400	500	600
240	0,1006	0,1019	0,1071	0,1158
480	0,1818	0,1832	0,1917	0,2078
720	0,2552	0,2581	0,2698	0,2937
960	0,3235	0,3281	0,3447	0,3736
1200	0,3900	0,3947	0,4147	0,4517

Tableau 6 : Influence du débit d'air et de l'agitation sur f , en h⁻¹, en milieu de culture, $V_l = 16$ l, $T = 30$ °C.

IV.2.1 Influence du débit d'air :

L'exploitation des résultats du tableau 6 permet d'estimer la valeur de la puissance β affectée au débit Q . En effet, travaillant à volume et température constants, le coefficient de transfert, K , est donné par l'expression suivante :

$$K = k(N) Q^\beta \quad (14)$$

où : $k(N)$ est une constante qui dépend de l'agitation .

β est la puissance affectant le débit, paramètre à estimer.

La linéarisation de cette dernière expression, (14), pour une agitation N , conduit à :

$$\ln (K) = \ln (k(N)) + \beta \ln (Q) \quad (15)$$

Afin de tenir compte de l'intégralité des données expérimentales, l'effet des quatre agitations (300, 400, 500 et 600 tr/mn) peut être cumulé selon l'expression suivante :

$$\sum_{i=1}^{n=4} \ln (K_i) = \sum_{i=1}^{n=4} \ln (k(N_i)) + 4\beta \ln (Q) \quad (16)$$

La figure 8 représente les valeurs de l'équation (16) en fonction de $\ln (Q)$. On en déduit la valeur de β : 0,78. Ce même raisonnement a été appliqué aux résultats du tableau 5, β vaut alors 0,76. La moyenne de ces deux valeurs de β a été retenue : $\beta = 0,77$.

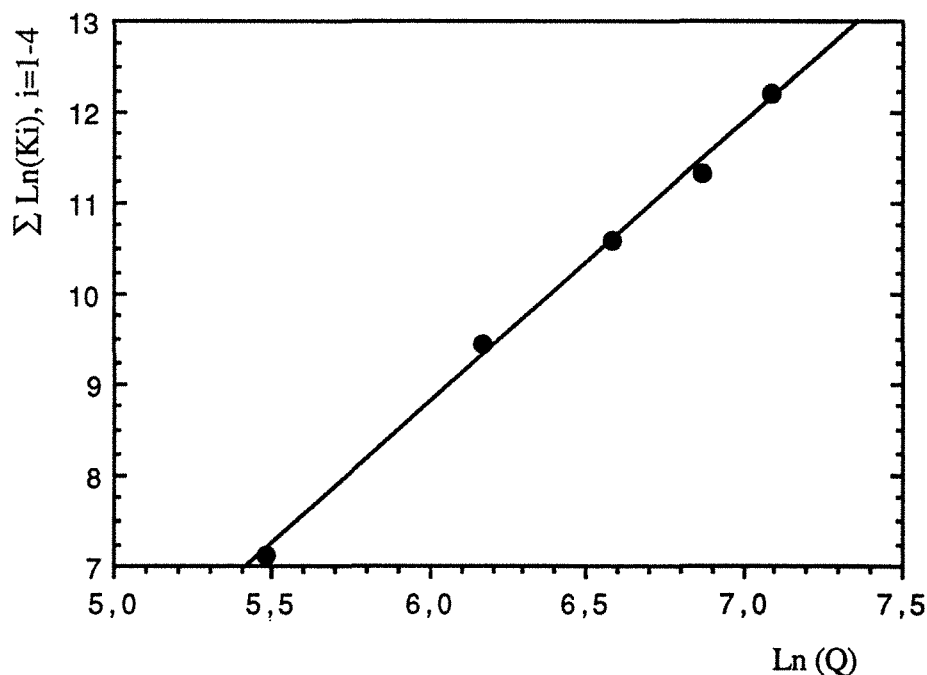


Figure 8 : Influence du débit d'air sur le coefficient de transfert de l'acétaldéhyde en milieu de fermentation : $V_l = 16$ l, $T = 30^\circ\text{C}$.

IV.2.2 Influence de l'agitation :

L'influence de l'agitation sur le transfert a été montrée dans le tableau 6 et vérifiée sur les résultats du tableau 5. A volume et température constants, l'effet du débit d'air est pris en compte sous la forme $Q^{0,77}$, comme il vient d'être établi. Le coefficient de transfert, K, est alors donné par l'expression suivante :

$$K = A (B + N^\alpha) Q^{0,77} \quad (17)$$

Cette équation est transformée de manière à ne tenir compte que de l'agitation :

$$\frac{K}{Q^{0,77}} = A (B + N^\alpha) \quad (18)$$

où : $\alpha = 5,2$ et $B = 0,323$. A dépend du volume liquide et de la température.

Les valeurs de α et de B sont obtenues par la méthode des moindres carrés associée à une résolution d'équations non-linéaires par la méthode de Newton-Raphson. Ainsi, selon l'équation (18), on a pu représenter l'évolution de $K / Q^{0,77}$ en fonction de $N^{5,2}$ et obtenir une bonne linéarisation (figure 9).

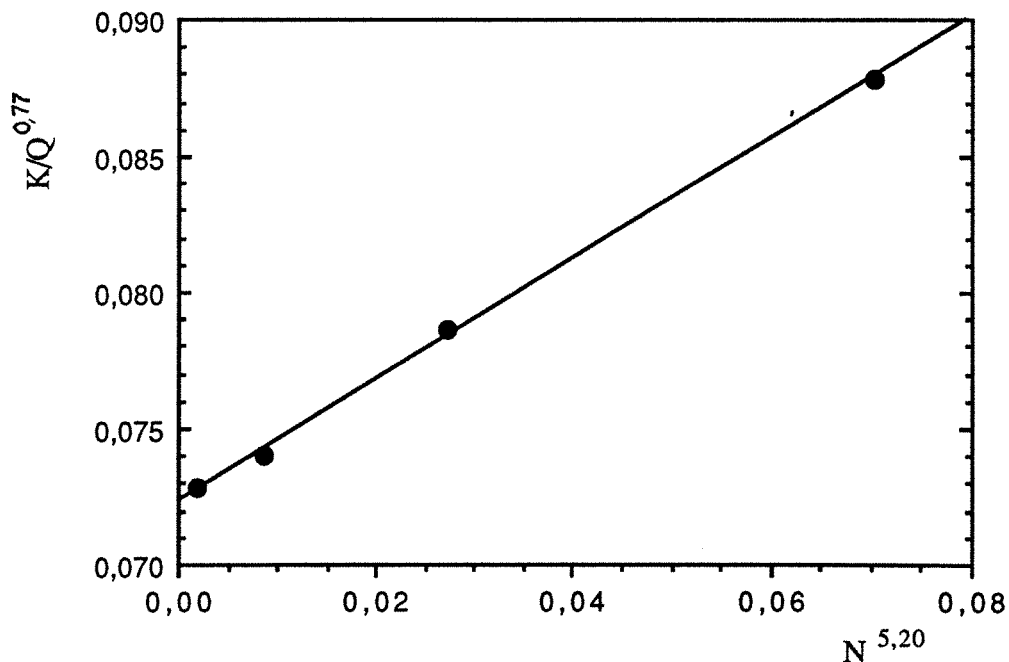


Figure 9 : Influence de l'agitation sur le coefficient de transfert de l'acétaldéhyde en milieu de fermentation. $N = \text{Agitation (tr/mn)} \cdot 10^{-3}$, $T = 30^\circ\text{C}$, $V_l = 16 \text{ l}$

IV.2.3 Influence du volume liquide :

Après avoir modélisé les effets de l'agitation et du débit d'air, l'influence du volume a été étudiée. A température constante, le coefficient de transfert, K, est déterminé par l'expression suivante :

$$K = k Q^{0,77} (0,323 + N^{5,2}) V_1^\gamma$$

On pose :

$$\bar{K} = \frac{K}{Q^{0,77} (0,323 + N^{5,2})} = k V_1^\gamma \quad (19)$$

Volume, en l	10	12	16
\bar{K}	0,4650		0,2549
	0,4764	0,3729	0,2487
	0,4715		0,2576

Tableau 7 : Influence du volume sur le transfert (\bar{K}) en milieu de culture.

\bar{K} , selon cette définition, est indépendant de l'agitation et de l'aération. γ caractérise l'effet propre au volume, alors que k ne dépend que de la température. Les valeurs de \bar{K} , à la température de 30 °C, sont résumées dans le tableau 7.

La linéarisation logarithmique de l'équation (19) permet d'estimer la valeur de γ :

$$\ln(\bar{K}) = \ln(k) + \gamma \ln(V_1) \quad (20)$$

La représentation graphique de cette équation (20), est donnée par la figure 10. La valeur estimée de γ est de -1,32.

Enfin, à une température donnée, le coefficient de transfert, K, de l'acétaldéhyde du milieu de fermentation vers les bulles d'air est défini selon :

$$K = k Q^{0,77} V_1^{-1,32} (0,323 + N^{5,2}) \quad (21)$$

IV.2.4 Influence de la température :

L'influence de la température a été analysée sur l'ensemble des expériences réalisées avec le mélange " milieu de culture-acétaldéhyde". L'effet de la température est déterminé par

l'évolution de la constante k de l'équation (21). La figure 11 représente $\ln(k)$ en fonction de l'inverse de la température absolue. Ce tracé, par analogie avec le système "eau-acétaldéhyde", est assimilé à une droite ayant l'expression suivante :

$$\ln(k) = 5,4 \cdot 10^6 - 4000,3 / T$$

Ainsi, tout comme dans le cas du système "eau-acétaldéhyde", il est possible de définir une relation globale, (22), de K en fonction des paramètres susceptibles de varier au cours d'un bioprocédé. A des degrés différents, les influences du débit d'air, de l'agitation, du volume de liquide et la température sont analogues, dans leurs expressions, à celles obtenues avec le mélange "eau-acétaldéhyde".

$$K = 5,4 \cdot 10^6 \exp\left[-\frac{4000,3}{T}\right] Q^{0,77} V_1^{-1,32} (0,323 + N^{5,20}) \quad (22)$$

La comparaison des valeurs des paramètres du modèle donnant le coefficient de transfert dans le cas de l'eau et dans le cas du milieu de culture, montre des différences, notamment, au niveau de l'influence de la température, des constantes B et des constantes en 10^6 . Cette observation peut être expliquée par la différence de la composition des phases liquides étudiées. La présence de sucre, de sels minéraux et d'autres éléments modifie la volatilité relative de l'acétaldéhyde et la rhéologie des interfaces d'échange gaz-liquide.

V. CONCLUSION :

Après une étude systématique de l'influence du débit d'air, de l'agitation, du volume de liquide et de la température sur l'entraînement de l'acétaldéhyde, on a pu aboutir à des relations similaires dans le cas d'un mélange "eau-acétaldéhyde" et d'un mélange "milieu de fermentation-acétaldéhyde". Les expressions finales (13) et (22), relatives aux deux systèmes, ont été utilisées pour calculer le coefficient de transfert, K . La confrontation des résultats théoriques à des données expérimentales obtenues dans différentes conditions opératoires, est montrée dans les figures 12 et 13. On peut remarquer que le modèle proposé représente les effets conjugués des différents paramètres étudiés d'une manière très satisfaisante.

La modélisation du coefficient de transfert de l'acétaldéhyde dans un milieu de fermentation représente un grand intérêt pour la détermination des vitesses réelles de production ou de consommation de cette molécule au cours d'un bioprocédé. Ceci doit aboutir à une meilleure connaissance et à un meilleur contrôle des réactions métaboliques mises en jeu par les cellules dans le cas d'un procédé aéré.

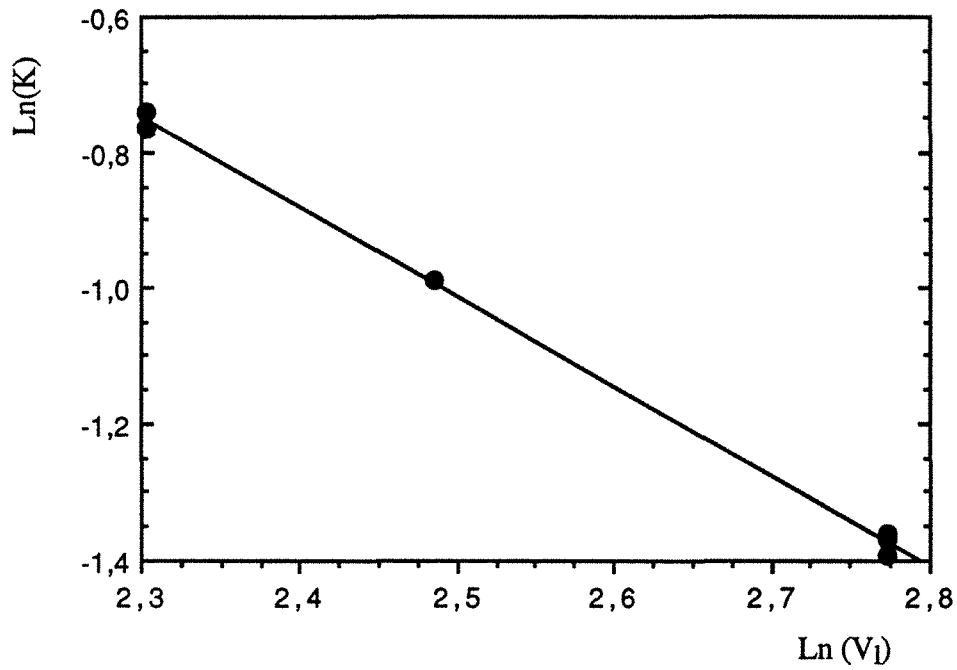


Figure 10 : Influence du volume liquide sur le coefficient de transfert de l'acétaldéhyde en milieu de fermentation . $T = 30^{\circ}\text{C}$, $\bar{K} = K / Q^{0,77} (0,323 + N^{5,20})$

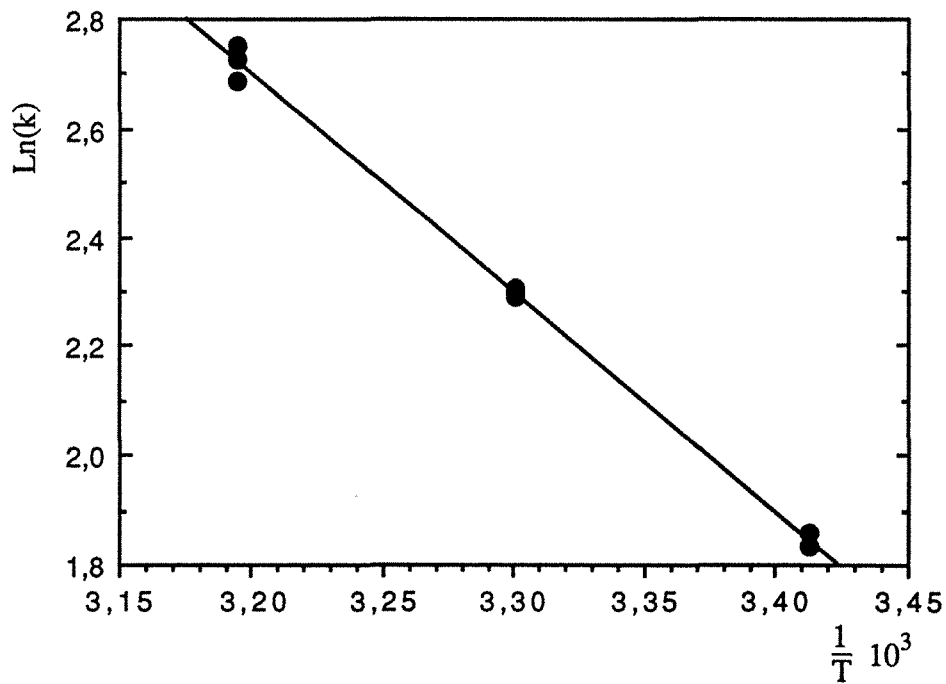


Figure 11 : Influence de la température sur le coefficient de transfert de l'acétaldéhyde en milieu de fermentation . $k = K / Q^{0,77} V_l^{-1,32} (0,323 + N^{5,20})$

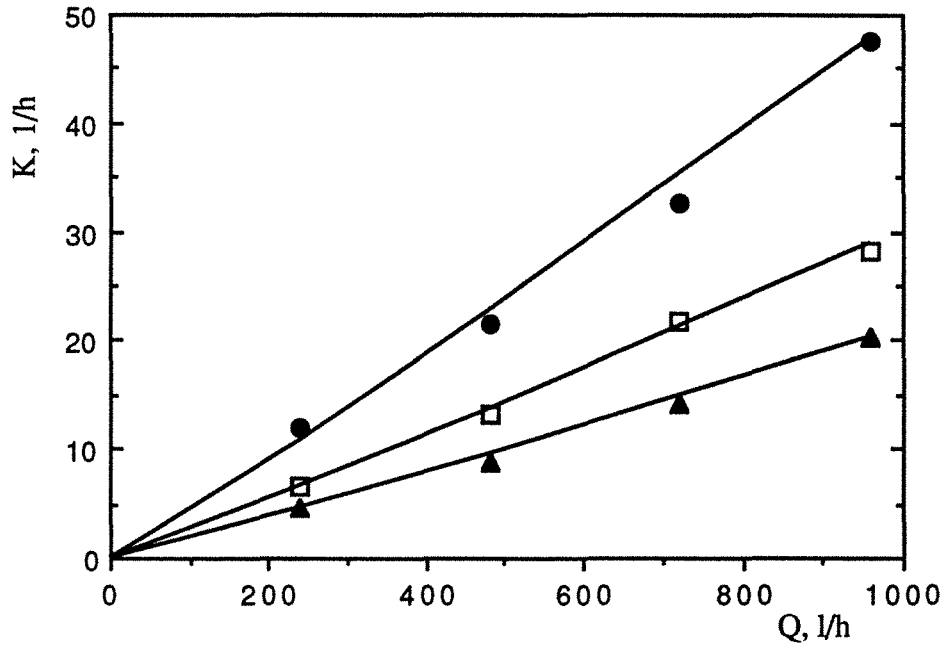


Figure 12 : Comparaison des valeurs expérimentales (symboles) et théoriques (traits) du coefficient de transfert, de l'acétaldéhyde dans l'eau, en fonction du débit à 300 tr/mn et à 30 °C. (●) $V_l = 8$ l, (□) $V_l = 12$ l, (▲) $V_l = 16$ l.

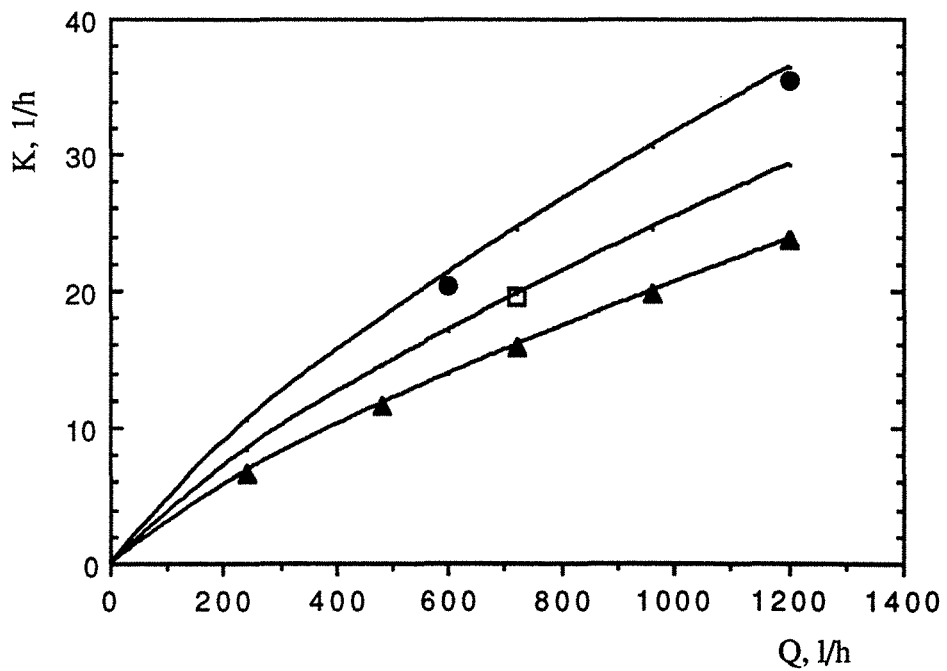


Figure 13 : Comparaison des valeurs expérimentales et théoriques du coefficient de transfert de l'acétaldéhyde, dans le milieu de fermentation à 30 °C, en fonction du débit d'air. (●) $V_l = 10$ l, $n = 300$ tr/mn; (□) $V_l = 12$ l, $n = 400$ tr/mn; (▲) $V_l = 16$ l, $n = 600$ tr/mn.

NOMENCLATURE :

A :	Constante associée au coefficient de transfert.
B :	Constante associée au coefficient de transfert, homogène à N^α .
C_g^* :	Concentration d'acétaldéhyde, dans la phase gaz, en équilibre avec C_l , g/l..
C_g :	Concentration d'acétaldéhyde dans la phase gaz, g/l.
C_l :	Concentration d'acétaldéhyde dans la phase liquide, g/l.
f :	Coefficient d'entraînement, h^{-1} .
J _s :	Flux d'acétaldéhyde traversant la membrane du capteur, g/h.
K :	Coefficient de transfert, h^{-1} .
\bar{K} :	Constante associée au coefficient de transfert, dépend du volume liquide.
k :	Constante associée au coefficient de transfert.
M :	Constante d'équilibre (rapport de fractions molaires).
m :	Constante d'équilibre (rapport de concentrations).
N :	Vitesse réduite d'agitation, $N = \frac{\text{Agitation (tr/mn)}}{1000}$.
P :	Pression totale du système, mm Hg.
Q :	Débit d'air, l/h.
R :	Constante des gaz parfaits.
T :	Température absolue, K.
V_l :	Volume de liquide, l.
x :	Fraction molaire d'acétaldéhyde dans la phase liquide.
y :	Fraction molaire d'acétaldéhyde dans la phase gaz.

Symboles :

α :	Puissance affectée à l'agitation.
β :	Puissance affectée au débit.
γ :	Puissance affectée au volume de liquide.
λ :	Constante associée à l'effet de la température.
v_l :	Volume molaire de la phase liquide, l/mole
φ^L :	Coefficient d'activité dans la phase liquide.
Φ^L :	Fugacité de référence dans la phase liquide, mm Hg.
Φ^{L*} :	Rapport Φ^L/Π^S .
Φ^V :	Coefficient de fugacité dans la phase gaz.
Π^S :	Pression de vapeur saturante d'acétaldéhyde, mm Hg.

REFERENCES :

- 1- Akita, K., Yoshida, F., "Bubble size interfacial area and liquid-phase mass transfer coefficient in bubble column", IEC. Proc. Des. Dev., 13 (1974) 84-91.
- 2- Coles, K. F., Popper, F., "Vapor-liquid equilibria : Ethylen oxid-Acetaldehyde and Ethylen oxid-Water systems", Ind. Eng. Chem., 42 (1950) 1434-1438.
- 3- Danckwerts, P. V., "Gas-liquid reactions", Mc Graw Hill Chemical Engineering Series, New York, (1970) 18-21.
- 4- Dantigny, Ph., Ninow, J. L., Marc, I., Engasser J.-M., "Representation of the changes in the metabolic pattern of Baker's yeast from the measurements of extracellular pyruvate, acetate, acetaldehyde and ethanol", Biotechnol. Lett., 11 (1989) 515-520.
- 5- Gmehling, J., Onken, U., Arlt, W., "Vapor-liquid equilibrium data collection : Aqueous-Organic systems", Dechema Chemistry Data Series., 1-*Supp 1a*-, (1981) 77-86.
- 6- Groboillot, A., Pons, M.-N., Engasser, J.-M., "Monitoring of volatils in alcoholic fermentation on molasses via a gas membrane sensor", Appl. Microbiol. Biotechnol., 3 (1989) 37-77.
- 7- Mandenius, C. F., Mattiasson, B., "Improved membrane gas sensor systems for on-line analysis of ethanol and other volatile organic compounds in fermentation media", Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18 (1983) 197-200.
- 8- Mosrati, R., " Nouvelle approche de la cinétique fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* et de la Conduite d'un procédé semi-continu : modélisation de la croissance basée sur le bilan énergétique de la levure, commande prédictive et floue", Thèse de l'I.N.P.L. - Nancy, France (1993).
- 9- Ninow, J. L., "Propriétés de capteurs à membrane PTFE pour la détection de produits volatils. Application au suivi en-ligne de procédés de fermentations", Thèse de l'I.N.P.L. - Nancy, France, (1989).
- 10- O' Connell, J. P., Prausnitz, J. M., "Empirical correlation of second virial coefficients for vapor-liquid equilibrium calculations", IEC Proc. Des. Dev., 6 (1967) 245-250.
- 11- Pitzer, K. S., Curl, R. F., "The volumetric and thermodynamic properties of fluids III: Empirical equation for the second virial coefficient", J. Am. Chem. Soc., 79 (1957) 2369-2370.
- 12- Ramos-Jeunehomme, C., De Keyser, L., Masschelein, C.-A., "Formation de substances aromatiques et cinétiques d'adsorption des acides aminés du moût", Proc. Eur. Brew. Conv., (1983) 505-520.
- 13- Reir, R. C., Prausnitz, J. M., Poling, B. E., "The properties of Gases and Liquids", Mc Graw Hill Chemical Engineering Series, New York, 4th ed., (1987) 676.
- 14- Renon, H., Asselineau, L., Cohen, G., Raimbault, C., "Calcul sur ordinateur des équilibres liquide-vapeur et liquide liquide", Publication de l'I.F.P., Technip, Paris (1971) 6-7.
- 15- Renon, H., Prausnitz, J. M., "Liquid-liquid and vapor-liquid equilibrium for binary and ternary systems with D-butyl Ketone, DimethylSulfoxide, n-Hexane, and 1-Hexene", IEC Proc. Des. Dev., 7 (1968) 220-225.

- 16- Sherwood, T. K., Holloway, F. A. L., "Performance of packed towers-liquid film data for several packings", Trans. Am. Inst. Chem. Eng., 36 (1940) 39-70.
- 17- Shulman, H. L., "Performance of packed column II : Wetted and effective interfacial areas, gas- and liquid-phase mass transfer", AIChE J., 1 (1955) 253-258.
- 18- Stull, D. R., "Vapor pressure of pure substances : Organic Compounds", Ind. Eng. Chem., 39 (1947) 517-540.
- 19- Wolniewicz, E., Essia Ngang, J. J., Letourneau, F., Villa, P., "Alcohol fermentation of beet molasses study on stillage recycle", Biotechnol. Lett., 12 (1990) 73-78.
- 20- Yamane, T., Matsuda, M., Sada, E., "Application of porous teflon tubing method to automatic fed batch culture of microorganisms", Biotechnol. Bioeng., 23 (1981) 2493-2507.

REFERENCES COMPLEMENTAIRES POUR LE CALCUL D'EQUILIBRE

- 21- CRC Hand Book of Chemistry and Physics, "Properties of air", CRC Press INC., 71th edit. (1990) Sect. 6-1.
- 22- Encyclopedia of Chemical Technology, Interscience Publishers New York - London, 2nd edit., 1 (1969) 79.
- 23- Van Krevelen, D. W., Hoftijzer, P. J., "Chimie et Industrie", Numéro Special du XXI Congrès International de Chimie Industrielle, Bruxelles (1948) 168.

PARTIE 2

SOMMAIRE

Culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en réacteur discontinu aéré	
I : Croissance sur glucose, Flux de carbone et Energie cellulaire.....	49
RESUME	49
I. INTRODUCTION	49
II. CONDUITE DES FERMENTATION	50
III. BILAN DE MATIERE ET RELATIONS CINETIQUES :	50
III.1. Bilan global de matière	50
III.2. Resultats : Dynamique des cultures discontinues.....	52
IV. MODELISATION DE LA REPARTITION DU FLUX DE GLUCOSE	57
IV.1. Bilans et représentation mécanistique du métabolisme cellulaire.....	57
IV.2. Résultats : Relation entre la croissance cellulaire et l'utilisation de l'ATP.....	62
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	66
Culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en réacteur discontinu aéré	
II : Croissance sur éthanol, Stoechiometrie et Energie cellulaire.....	67
RESUME	67
I. INTRODUCTION.....	67
II. CONDUITE DES FERMENTATION	68
III. CINETIQUES ET BILANS DE MATIERE.....	68
III.1. Bilans de matière et estimation de OUR, CPR et du QR.....	68
III.2. Résultats.....	70
IV. FLUX DE CARBONE ET ENERGIE CELLULAIRE	75
IV.1. Gluconéogénèse et précurseur de la biomasse	75
IV.2. Flux de carbone et bilan sur les molécules énergétiques.....	76
IV.3. Résultats : Variation de la maintenance avec la respiration de l'oxygène	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80
Considérations fonctionnelles du rôle de l'ATP et du NADH pour la modélisation du métabolisme et la croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
RESUME.....	81
I. INTRODUCTION.....	81
II. MATERIEL ET METHODES.....	82
III. RESULTATS ET DISCUSSION	82

III. 1. Croissance sur glucose.....	84
III. 2. Croissance sur éthanol.....	90
III. 3. Réponse de la levure au changement de substrats	94
REFERENCES.....	100

Modélisation de la croissance aérobie de *S. cerevisiae* en réacteur discontinu : Métabolisme,

Energie et Structure cellulaire.....	102
RESUME.....	102
I. INTRODUCTION.....	102
II. STœCHIOMETRIE DE LA BIOCONVERSION.....	103
II.1. l'anabolisme.....	103
II.2. Le catabolisme.....	103
III. STRUCTURE DE LA BIOMASSE.....	104
IV. LOIS CINETIQUES.....	106
V. BILANS DE MATIERE ET SYSTEME DIFFERENTIEL.....	112
V.1. Bilan macroscopique.....	113
V.2. Bilan sur les composés intracellulaires.....	113
V.3. Bilan sur la structure de la biomasse.....	115
VI. SIMULATIONS ET DISCUSSION DES RESULTATS	116
REFERENCES.....	123

Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur discontinu aéré I : Croissance sur glucose, Flux de carbone et Energie cellulaire.

RESUME :

Une souche commerciale de *Saccharomyces cerevisiae* a été cultivée en réacteur discontinu aéré à différentes concentrations initiales de glucose. Les vitesses de production de biomasse, d'éthanol et de consommation de glucose ont été calculées. A partir des résultats expérimentaux, une méthode originale a permis d'estimer les vitesses de consommation d'oxygène et de production de gaz carbonique. Un modèle mécanistique, tenant compte de l'énergie cellulaire, est proposé. En se basant sur le bilan de l'ATP, l'aspect énergétique de la croissance aérobie de la levure sur glucose est discuté. Cette étude montre que l'efficacité de la phosphorylation oxydative, P/O, et l'énergie de maintenance cellulaire peuvent varier au cours des cultures discontinues. Par ailleurs, on montre que si P/O est supposé constant, l'énergie de maintenance est variable et augmenterait linéairement avec l'activité respiratoire des cellules.

I. INTRODUCTION :

La bioconversion aérobie du glucose par la levure *Saccharomyces cerevisiae* a fait l'objet de nombreuses études. Ces dernières, réalisées essentiellement en réacteurs continus, ont contribué à l'amélioration des procédés de fermentation alcoolique. Plusieurs travaux considèrent que les caractéristiques énergétiques de la levure, efficacité de la phosphorylation oxydative, P/O, et le rendement énergétique, K_{ATP} , sont constantes. Cependant, leurs valeurs diffèrent selon les auteurs [1,3,12,14...]. Récemment, Grosz et Stephanopoulos [6] ont montré que la vitesse d'utilisation de l'ATP n'est pas directement proportionnelle à la vitesse de croissance cellulaire, mais augmente avec la concentration d'oxygène dans le milieu de culture. Cette différence d'appréciation de l'énergie de maintenance, apparemment contradictoires, peut être à l'origine d'une compréhension incomplète de ces phénomènes. Il serait intéressant d'étudier P/O et K_{ATP} , au cours de cultures en régime transitoire, afin d'élucider leurs comportements.

Dans cette optique, des expérimentations en réacteur discontinu, avec le glucose comme principale source de carbone, ont été réalisées. Dans un premier temps, des bilans de matière seront effectués pour établir un modèle mécanistique représentatif de la distribution du flux de carbone et d'énergie. Cette approche devrait permettre d'analyser la relation entre les cinétiques des différents composés mis en jeu et les besoins énergétiques de la croissance. Dans un deuxième temps, ces besoins énergétiques seront étudiés en terme de relation entre P/O, KATP et l'assimilation de l'oxygène.

II. CONDUITE DES FERMENTATION :

Une souche commerciale de *Saccharomyces cerevisiae* a été cultivée en réacteur discontinu aéré à différentes concentrations initiales en glucose (9,6 , 20 et 50 g/l). La composition minérale du milieu de culture est : 6 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/l de KH_2PO_4 , 1,5 g/l de $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l de NaCl, 0,1 g/l de CaCl_2 , 0,03 g/l de citrate de fer, 0,05 g/l de m-Inositol, 0,01 g/l d'acide nicotinique et de 3 g/l d'extrait de levure. Ce milieu est complété par des traces de vitamines et d'oligo-éléments [2]. Le réacteur utilisé est un CHEMAP de 20 l de capacité maximale. Le pourcentage de saturation en oxygène dissous est régulé à 45 (± 1)%. La température est régulée à 30 ($\pm 0,2$)°C. Le pH est contrôlé à 4,5 \pm 0,1. Les concentrations d'acétaldéhyde et d'éthanol sont mesurées toutes les 10 mn grâce à un capteur à membrane hydrophobe plane en Poly-Tétra-Fluoro-Ethylène [9]. La biomasse est mesurée par turbidométrie à 660 nm. Les concentrations en glucose, pyruvate et acétate sont mesurées par HPLC. La composition de l'air en oxygène et en CO_2 , à l'entrée et à la sortie du réacteur, est mesurée par un analyseur OSCAR de Schlumberger. Les vitesses de consommation d'oxygène et de production de CO_2 sont, alors, obtenues en effectuant un bilan de matière sur la phase gazeuse du réacteur.

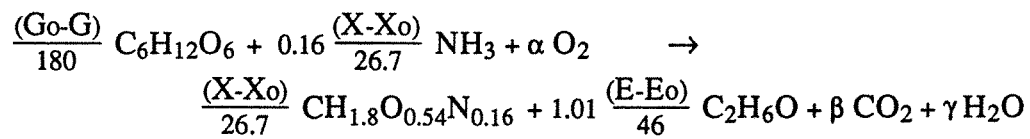
III. BILAN DE MATIERE ET RELATIONS CINETIQUES :

III.1. Bilan global de matière :

Afin de réaliser des bilans de matière et d'étudier la répartition du flux de carbone, une formule brute moyenne de biomasse a été utilisée, $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,54}\text{N}_{0,16}$ avec un taux de cendre de 7.5%, [3,5,10,12]. La masse molaire de la biomasse est de 26.7 g de matière sèche. Les concentrations et les vitesses seront exprimées, respectivement, en mole/l et en mole/l/h. Un bilan de matière global est effectué à chaque instant de la fermentation discontinue. Ce bilan assure la validité des résultats et permet de calculer les vitesses de consommation et de production des espèces moléculaires mises en jeu. Un terme correctif de 1% sur la stœchiométrie de l'éthanol a été considéré pour tenir compte des traces d'autres métabolites

excrétés tels que acétaldéhyde, acétate et pyruvate. Toute accumulation intracellulaire est considérée comme négligeable et il n'en sera pas tenu compte dans ce travail.

Partant de l'expérience, à un instant donné de la bioconversion, et par rapport aux concentrations initiales (o), l'avancement de la réaction de conversion peut s'écrire comme suit :



α, β, γ : coefficients stœchiométriques, à l'instant " t ". Ils affectent, respectivement, l'oxygène, le dioxyde de carbone et l'eau

G : concentration en glucose, en g/l.

X : concentration en biomasse, en g/l.

E : concentration en éthanol, en g/l.

Les coefficients stœchiométriques de cette réaction sont les quantités consommées ou produites de chaque composé mis en jeu. Ces coefficients, divisés par la masse molaire du composé correspondant, sont alors exprimés en mole/l.

Le bilan sur le carbone, l'hydrogène et l'oxygène conduit à un système à partir duquel on peut définir les expressions de α, β et γ :

$$\begin{cases} \alpha = 6 \frac{(G_0-G)}{180} - 1.06 \frac{(X-X_0)}{26.7} - 3.03 \frac{(E-E_0)}{46} \\ \beta = 6 \frac{(G_0-G)}{180} - \frac{(X-X_0)}{26.7} - 2.02 \frac{(E-E_0)}{46} \\ \gamma = 6 \frac{(G_0-G)}{180} - 0.66 \frac{(X-X_0)}{26.7} - 3.03 \frac{(E-E_0)}{46} \end{cases} \quad (1)$$

La dérivée de α, β et γ par rapport au temps permet d'obtenir les expressions des vitesses molaires de consommation d'oxygène, de production de CO_2 et de l'eau :

$$\begin{cases} \frac{d\alpha}{dt} = OUR = R_o = 6 R_g - 1.06 R_x - 3.03 R_e \\ \frac{d\beta}{dt} = CPR = R_c = 6 R_g - R_x - 2.02 R_e \\ \frac{d\gamma}{dt} = R_w = 6 R_g - 0.66 R_x - 3.03 R_e \end{cases} \quad (2)$$

où R_i est la vitesse de consommation ou de production du constituant " i "; R_i est toujours positif ou nul, condition imposée par la loi de conservation de la matière. Les indices o, c, w, g, x et e sont relatifs, respectivement, à l'oxygène, le dioxyde de carbone, l'eau, le glucose, la biomasse et l'éthanol.

Ce système d'équations explicite la relation entre les cinétiques des différents composés principaux de la biotransformation aérobie du glucose en réacteur discontinu. En particulier, la connaissance des vitesses R_g , R_x et R_e devrait permettre une bonne estimation de R_o et R_c , car, en pratique, la mesure de R_o et R_c est entachée de bruits relativement importants.

Le quotient respiratoire, $QR = R_c/R_o$, est déduit du système (2) :

$$QR = \frac{6 R_g - R_x - 2.02 R_e}{6 R_g - 1.06 R_x - 3.03 R_e} \quad (3)$$

Après réarrangement de cette expression, le QR peut être écrit comme suit :

$$QR = 1 + \frac{0.06 R_x + 1.01 R_e}{R_o}$$

Il est alors facile de constater que le QR ne peut être que supérieur ou égal à l'unité :

$$\forall i, R_i \geq 0, \quad \text{on a : } \frac{0.06 R_x + 1.01 R_e}{R_o} \geq 0$$

Deux cas limites peuvent se présenter : le premier correspond à la respiration totale du glucose, R_x et R_e sont nuls et QR est égal à 1. Le second se produirait quand R_o est très faible devant R_c , le QR tendrait vers une valeur très élevée, voire infinie si R_o est nul.

Le calcul des vitesses R_g , R_x et R_e est réalisé à partir des mesures de concentrations du glucose, de la biomasse et de l'éthanol, selon une technique de filtrage-lissage [8].

III.2. Resultats : Dynamique des cultures discontinues

Les cultures aérobies en fermenteur discontinu ont été réalisées avec différentes concentrations initiales en glucose (9.6 g/l, 20 g/l et 50 g/l). La figure 1 montre l'évolution des concentrations du glucose, de la biomasse et de l'éthanol. Les valeurs expérimentales sont traitées numériquement afin d'estimer les vitesses R_g , R_x et R_e .

Disposant de R_g , R_x et R_e , le système (2) permet de calculer R_o , R_c et QR. Ces données du bilan sont comparées aux valeurs expérimentales (figure 2) et montrent une bonne concordance pour OUR et CPR. Le QR expérimental est très bruité, cependant les valeurs théoriques sont nettement plus stables et continues.

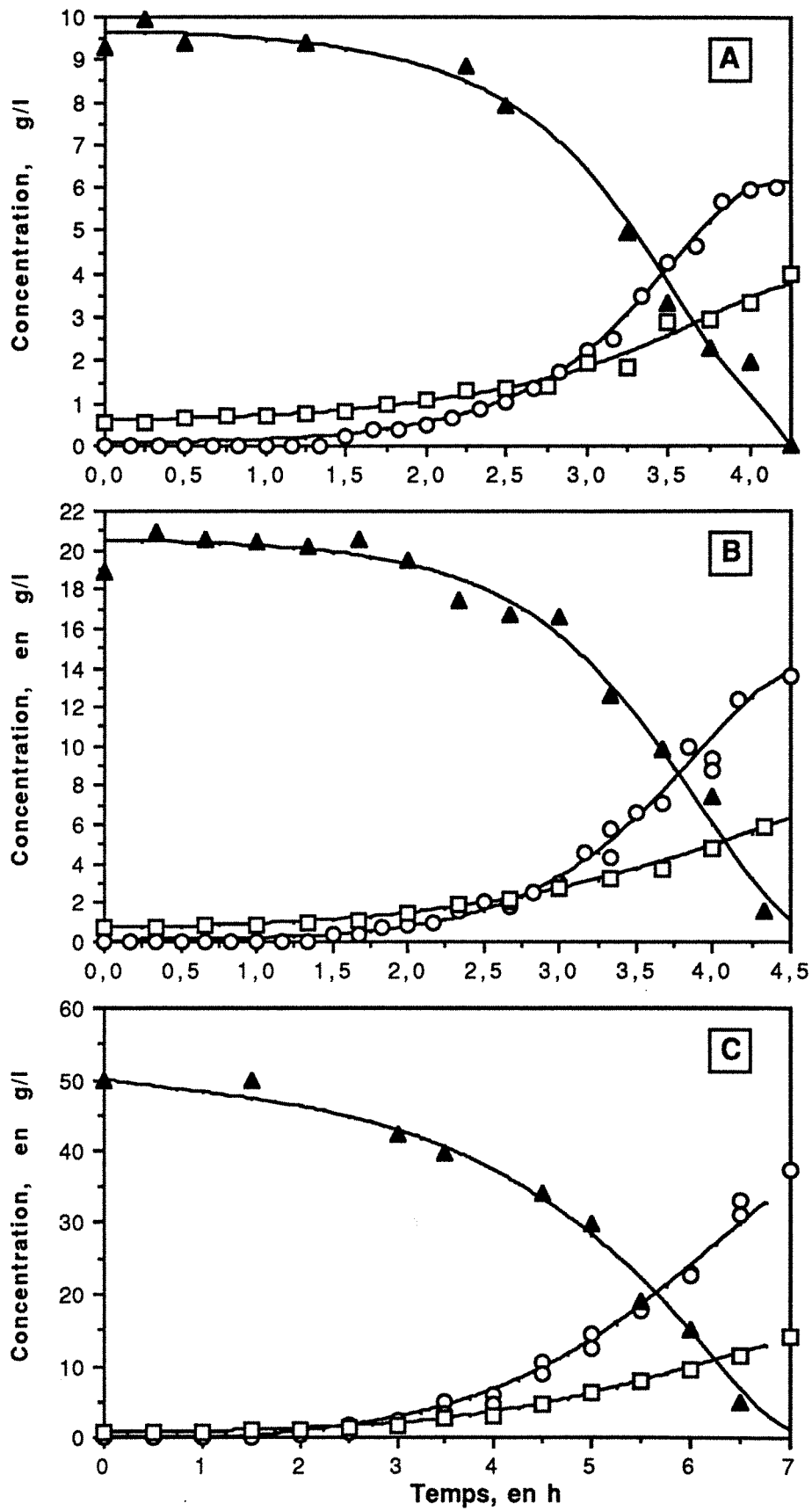


Figure 1: Evolution du glucose (▲), de la biomasse x2 (◻) et de l'éthanol x2 (○) en fonction du temps, à différentes concentrations initiales de glucose. A: 9.6 g/l -B: 20.5 g/l -C: 50 g/l.

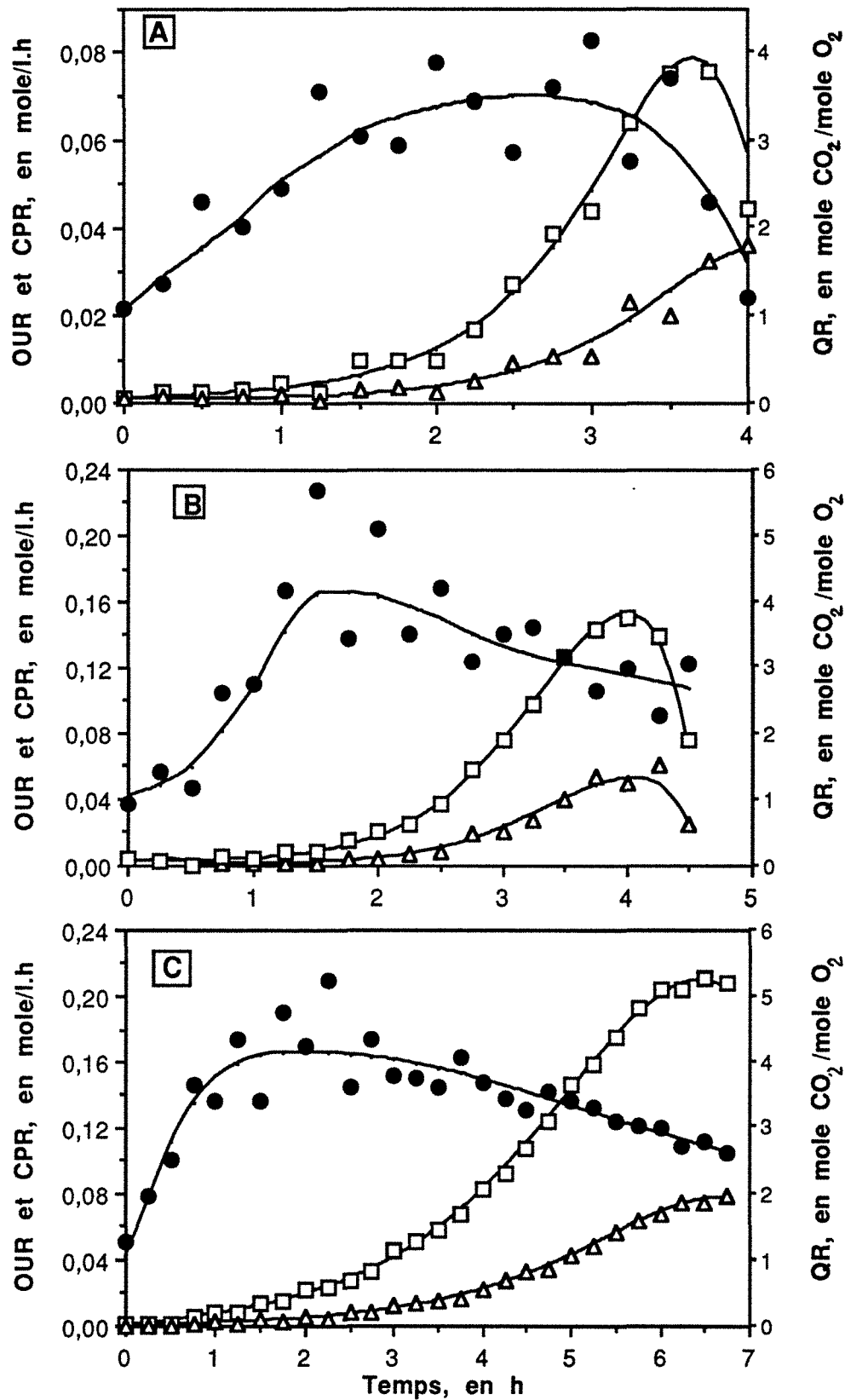


Figure 2: Comparaison de OUR (Δ), de CPR (\square) et du QR (\bullet) mesurés avec les valeurs estimées (traits) à partir du bilan de matière. Expériences : A: 9.6g/l, B: 20.5 g/l, C: 50 g/l.

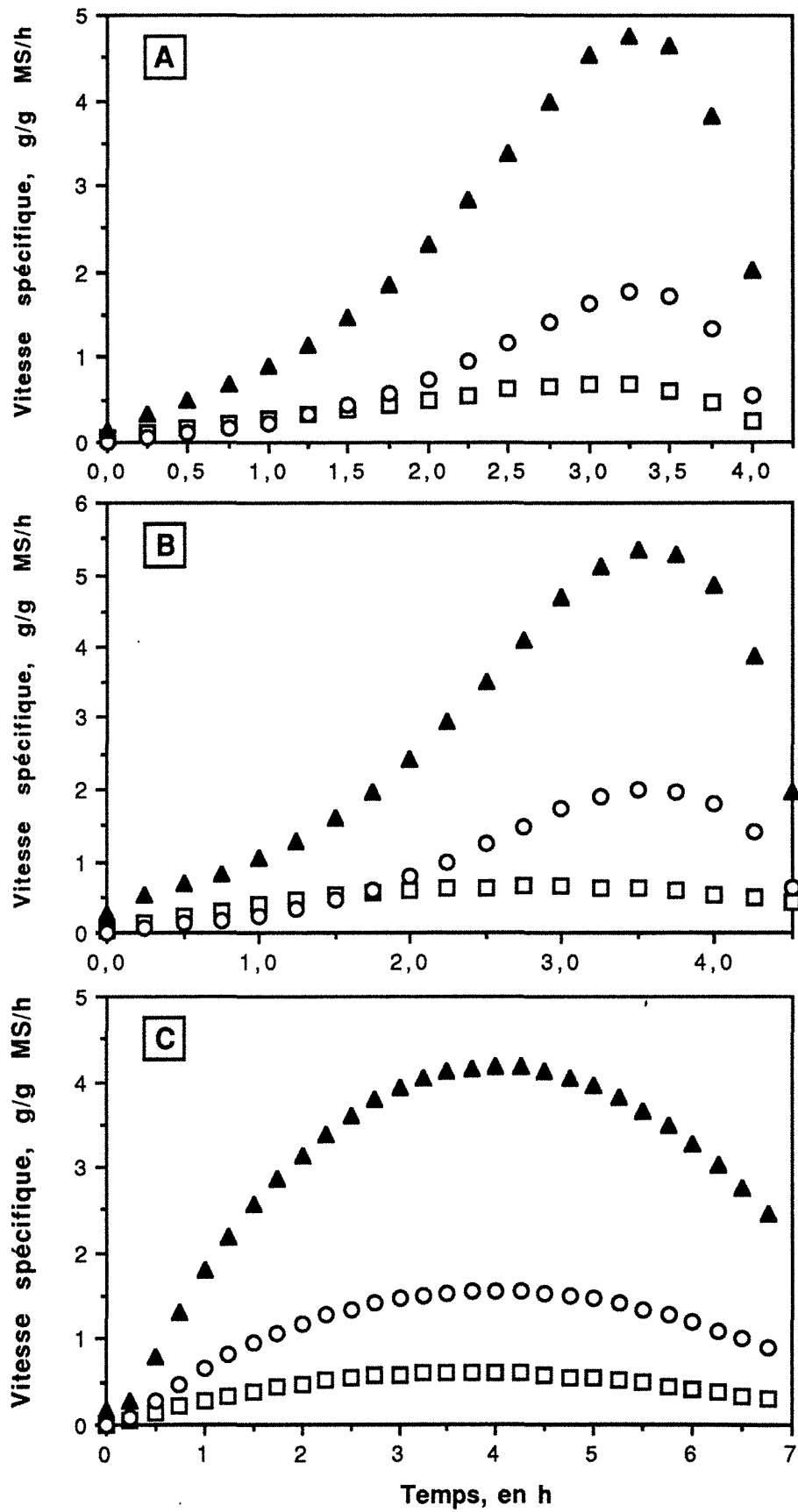


Figure 3: Evolution de q_G (\blacktriangle), de μ (\square) et de q_E (\circ) en fonction du temps, à différentes concentrations initiales de glucose. A: 9.6 g/l, B: 20.5 g/l, C: 50 g/l.

Ainsi, les hypothèses du paragraphe III.1 concernant le choix de la formule brute de la biomasse et la fuite de carbone associée à la production d'éthanol, sont validées. Dans ces conditions, les bilans de matière, sur le réacteur, sont également vérifiés.

Les différentes cultures ont pu être comparées à partir de l'étude des vitesses spécifiques des composés de la réaction. La figure 3 montre que celles-ci évoluent dans le temps et passent par un maximum entre la 3^{ème} et la 4^{ème} heure de fermentation. On constate, également, que la variation de ces vitesses est importante. Une évolution similaire est observée pour le QR. Commenant par des valeurs légèrement supérieures à l'unité, une valeur comprise entre 3 et 4, est atteinte relativement vite, au bout de 1.5 à 2 heures de culture. Ensuite, le QR diminue lentement vers 1.5 à 2.5 lorsque la concentration du glucose est faible (≤ 2 g/l). Les deux premières heures de fermentation, où le QR augmente de 1 à 4, correspondraient à une phase d'adaptation : les cellules de l'inoculum qui étaient en respiration de l'éthanol, passent à la fermentation du glucose. Par ailleurs, la diminution du QR traduit la tendance de la biomasse à respirer davantage l'oxygène. La cinétique de conversion du glucose en biomasse (figure 4) se présente en deux phases essentielles. La première, correspond au début de la fermentation, et montre une augmentation presque linéaire de μ en fonction de la vitesse spécifique d'utilisation du glucose, q_G . La production d'éthanol est alors faible voir nulle pour $q_G < 0,4$ g/gMS/h. Dans la seconde phase, μ augmente très peu avec q_G , alors que q_E devient linéaire à q_G (figure 5), d'où un rendement global $Y_{E/G}$ de 0.38 à 0.4 (g/g). Par ailleurs, cette souche de levure manifeste une cinétique très rapide avec une vitesse spécifique de croissance pouvant atteindre 0.7 h^{-1} . Le glucose est alors consommé à une vitesse de 5.5 g/gMS/h et l'éthanol est excrété à une vitesse de 1.8 à 2 g/gMS/h .

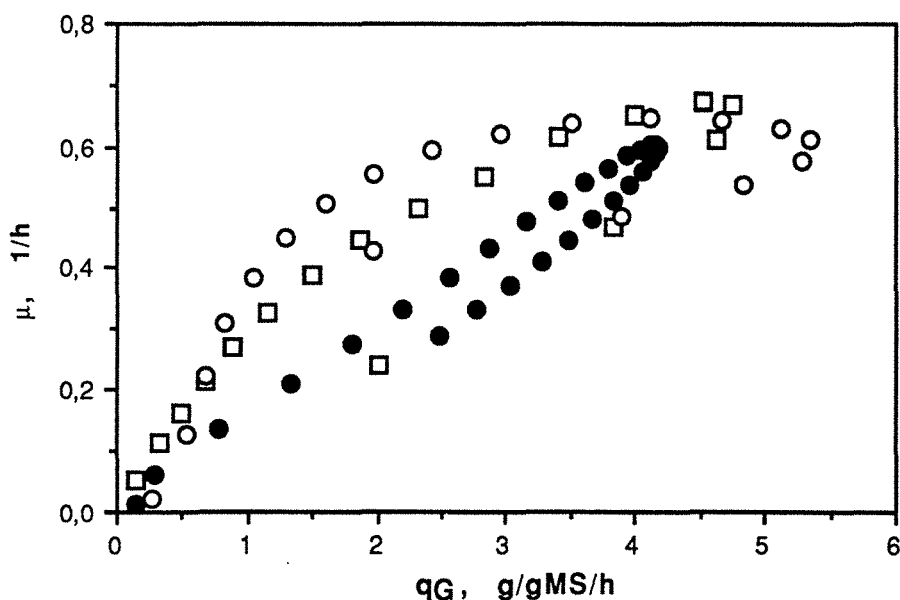


Figure 4 : Evolution de μ en fonction de q_G , à différentes concentrations initiales de glucose : (\square): 9.6 g/l, (\circ): 20.5 g/l, (\bullet): 50 g/l.

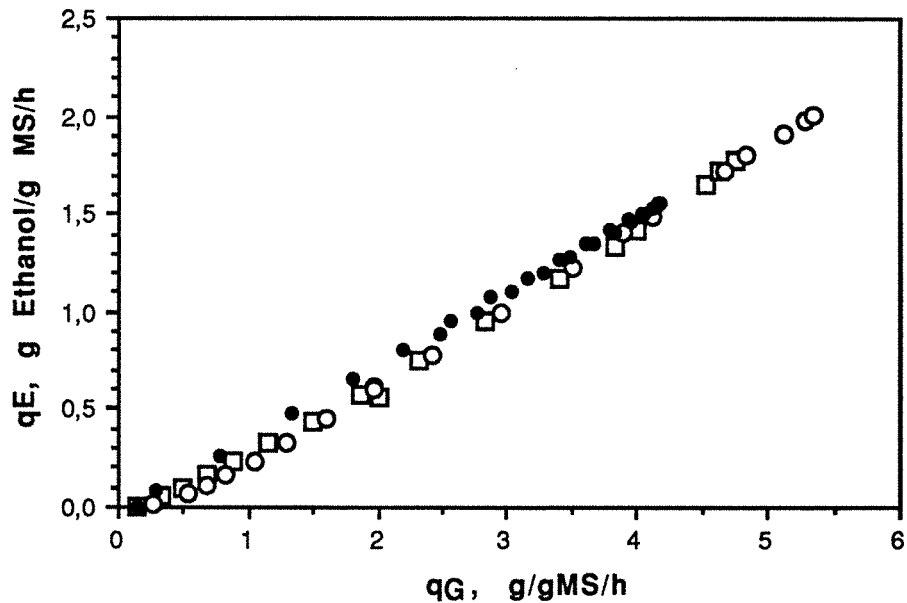


Figure 5: Evolution de q_E en fonction de q_G , à différentes concentrations initiales de glucose : (□): 9.6 g/l, (○): 20.5 g/l, (●): 50 g/l.

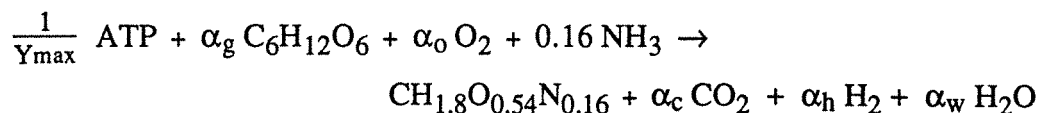
IV. MODELISATION DE LA REPARTITION DU FLUX DE GLUCOSE :

IV.1. Bilans et représentation mécanistique du métabolisme cellulaire :

Cette étape a pour but d'identifier, d'une manière globale et non structurée, la répartition du flux de glucose entre la croissance cellulaire, la production d'éthanol et de CO_2 . Il est tenu compte des molécules énergétiques (ATP, H_2) en fonction des voies biochimiques empruntées.

La structure du modèle est similaire à celle proposée par Oura [10,11] et utilise quatre réactions de conversion nette, qui sont :

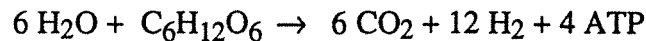
(T1) La réaction, r_1 , de synthèse de la biomasse, $CH_{1.8}O_{0.54}N_{0.16}$:



Bien que cette réaction soit largement décrite [3,11,13,14], cette nouvelle formulation prend en compte l'apport de l'oxygène moléculaire nécessaire à la biosynthèse des stérols et de leurs dérivés.

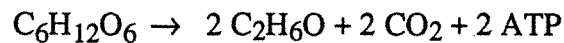
α_g , α_o , α_c , α_h et α_w sont respectivement les coefficients stœchiométriques du glucose, de l'oxygène, du CO_2 , des équivalents réducteurs H_2 et de l'eau. Y_{max} est le rendement maximum biomasse/ATP, exprimé en mole de biomasse produite par mole d'ATP consommée.

(T2) La réaction, r_2 , d'oxydation du glucose :



L'oxydation du glucose, selon ce schéma, est un bilan sur toute la cascade de réactions de la glycolyse et du cycle des acides tricarboxyliques.

(T3) La fermentation, r_3 , du glucose en éthanol :



Ce schéma résume toutes les étapes de la glycolyse suivies de la décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde. Ce dernier, sous l'action d'une alcoolaldéhydrogénase (ADH), est converti en éthanol.

(T4) La phosphorylation oxydative, r_4 :



Il s'agit, ici, d'un bilan global sur la chaîne respiratoire qui tient compte de l'efficacité du couplage énergétique, δ , couramment noté P/O.

Dans toutes les réactions (T1), (T2), (T3) et (T4) l'énergie chimique effectivement produite ou consommée, est représentée par des équivalents ATP. r_1 , r_2 , r_3 et r_4 sont les vitesses molaires de réaction exprimées en mole/l.h. Les bilans de matière effectués sur chaque espèce moléculaire conduisent à un système de 7 équations à 9 inconnues : r_1 , r_2 , r_3 , r_4 , α_g , α_o , α_c , α_h et α_w . Le bilan sur l'ATP sera développé et discuté ultérieurement.

$$\begin{cases} R_x = r_1 \\ R_g = \alpha_g r_1 + r_2 + r_3 \\ R_e = 2 r_3 \\ R_c = \alpha_c r_1 + 6 r_2 + 2 r_3 \\ R_o = \alpha_o r_1 + r_4 \\ R_w = \alpha_w r_1 + 2 r_4 - 6 r_2 \\ R_h = \alpha_h r_1 + 12 r_2 - 2 r_4 \end{cases} \quad (4)$$

En toute rigueur, les R_i sont des variations, du type $d[i]/dt$ fournies par les bilans de matière effectués sur le réacteur discontinu. On peut vérifier que pour toutes les molécules mesurées, leurs R_i sont égaux à leurs vitesses de consommation ou de production. Par contre, dans le cas des équivalents H_2 ou ATP (composés intracellulaires), R_h et R_{ATP} sont effectivement des

variations puisqu'elles représentent des sommes algébriques des vitesses de production et de consommation. R_h et R_{ATP} sont ramenées à l'unité de volume du milieu réactionnel.

Les résultats du paragraphe III, appuyés par ceux de la littérature [1,3,6], indiquent que R_h est négligeable. Après réarrangement du système, r_i ($i=1$ à 4), R_o , R_c et R_w ont pu être exprimés en fonction de α_g , α_o , α_c , α_h , α_w , R_g , R_x et R_e comme suit :

$$\begin{cases} r_1 = R_x \\ r_2 = R_g - \alpha_g R_x - \frac{1.01}{2} R_e \\ r_3 = \frac{1.01}{2} R_e \\ r_4 = 6 R_g - (6\alpha_g - \frac{\alpha_h}{2}) R_x - 3.03 R_e \\ R_o = 6 R_g - (6\alpha_g - \alpha_o - \frac{\alpha_h}{2}) R_x - 3.03 R_e \\ R_c = 6 R_g - (6\alpha_g - \alpha_c) R_x - 2.02 R_e \\ R_w = 6 R_g - (6\alpha_g - \alpha_w - \alpha_h) R_x - 3.03 R_e \end{cases} \quad (5)$$

Par identification de ces nouvelles expressions de R_o , R_c et R_w à leurs homologues, donnés par le système (4), on en déduit :

$$\begin{cases} 6\alpha_g - \alpha_o - \frac{\alpha_h}{2} = 1.06 \\ 6\alpha_g - \alpha_c = 1 \\ 6\alpha_g - \alpha_w - \alpha_h = 0.66 \end{cases} \quad (6)$$

Pour résoudre ce système, deux relations supplémentaires ou plus simplement la connaissance des valeurs de deux coefficients, sont nécessaires. Dans la littérature, les valeurs de α_g et α_h ont été proposées par plusieurs auteurs (voir tableau 1). Connaissant α_g et α_h , les coefficients α_o , α_c et α_w peuvent être, alors, calculés :

$$\begin{cases} \alpha_o = 6\alpha_g - \frac{\alpha_h}{2} - 1.06 \\ \alpha_w = 6\alpha_g - \alpha_h - 0.66 \\ \alpha_c = 6\alpha_g - 1 \end{cases} \quad (7)$$

Le choix entre les différents couples de valeur de (α_g, α_h) , proposés dans la littérature, a été guidé par la contrainte de positivité logique imposée sur tous les coefficients, α_i , selon la réaction r_1 . Les valeurs de α_g et α_h , les plus rencontrées, sont résumées dans le tableau 1. Les valeurs de α_o , α_c et α_w calculées d'après les relations (7) y sont, également, présentées.

Le coefficient α_o est négatif dans le cas de la référence [10], signifiant une production d' O_2 , ce qui est en totale contradiction avec la biologie de la levure. Dans un autre travail [3,12], la stœchiométrie de la réaction r_1 a été reformulée de manière à négliger α_o ($\alpha_o = 0$).

Réf.	α_g	α_h	Valeurs déduites			Observations
			α_o	α_c	α_w	
[10]	0.1825	0.13	- 0.03	0.09	0.305	$\alpha_o < 0$, impossible
[14]	0.1869	0.1068	0.008	0.1214	0.3546	$\alpha_o > 0$, retenue

Tableau 1: Stoechiometrie de la réaction de synthèse du précurseur de biomasse à partir du glucose comme source de carbone.

Cependant, il est connu que la biosynthèse des stérols, et leurs dérivés, nécessite de l'oxygène moléculaire [4]. Vu la teneur moyenne de *S. cerevisiae* en stérols totaux, 23 à 55 % de la masse des lipides totaux (4 à 9 % de lipides par g de matière sèche [4]), le besoin en oxygène, α_o , pour la synthèse des stérols est estimé à une quantité comprise entre 0.6 et 3 mmole de O_2 par mole de biomasse. Le précurseur des stérols est supposé être le Lanostérol, de poids molaire 426 g.

Notons que la teneur en lipides totaux et en stérols augmente significativement quand la levure est cultivée en présence de fortes concentrations en glucose [4]. Ceci expliquerait la valeur relativement élevée de α_o calculée, 0.008 mole de O_2 par mole de matière sèche.

Ainsi, et compte tenu de cette discussion, la réaction de formation de biomasse peut être décrite par les coefficients α_g et α_h , proposés par Stouthamer [14], et par α_o , α_c et α_w , calculés dans ce travail :

$$\alpha_g = 0.1869 \quad \alpha_h = 0.1068 \quad \alpha_o = 0.008 \quad \alpha_c = 0.1214 \quad \alpha_w = 0.3546$$

En remplaçant les " α_i " par leurs valeurs, le système (5) peut être représenté par l'écriture matricielle suivante :

$$\begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \\ R_o \\ R_c \\ R_w \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0. & 1. & 0. \\ 1. & -0.1869 & -0.505 \\ 0. & 0. & 0.505 \\ 6. & -1.068 & -3.03 \\ 6. & -1.06 & -3.03 \\ 6. & -1. & -2.02 \\ 6. & -0.66 & -3.03 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R_g \\ R_x \\ R_e \end{bmatrix} \quad (8)$$

Disposant du système (8) qui exprime, en particulier, les vitesses r_1 , r_2 , r_3 et r_4 en fonction de R_g , R_x et R_e , le bilan sur l'ATP peut être établi. Il sera tenu compte de l'ATP utilisé pour la croissance et de l'ATP dissipé, selon la relation [5,15] :

$$r_{ATP}^X = \frac{r_1}{Y_{max}} + m C_x \quad (9)$$

- où : r_{ATP}^x : vitesse d'utilisation de l'ATP, associée à la croissance, en mole ATP/l/h.
 Y_{max} : rendement maximum net de moles de matière sèche produite par mole d'ATP.
 m : Vitesse spécifique d'hydrolyse d'ATP (maintenance) associée à la croissance, en mole ATP/mole MS/h.
 C_x : concentration de la biomasse, en mole MS/l.

Le bilan sur l'ATP, à partir des réactions T1, T2, T3, T4 et en considérant la relation (9), conduit à l'expression de R_{ATP} , qui représente la variation totale de la concentration d'ATP :

$$R_{ATP} = 4 r_2 + 2 r_3 + 2\delta r_4 - \frac{r_1}{Y_{max}} - m C_x \quad (10)$$

Sachant que μC_x est égal à r_1 , C_x peut être substituée par r_1/μ . Ainsi, R_{ATP} s'écrit simplement :

$$R_{ATP} = 4 r_2 + 2 r_3 + 2\delta r_4 - r_1 \left(\frac{1}{Y_{max}} + \eta \right) \quad (11)$$

où η est le rapport $\frac{m}{\mu}$, homogène à $\frac{1}{Y_{max}}$, μ étant la vitesse spécifique de croissance.

Lorsque r_1 , r_2 , r_3 et r_4 sont remplacés par leurs expressions, données par le système (8), R_{ATP} s'écrit comme suit :

$$R_{ATP} = (12\delta + 4)R_g - (0.7476 + 2.136\delta + \frac{1}{Y_{max}} + \eta)R_x - (6.06\delta + 1.01)R_e \quad (12)$$

Etant donné que la concentration cellulaire en ATP est très faible, 4 à 16 μ mole/gMS [6,7], on peut considérer la variation R_{ATP} comme quantitativement nulle, et l'équation (12) devient :

$$0.7476 - \frac{4R_g - 1.01R_e}{R_x} = \delta \left\{ \frac{12R_g - 6.06R_e}{R_x} - 2.136 \right\} - \frac{1}{Y_{max}} - \eta \quad (13)$$

Cette équation met en évidence une relation linéaire entre les deux triplets (δ, Y_{max}, η) et (R_g, R_x, R_e) , cette relation peut se mettre sous la forme :

$$f(Z) = \delta Z - K_{ATP}$$

Les variables Z , $f(Z)$ et K_{ATP} sont définies comme suit :

$$\left\{ \begin{array}{l} Z = \frac{12R_g - 6.06R_e}{R_x} - 2.136 \\ K_{ATP} = \frac{1}{Y_{max}} + \eta \\ f(Z) = 0.7476 - \frac{4R_g - 1.01R_e}{R_x} \end{array} \right. \quad (14)$$

Z et f(Z) sont parfaitement calculables à partir de R_g , R_x et R_e . δ , Y_{max} et η peuvent être, alors, étudiés en fonction des résultats expérimentaux obtenus.

En résumé, le modèle proposé est un outil d'analyse cinétique de la croissance de la levure sur glucose. Le cas traité concerne les cultures discontinues. La répartition du flux de glucose, entre la biomasse, l'éthanol et le CO_2 , est décrite par les vitesses r_1 , r_2 et r_3 . La vitesse r_4 est relative à la consommation d'oxygène et à la phosphorylation oxydative. La connaissance des vitesses R_g , R_x et R_e permettra d'estimer les vitesses de réactions r_1 , r_2 , r_3 et r_4 , d'une part, et OUR, CPR et QR, d'autre part. Le bilan sur l'ATP permettra de discuter l'aspect énergétique de la croissance et la relation entre δ , Y_{max} et η au cours d'une culture discontinue.

IV.2. Résultats : Relation entre la croissance cellulaire et l'utilisation de l'ATP

Si on trace f(Z) en fonction de Z, relation (13), on s'aperçoit que les courbes obtenues, pour chacune des trois cultures réalisées (figure 6), ne sont pas des droites comme cela a été proposé [3,13]. Ceci montre qu'au moins l'un des paramètres δ , Y_{max} et η est variable. Afin d'analyser leur influence mutuelle, des valeurs fixées de δ , ou de K_{ATP} (relation 14), sont utilisées. Ces valeurs sont choisies de manière à couvrir les données de la littérature [1,3,6]. K_{ATP} est calculé pour des δ de 0.9, 1.2 à 1.5. Réciproquement, δ a été déterminé pour des K_{ATP} égaux à 2, 2.5 et 3. Les figures 7 et 8 montrent que δ et K_{ATP} évoluent au cours de la culture. Cependant, si les valeurs de K_{ATP} sont voisines de celles de la littérature, ce n'est pas le cas pour δ qui peut atteindre une valeur de 7 et s'avère très sensible à K_{ATP} . Ces valeurs de δ sont très peu probables puisque l'efficacité de la phosphorylation oxydative, P/O ou δ , est une propriété physiologique relativement constante et ne peut excéder 3. En effet, δ est un facteur de couplage énergétique entre la chaîne de transfert d'électrons et les sites de phosphorylation de l'ADP. Chez les levures, δ est de l'ordre de 1. Par contre, les besoins énergétiques globaux, K_{ATP} , sont plutôt fonction des conditions de culture et de l'état physiologique des cellules. Ce paramètre K_{ATP} , comme l'indique la définition (14), contient un terme η qui peut varier. Dans la littérature [13] on trouve différentes valeurs de η (1.7 à 3). Pour ces raisons, δ est supposé constant et égal à 1 [3,6].

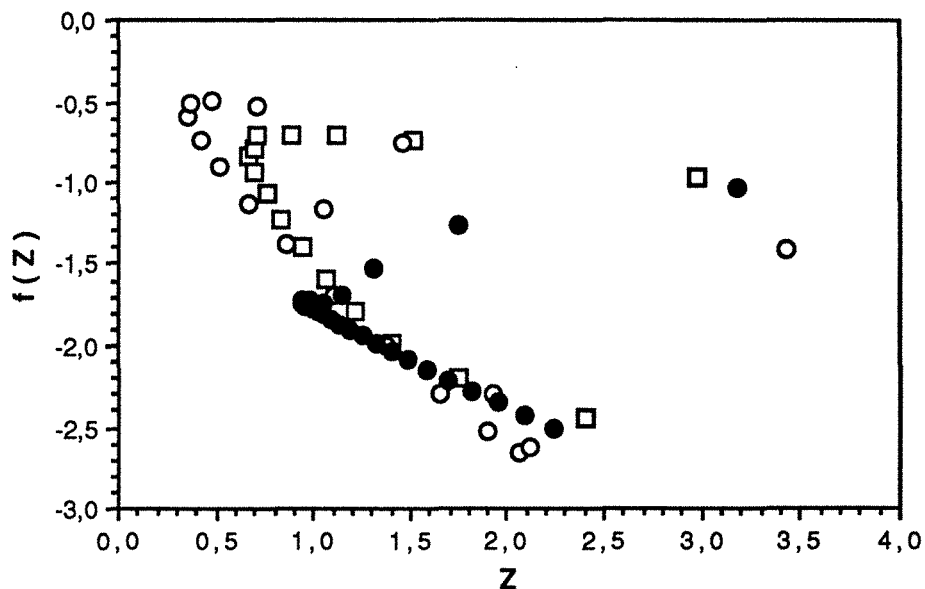


Figure 6: Représentation de $f(Z)$ en fonction de Z , à différentes concentrations initiales de glucose : (□): 9.6 g/l, (○): 20.5 g/l, (●): 50 g/l.

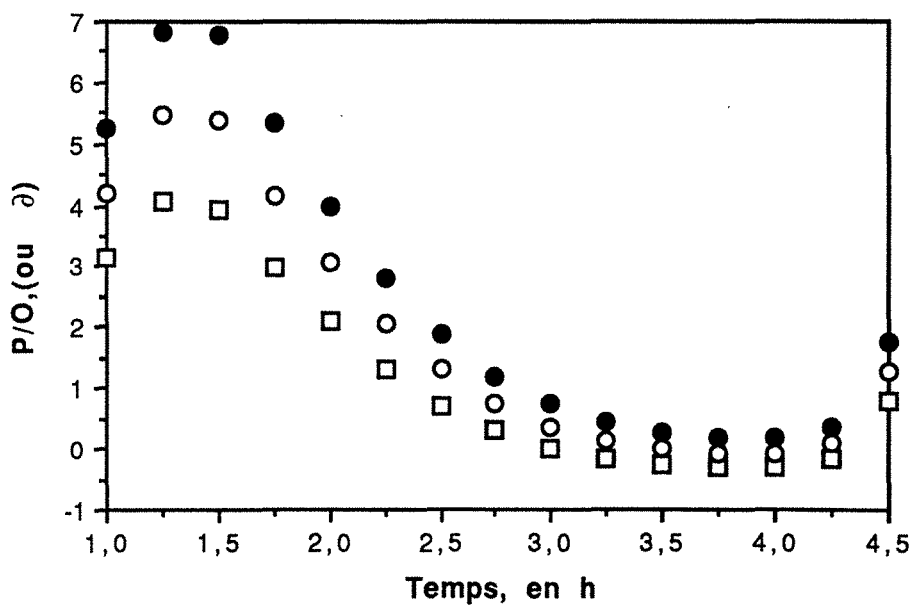


Figure 7: Evolution de P/O (δ) au cours d'une fermentation discontinue à 20 g/l de glucose initial, pour différentes valeurs de K_{ATP} : (□): 2 - (○): 2.5 - (●): 3.

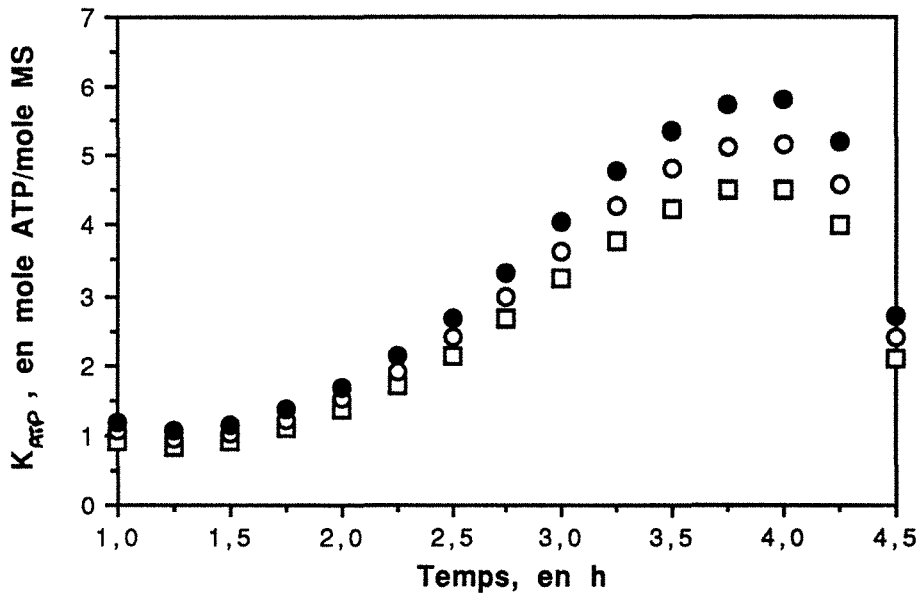


Figure 8: Evolution de K_{ATP} au cours d'une fermentation discontinue à 20 g/l de glucose initial, pour différentes valeurs de P/O (δ): (□): 0.9 - (○): 1.2 - (●): 1.5.

La consommation spécifique d'ATP a été déterminée à chaque instant de la fermentation. $1/Y_{max}$ est pris égal à 0.75. $\pm 15\%$, on retrouve les valeurs de la littérature : 0.61 pour Oura [10,11] et 0.896 pour Roels [12]. Les calculs effectués sont très peu sensibles à cette variation de 15% sur $1/Y_{max}$. A partir des valeurs de η et de μ , on peut déduire la vitesse d'utilisation de l'ATP pour "la maintenance". La figure 9 montre que cette vitesse est hautement corrélée à la vitesse spécifique de respiration de l'oxygène (r_4/C_x).

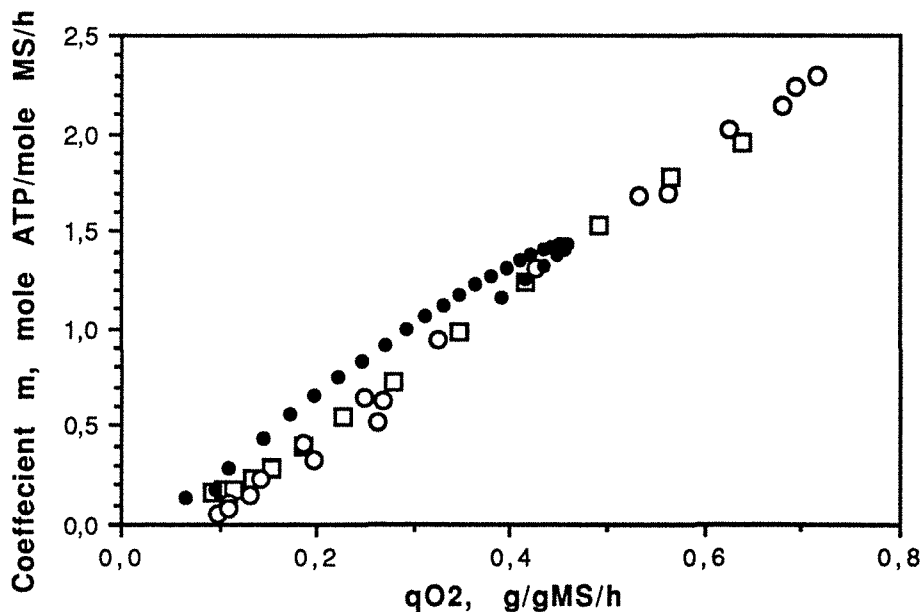


Figure 9: Evolution du coefficient de maintenance m en fonction de q_{O_2} , pour différentes concentrations initiales de glucose : (□): 9.6 g/l, (○): 20.5 g/l, (●): 50 g/l.

Cette constatation est en accord partiel avec les conclusions de Grosz et Stephanopoulos [6]. Ce dernier propose que les dépenses énergétiques augmenteraient avec la concentration d'oxygène dissous (DO). Or, dans notre travail, la DO a été régulée et maintenue constante à 45% de saturation. Cependant, dans le cas des travaux de Grosz et Stephanopoulos [6], on peut considérer que l'augmentation de la DO entraîne celle de la vitesse spécifique d'utilisation d'oxygène, et s'accompagne alors d'un accroissement de la maintenance. Ces phénomènes de maintenance existent également au cours des bioconversions anaérobies, supplémentés en ergostérol [3,12]. Ces observations suggèrent que la maintenance est plutôt contrôlée par des facteurs intracellulaires tels que l'ATP ou les cofacteurs réduits (H_2) [7]. En tous cas, le présent travail montre que le coefficient de maintenance, m , n'est pas constant. Bien que ce coefficient apparaisse, ici, hautement corrélé à l'utilisation de l'oxygène, cette explication n'est pas suffisante pour décrire les processus anaérobies stricts.

NOMENCLATURE :

CPR, R_c	: vitesse de production de CO_2 , mole/l/h.
C_x	: concentration en biomasse sèche, mole MS/l.
DO	: pression partielle d'oxygène dissous
E	: concentration d'éthanol, g/l.
G	: concentration du glucose, g/l.
K_{ATP}	: coefficient global d'utilisation d'ATP, mole ATP/ mole MS.
MS	: biomasse sèche.
m	: maintenance cellulaire, mole ATP/mole MS/h.
OUR, R_o	: vitesse d'assimilation de l'oxygène, mole/l/h.
P/O, δ	: efficacité de la phosphorylation oxydative, mole ATP/ atome d'oxygène.
q_E	: vitesse spécifique de production d'éthanol, g/gMS/h.
q_G	: vitesse spécifique de consommation de glucose, g/gMS/h.
q_{O_2}	: vitesse spécifique de consommation d'oxygène, g/gMS/h.
QR	: quotient respiratoire, mole CO_2 / mole O_2 .
r_1, r_2, r_3, r_4	: vitesses de réactions, mole/l/h.
R_{ATP}	: variation globale de l'ATP, mole/l/h.
R_e	: vitesse de production d'éthanol, mole/l/h.
R_g	: vitesse d'utilisation du glucose, mole/l/h.
R_h	: variation globale des équivalents H_2 , mole/l/h.
R_w	: vitesse de production d'eau, mole/l.h.
R_x	: vitesse de production de biomasse, mole MS/l/h.
r_{ATP}^x	: vitesse d'utilisation d'ATP associée à la croissance, mole/l/h.
X	: concentration en biomasse sèche, g MS/l.
YE/G	: rendement global de conversion du glucose en éthanol, g Ethanol/g Glucose.
Y_{max}	: rendement maximum, mole MS/ mole ATP.
YX/G	: rendement global de conversion du glucose en biomasse, gMS/g Glucose.

SYMBOLES

α, β, γ	: coefficients stœchiométriques.
$\alpha_h, \alpha_w, \alpha_g, \alpha_o, \alpha_c$: coefficients stœchiométriques.
δ	: efficacité de la phosphorylation oxydative, mole ATP/ atome d'oxygène.
η	: rapport de la maintenance, m , à la vitesse spécifique de croissance, μ .
μ	: vitesse spécifique de croissance, 1/h.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1- Barford, J. P., " A general model for aerobic yeast growth. Part I: Batch growth, part II: Continuous culture", *Biotechnol. Bioeng.*, 35 (1990) 907-927.
- 2- Dantigny, Ph., Ninow, J. L., Marc, I., Engasser J.-M., "Representation of the changes in the metabolic pattern of Baker's yeast from the measurements of extracellular pyruvate, acetate, acetaldehyde and ethanol", *Biotechnol. Lett.*, 11 (1989) 515-520.
- 3- Dekkers, J. G. J., De Kok, H. E., Roels, J. A., "Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 426 : Comparison of anaerobic and aerobic glucose limitation", *Biotechnol. Bioeng.*, 23 (1981) 1023-1035.
- 4- Gancedo, C., Serrano, R., "Lipids and their metabolism", in "The Yeasts", 2nd edit. by Rosa, A. H., Harrison, J. S., U.S.A. Acad. Press Inc., 3 (1989) 383-391.
- 5- Gancedo, C., Serrano, R., "Energy-yielding metabolism", in "The Yeasts", 2nd edit. by Rosa, A. H., Harrison, J. S., U.S.A. Acad. Press Inc., 3 (1989) 220-245.
- 6- Grosz, R., Stephanopoulos, G., "Physiological, biochemical and mathematical studies of micro-aerobic continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* . Part I,II and III. *Biotechnol. Bioeng.*, 36 (1990) 1006-1040.
- 7- Krallish, I. L., Damberg, B. E., Beker, M. J., "State of adenosine phosphates during dehydration of yeast", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31 (1989) 194-199.
- 8- Mosrati, R., Fonteix, C., Marc, I., "Validation de mesures et analyse cinétique de bioprocédés par filtrage numérique non-stochastique", (en cours).
- 9- Ninow, J. L., "Propriétés de capteurs à membrane PTFE pour la détection de produits volatils. Application au suivi en-ligne de procédés de fermentation", Thèse de l'I.N.P.L. (1989), Nancy - France.
- 10- Oura, E., "Reactions leading to the formation of yeast cell material from glucose and ethanol", *Alkon Keskus Laboratorio report 8078* (1972), Helsinki.
- 11- Oura, E., "Reaction products of yeast fermentations", *Process Biochem.*, 12 (1977) 19-35.
- 12- Roels, J. A., Bioengineering report : "Application of macroscopic principles to microbial metabolism", *Biotechnol. Bioeng.*, 22 (1980) 2457-2514.
- 13- Roels, J. A., "Energetics and kinetics in biotechnology", Elsevier Biomedical Press (1983), Elsevier Inc. Amsterdam - New York - Oxford.
- 14- Stouthamer, A. H., "A theoretical study on the amount of ATP required for the synthesis of microbial cell material", *Antonie van Leeuwenhoek*, 39 (1973) 537-545.
- 15- Stouthamer, A. H., Bettenhausen, C., "Utilisation of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms", *Biochim. Biophys. Acta* , 310 (1973) 53-70.

Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur discontinu aéré II : Croissance sur éthanol, Stœchiométrie et Energie cellulaire.

RESUME :

Une souche commerciale de *Saccharomyces cerevisiae* a été cultivée sur éthanol, en réacteur discontinu aéré. Les vitesses de production de biomasse, d'acétate, d'acétaldéhyde et de consommation d'éthanol ont été calculées. Un bilan de matière, global, a permis l'estimation de OUR, CPR et du QR. Ensuite, un modèle mécanistique est proposé pour décrire les voies métaboliques nécessaires à la croissance de la levure sur l'éthanol. En particulier, l'étude de la gluconéogénèse, caractéristique de la croissance sur substrat non-glycolytique, a permis de rendre compte du surcoût en ATP. Enfin, les dépenses énergétiques cellulaires ont pu être calculées et discutées : la maintenance cellulaire varie au cours la croissance et augmente avec la vitesse spécifique de respiration de l'oxygène.

I. INTRODUCTION :

Du point de vue bioprocédé, la production de levures sur éthanol ne présente, certes, aucun intérêt. Tout au contraire, c'est la bioconversion des sucres fermentescibles, en biomasse ou en éthanol, qui est l'objectif principal des industries de valorisation des sous-produits alimentaires et agro-alimentaires (mélasses, lactosérum...).

Cependant, l'étude des cultures de levures sur éthanol est une étape nécessaire à la compréhension de leur comportement. Cette connaissance permettrait de mieux maîtriser et contrôler ces cultures sur les sucres [7,8]. En effet, dans le cas de production de levures, à partir d'un sucre comme le glucose, l'accumulation de l'éthanol indique une déviation du flux de carbone vers la voie fermentaire, d'une part, et conduit à des inhibitions, d'autre part. Ces deux effets conjugués entraînent des pertes sur le rendement et la productivité du procédé [2]. Généralement, dans cette situation l'alimentation des réacteurs semi-continus est arrêtée jusqu'à la reconsommation, presque totale, de l'éthanol. Ainsi, dans le but de rétablir le plus vite possible, la croissance sur glucose, il va falloir stimuler la réassimilation de l'éthanol.

Ce travail concerne la cinétique de croissance de la levure de boulangerie sur éthanol en réacteur discontinu. Des bilans de matière et d'énergie (ATP et équivalent réducteur H₂) seront effectués. Ces bilans devront permettre le calcul et l'analyse de l'évolution de la maintenance cellulaire en relation avec la cinétique du processus.

II. CONDUITE DES FERMENTATION :

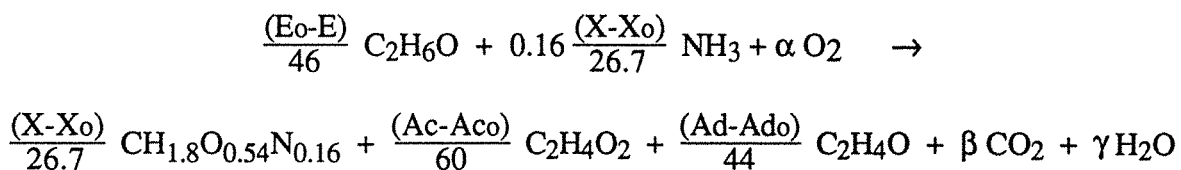
Les cultures sont conduites de la même manière et effectuées dans les mêmes conditions que les expériences de la première partie (sur glucose). Dans le présent travail, deux cultures effectuées à 7 g/l et à 8.5 g/l d'éthanol initial seront exposées. La première a été inoculée par une préculture réalisée en erlenmeyer. La biomasse initiale est faible, 0.3 gMS/l. Le milieu réactionnel est préparé selon la même composition minérale que précédemment [6].

La deuxième expérience correspond à la phase de réassimilation de l'éthanol accumulé au cours de la fermentation du glucose, initialement à 20.5 g/l. Dans ce cas, la biomasse initiale est de 4 gMS/l, le milieu réactionnel n'étant pas renouvelé.

III. CINETIQUES ET BILANS DE MATIERE :

III.1. Bilans de matière et estimation de OUR, CPR et du QR :

Dans cet article, la formule brute de biomasse retenue est [1,7,8,11] : $CH_{1.8}O_{0.54}N_{0.16}$, avec un taux de cendre de 7.5%. La masse molaire est de 26.7 g de matière sèche. Un bilan de matière, global, est effectué à chaque instant de la fermentation. Toute accumulation intracellulaire est considérée comme négligeable et il n'en sera pas tenu compte dans ce travail [6]. La réaction globale de conversion de l'éthanol est la suivante :



où : α, β, γ : coefficients stœchiométriques affectant, respectivement, l'oxygène, le CO_2 et l'eau.

E : concentration en éthanol, g/l.

X : concentration en biomasse, g/l.

Ac : concentration en acide acétique, g/l.

Ad : concentration en acétaldéhyde, g/l.

L'indice (o) indique les concentrations initiales, prises au temps zéro de la culture sur éthanol.

Les coefficients stœchiométriques de cette réaction sont tous positifs et représentent les quantités consommées ou produites de chaque composé, à un instant donné de l'avancement de la bioconversion. Ces coefficients, respectivement rapportés à la masse molaire de chaque composé, sont alors exprimés en mole/l.

Le bilan sur le carbone, l'hydrogène et l'oxygène conduit au système suivant :

$$\begin{cases} 2 \frac{(E_o-E)}{46} = \frac{(X-X_o)}{26.7} + 2 \frac{(Ac-Aco)}{60} + 2 \frac{(Ad-Ado)}{44} + \beta \\ \frac{(E_o-E)}{46} + 2\alpha = 0.54 \frac{(X-X_o)}{26.7} + 2 \frac{(Ac-Aco)}{60} + 2 \frac{(Ad-Ado)}{44} + 2\beta + \gamma \\ 6 \frac{(E_o-E)}{46} + 0.48 \frac{(X-X_o)}{26.7} = 1.8 \frac{(X-X_o)}{26.7} + 4 \frac{(Ac-Aco)}{60} + 4 \frac{(Ad-Ado)}{44} + 2\gamma \end{cases} \quad (1)$$

La résolution de ce système, (1), suivi par la dérivation de α , β et γ par rapport au temps conduit aux expressions des vitesses molaires de consommation d'oxygène, de production de CO₂ et d'eau :

$$\begin{cases} \frac{d\alpha}{dt} = OUR = R_o = 3 R_e - 1.06 R_x - 2 R_{ac} - 2.5 R_{ad} \\ \frac{d\beta}{dt} = CPR = R_c = 2 R_e - R_x - 2 R_{ac} - 2 R_{ad} \\ \frac{d\gamma}{dt} = R_w = 3 R_e - 0.66 R_x - 2 R_{ac} - 2 R_{ad} \end{cases} \quad (2)$$

où : R_i , exprimée en mole/l/h, est la vitesse globale de consommation et/ou de production d'un composé " i ". Les indices o, c, w, e, x, ac et ad sont relatifs, respectivement, à l'oxygène, le dioxyde de carbone, l'eau, l'éthanol, la biomasse, l'acide acétique et l'acétaldéhyde. R_{ad} est la vitesse de production nette d'acétaldéhyde, obtenue après restitution des pertes dues à l'entraînement par aération [5].

Le quotient respiratoire, $QR = \frac{CPR}{OUR}$, peut être déduit du système (2) :

$$QR = \frac{2 R_e - R_x - 2 R_{ac} - 2 R_{ad}}{3 R_e - 1.06 R_x - 2 R_{ac} - 2.5 R_{ad}} \quad (3)$$

Cette expression peut être discutée selon plusieurs cas de figures. En particulier, lorsque l'éthanol est complètement respiré (R_x , R_{ac} et $R_{ad} = 0$), le QR est égal à 2/3. L'expression (3) peut être réarrangée en fonction du QR de référence, 2/3, et conduit à :

$$QR = \frac{2}{3} - \frac{0,88 R_x + 2 R_{ac} + R_{ad}}{3 OUR} \quad (4)$$

La relation (4) montre, clairement, que la croissance de levures sur éthanol s'accompagne d'un QR inférieur ou égal à 2/3 s'il n'y a pas assimilation simultanée d'acétate et/ou d'acétaldéhyde.

III.2. Résultats :

Les mesures de biomasse, éthanol, acétaldéhyde et d'acétate, issues des deux cultures, ont été filtrées et lissées selon une méthode précédemment proposée [4]. Les vitesses de réactions ont été ainsi calculées. Dans le cas particulier de l'acétaldéhyde, les pertes dues à l'entraînement par aération, ont été prises en compte. Ces pertes ont pu être comptabilisées grâce à des corrélations préalablement établies pour différentes conditions de culture [5].

Les figures 1 et 2 montrent l'évolution de la biomasse, l'éthanol, l'acétate et de l'acétaldéhyde en fonction du temps. Ces cultures présentent deux phases; l'acétaldéhyde s'accumule dans un premier temps, puis disparaît progressivement dans un deuxième temps, cette phase est caractérisée par un rapport éthanol/acétaldéhyde constant. Ce phénomène traduit la réversibilité de l'action de l'alcool-déshydrogénase, première enzyme intervenant dans l'assimilation de l'éthanol. Au cours de la première phase, l'acétaldéhyde va s'accumuler jusqu'à l'obtention d'un rapport d'équilibre avec l'éthanol qui sera maintenu tout au long de la culture. Toutefois, ces deux cultures se distinguent entre elles par les quantités produites et le profil d'évolution de l'acétate. Pour la fermentation réalisée avec une biomasse initiale faible (A), l'acétate est constamment produit et suit, presque, l'évolution de la biomasse. Par contre, lorsque la biomasse initiale est élevée (culture B), on observe une première accumulation de l'acétate qui correspond parfaitement à celle de l'acétaldéhyde. Après une réassimilation rapide, l'acétate est produit de nouveau. L'analyse détaillée des relations métaboliques entre ces différents phénomènes est proposée dans un travail ultérieur (régulation métabolique).

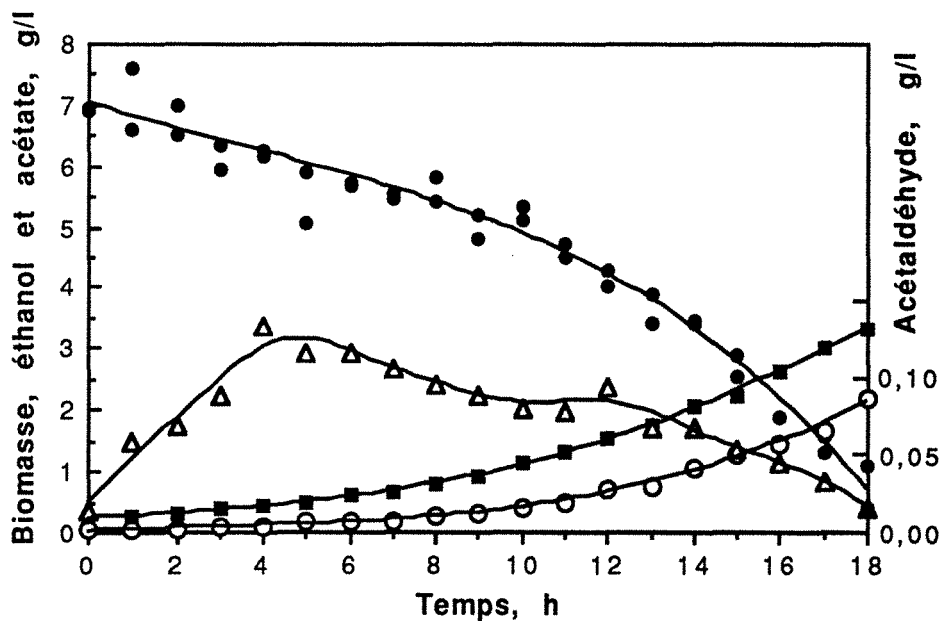


Figure 1 : Evolution des concentration en biomasse (■), éthanol (●), acétate (○) et en acétaldéhyde (△), en fonction du temps. Culture (A) à biomasse initiale faible (0,3 g/l).

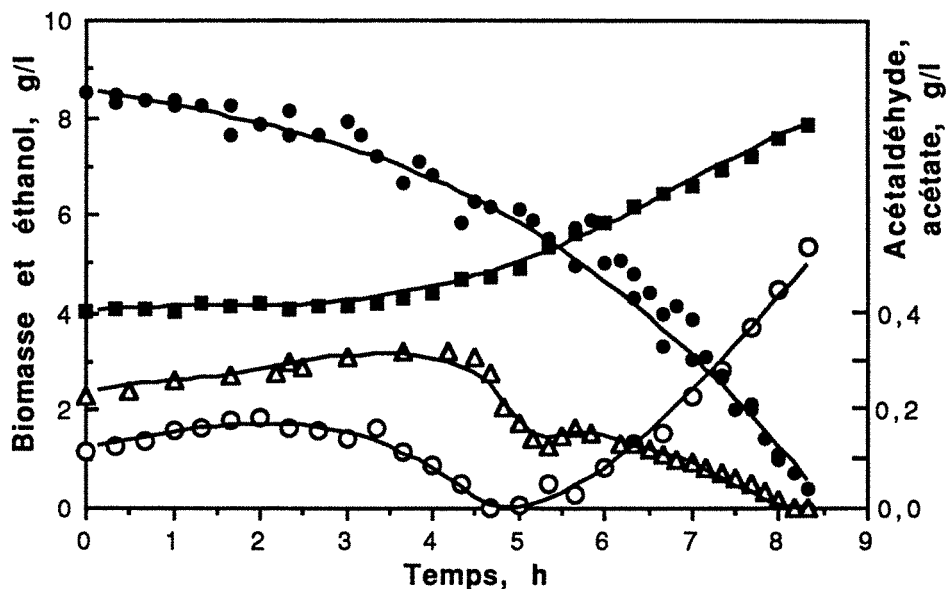


Figure 2 : Evolution des concentrations en biomasse (■), éthanol (●), acétate (○) et en acétaldéhyde (Δ), en fonction du temps. Culture (B) à biomasse initiale élevée (4 g/l).

Les vitesses spécifiques de production ou de consommation q_E , q_{Ac} , q_{Ad} et μ , respectivement, de l'éthanol, de l'acétate, de l'acétaldéhyde et de biomasse, sont obtenues après division des R_i , respectifs, par la concentration de biomasse correspondante. L'évolution des différentes vitesses spécifiques, au cours de la culture, est montrée dans les figures 3,4,5 et 6. A noter que la vitesse spécifique de l'acétaldéhyde, q_{Ad} , est une vitesse réelle obtenue en tenant compte de l'entraînement par aération. Son évolution, au cours des deux expériences, confirme la présence des deux phases, observées d'après les profils de concentration. On constate que lorsque la croissance est lente, en début de culture, le flux d'éthanol est essentiellement converti en acétaldéhyde et en acétate. Alors que pendant la deuxième phase, il n'y a pas une réelle consommation d'acétaldéhyde.

Les vitesses de consommation d'oxygène, de production du CO_2 et le quotient respiratoire, obtenues à partir de bilans de matière théoriques, ont été comparées aux résultats expérimentaux. La figure 7a montre un très bon accord entre les mesures et les valeurs estimées à partir du calcul de vitesse. Le QR diminue lentement de 0.6 à 0.4 pour les deux cultures. La figure 7b montre une fluctuation ponctuelle de OUR, de CPR et de QR estimés lorsque l'acétate s'accumule de nouveau dans le milieu. Cette fluctuation est à peine décelable sur les mesures directes puisqu'elles sont bruitées.

Finalement, la concordance et la précision des résultats obtenus permettent de valider l'approche proposée, d'une part, au niveau de la discription globale du processus, et d'autre part, au niveau des hypothèses consistant à négliger toute accumulation intracellulaire.

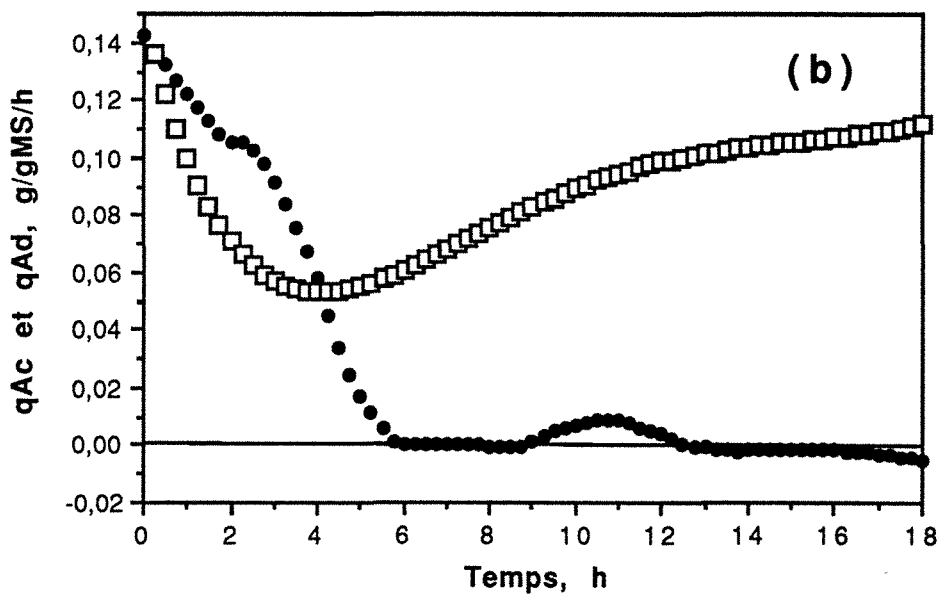
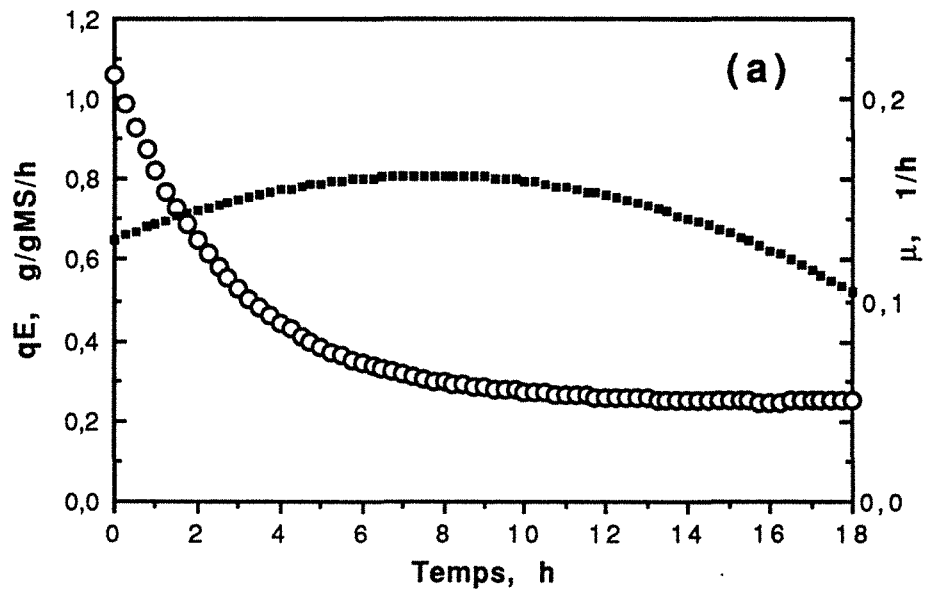


Figure 3 : Evolution des vitesses spécifiques au cours d'une culture sur éthanol à biomasse initiale faible (0,3 g/l): (a) utilisation de l'éthanol (○) et croissance (■), (b) production d'acétate (□) et d'acétaldéhyde (●).

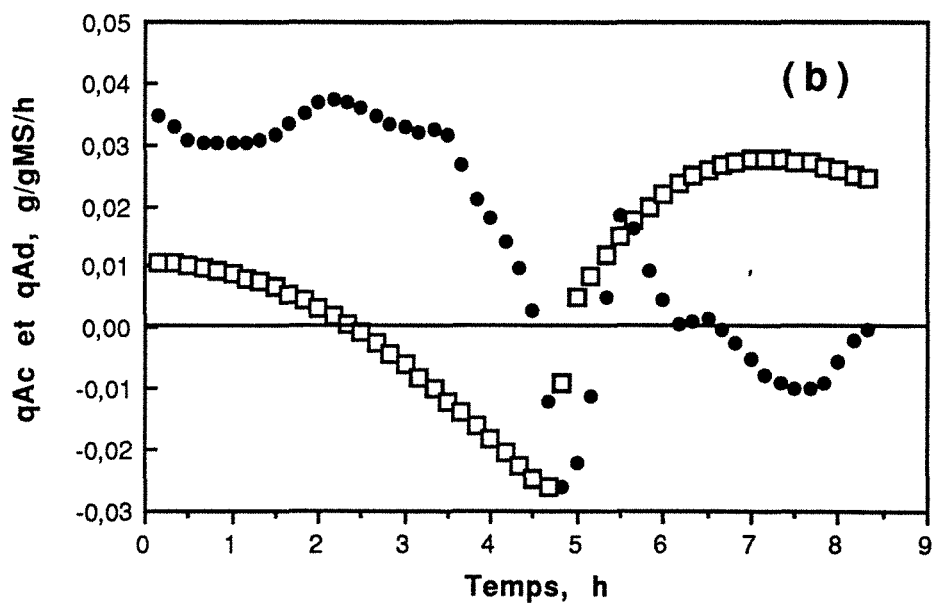
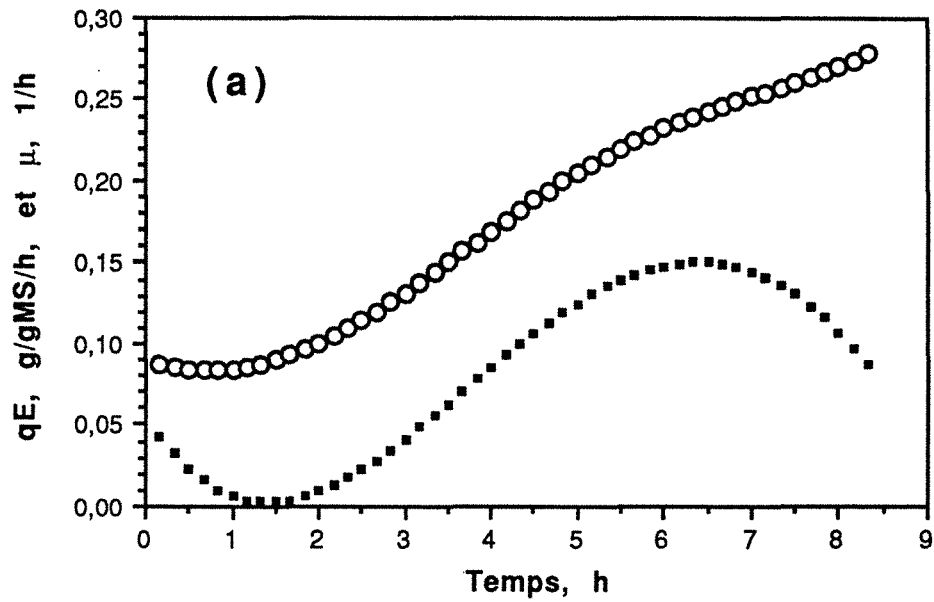


Figure 4 : Evolution des vitesses spécifiques au cours d'une culture sur éthanol à biomasse initiale élevée (4 g/l) : (a) utilisation de l'éthanol (○) et croissance (■), (b) production d'acétate (□) et d'acétaldéhyde (●).

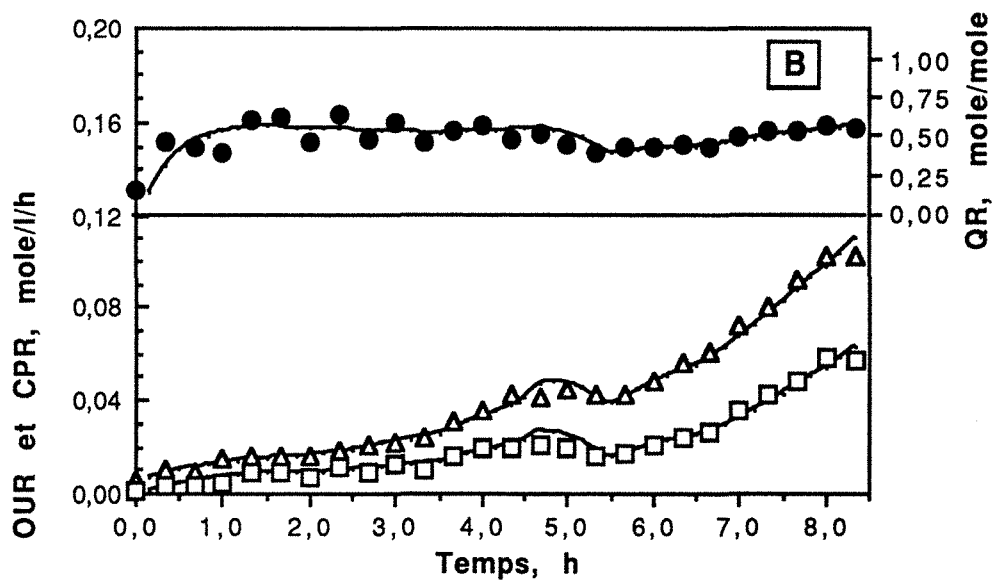
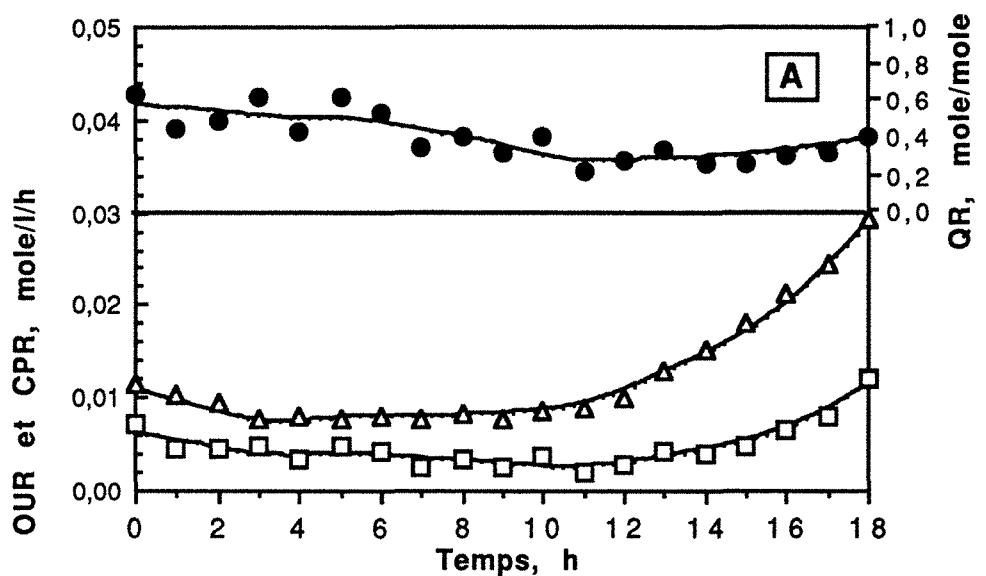


Figure 5 : Evolution en fonction du temps de OUR (Δ), de CPR (\square) et de QR (\bullet) mesurés, comparés aux valeurs estimées (traits) à partir des bilans de matière.

A : culture à biomasse initiale faible (0,3 g/l).

B : culture à biomasse initiale élevée (4 g/l).

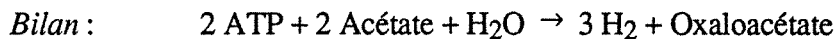
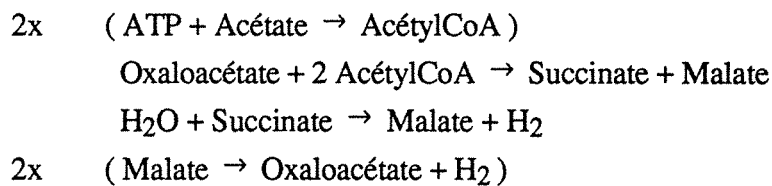
IV. FLUX DE CARBONE ET ENERGIE CELLULAIRE :

IV.1. Gluconéogénèse et précurseur de la biomasse :

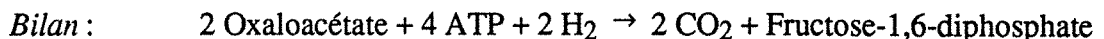
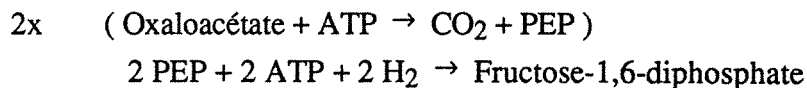
Il est bien connu que la levure de boulangerie est capable d'utiliser plusieurs sources de carbone autres que les sucres. En effet, ce micro-organisme possède deux enzymes clés, lui permettant la synthèse de différents oses cellulaires nécessaires à la croissance à partir de nombreuses molécules non-osidiques (acides aminés, acides organiques et lipides, aldéhydes et alcools...). Ces deux enzymes sont la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPck) et la fructose-1,6-diphosphatase (FbPase). La PEPck décarboxyle l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate et consomme une mole d'ATP, la FbPase transforme le fructose-1,6-diphosphate en fructose-6-phosphate. Ces deux enzymes sont inductibles et caractérisent la gluconéogénèse qui se met en place lorsque la levure croît sur un substrat non-glycolytique. En particulier, lorsque *S. cerevisiae* est cultivée sur éthanol, la gluconéogénèse est alimentée par l'oxaloacétate provenant de la transformation de l'acétate (AcétylCoA) par le cycle du glyoxylate.

Dans le but d'estimer le surcoût énergétique dû à la gluconéogénèse, les besoins en ATP et en acétate ont été calculés à partir de différents bilans sur les voies empruntées par l'acétate jusqu'à la synthèse d'une mole de biomasse.

Cycle du glyoxylate : Biosynthèse de l'oxaloacétate à partir de l'acétate.



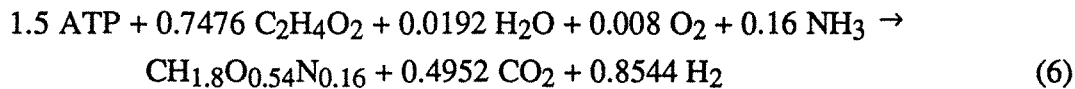
Gluconéogénèse : Biosynthèse du Fructose-1,6-diphosphate à partir de l'oxaloacétate.



En combinant ces deux derniers bilans, la biosynthèse du fructose-1,6-diphosphate à partir de l'acétate peut être résumée par la réaction suivante :



Dès lors, la réaction de biosynthèse de la biomasse à partir du glucose[6] peut être utilisée en substituant le glucose par le fructose. Ce dernier est, également, remplacé par l'acétate en respectant l'équation d'équivalence (5). Finalement, la réaction de synthèse de la biomasse à partir de l'acétate peut être décrite par :



Cette formulation (6) est comparable à la proposition de Oura [7] quand le précurseur est l'éthanol. Cependant, cette nouvelle représentation a l'avantage d'introduire un substrat de référence (le glucose), d'une part, et de ramener l'étude de la croissance de la levure sur les métabolites issus de la fermentation du glucose (acétate, acétaldéhyde et éthanol) à un seul composé standard qui est l'acétate.

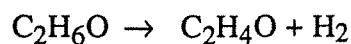
IV.2. Flux de carbone et bilan sur les molécules énergétiques :

Le modèle proposé résume la croissance de *S. cerevisiae* sur éthanol en cinq réactions. Chacune de ces réactions représente le bilan de transformation propre à une voie métabolique déterminée active au cours du processus de croissance :

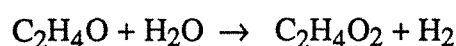
(T1) : La réaction, r_1 , de synthèse de la biomasse à partir de l'acétate :

Cette réaction est donnée par le bilan (6) qui résume, d'une manière non-structurée, les besoins en carbone et en ATP nécessaire à la synthèse d'une mole de biomasse (26.7 g).

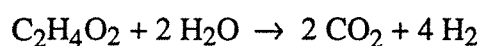
(T2) : La conversion, r_2 , de l'éthanol en acétaldéhyde :



(T3) : La conversion, r_3 , de l'acétaldéhyde en acétate :

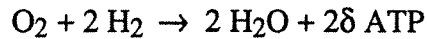


(T4) : L'oxydation, r_4 , de l'acide acétique :



Cette réaction ne fait pas apparaître d'ATP excédentaire puisque la molécule d'ATP consommée par la transformation de l'acétate en acétylCoA est compensée par une molécule de GTP produite par le cycle de Krebs.

(T5) : La phosphorylation oxydative, r_5 :



Des bilans de matière ont été effectués à partir de ces cinq réactions. Les vitesses r_i ($i = 1$ à 5) ont pu être exprimées en fonction de R_x , R_e , R_{ac} et R_{ad} ($R_H = 0$, conformément aux résultats du paragraphe III) :

$$\begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \\ r_5 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1. & 0. & 0. & 0. \\ 0. & 1. & 0. & 0. \\ 0. & 1. & -1. & 0. \\ -0.7476 & 1. & -1. & -1. \\ -1.0680 & 3. & -2.5 & -2. \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R_x \\ R_e \\ R_{ad} \\ R_{ac} \end{bmatrix} \quad (7)$$

Le bilan sur l'ATP, à partir des réactions T1, T2, T3, T4 et T5 conduit à l'expression de R_{ATP} , en mole/l/h, qui représente la variation totale de la concentration d'ATP [6,10] :

$$R_{ATP} = 2\delta r_5 - \frac{r_1}{Y_{max}} - m C_x \quad (8)$$

où : δ : efficacité de la phosphorylation oxydative (P/O), égal à 1.

Y_{max} : rendement net de moles de matière sèche produite par mole d'ATP, égal à $\frac{1}{1.5}$.

m : vitesse spécifique d'hydrolyse d'ATP (maintenance) associée à la croissance, en mole ATP/mole MS/h.

C_x : concentration de la biomasse, en mole MS/l.

En négligeant l'accumulation cellulaire de l'ATP et en remplaçant r_1 et r_5 par leurs expressions respectives données par le système (7), le coefficient de maintenance " m " est déduit :

$$m = 6 q_E - 5 q_{Ad} - 4 q_{Ac} - 3.636 \mu \quad (9)$$

où : q_i : vitesse spécifique molaire de consommation ou de production du composé i , où E , Ad et Ac correspondent respectivement à l'éthanol, l'acétaldéhyde et l'acétate. q_i est exprimé en i mole/mole MS/h.

μ : vitesse spécifique de croissance, en h^{-1} .

IV.3. Résultats : Variation de la maintenance avec la respiration de l'oxygène.

Après le développement théorique précédent, l'analyse et l'estimation de la maintenance cellulaire peuvent être déterminées grâce aux résultats obtenus dans la première partie de ce travail. A partir de la connaissance de q_E , q_{Ad} , q_{AC} et μ , le coefficient de maintenance, m , a pu être calculé selon l'expression (9). La figure 6 montre que la maintenance est, là encore [6], fortement corrélée à l'intensité respiratoire q_{O_2} . Cette même relation a été vérifiée avec d'autres cultures réalisées à des concentrations initiales en éthanol différentes (10 et 18 g/l). Un premier parallèle peut être envisagé entre les cultures aérées sur glucose et sur éthanol, du fait de cette relation linéaire entre la maintenance et la vitesse spécifique d'utilisation d'oxygène. Néanmoins, une différence pertinente est relevée sur le plan quantitatif. En effet, quand la croissance est réalisée sur glucose le rapport $\frac{m}{q_{O_2}}$ est de 4.36 mole d'ATP consommée par mole d'oxygène consommée. Ce même rapport n'est que de 1.82 dans le cas des cultures sur éthanol, c'est-à-dire 2.5 fois plus petit que pour les cultures sur glucose. Malgré cette linéarité apparente entre la maintenance et l'assimilation de l'oxygène, compte tenu de la variation du rapport $\frac{m}{q_{O_2}}$, il est fort probable que d'autres facteurs interviennent sur les dépenses énergétiques de la levure. En l'occurrence, la nature du substrat aurait un rôle important.

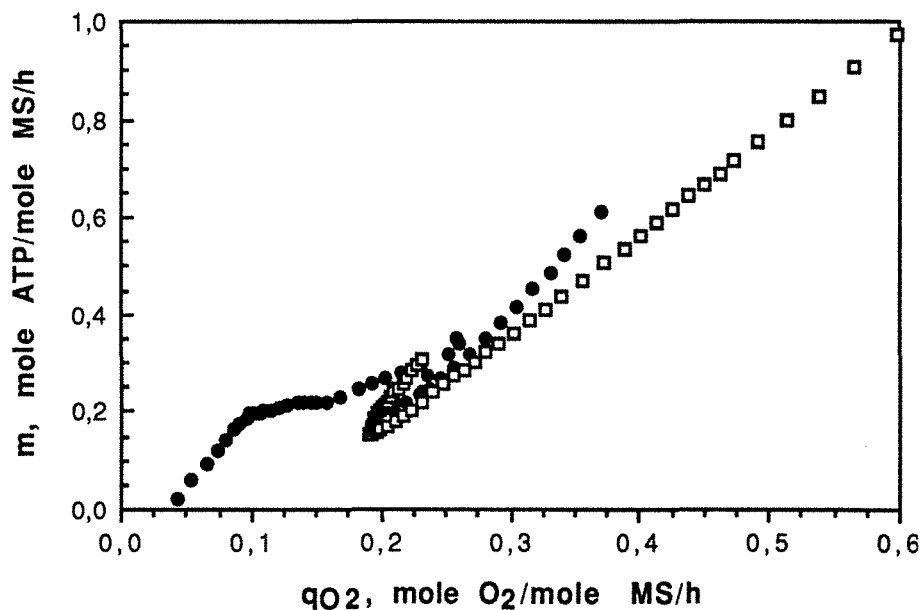


Figure 6 : Evolution de la maintenance en fonction de la vitesse spécifique d'utilisation de l'oxygène. Fermentation A : (\square), Fermentation B : (\bullet).

En effet, la comparaison des expressions de la maintenance sur glucose [6] et sur éthanol montre, sans ambiguïté, que dans le premier cas, l'ATP provient de la glycolyse et de la respiration, d'où un flux de régénération intense. Alors que sur éthanol (acétate ou acétaldéhyde), l'ATP ne provient que de l'activité respiratoire (q_{O_2}).

Par ailleurs, rappelons que cette notion de maintenance est, principalement, la résultante des activités ATPasiques. Ainsi, l'accroissement de la maintenance, au cours d'une culture sur glucose ou éthanol, indiquerait une augmentation de la concentration d'ATP intracellulaire. Cette hypothèse est en accord avec d'autres travaux [3], où il a été observé une accumulation d'ATP dans les cellules de levure.

NOMENCLATURE :

Ac	: concentration en acétate, g/l.
Ad	: concentration en acétaldéhyde, g/l.
CPR, R_c	: vitesse de production de CO_2 , mole/l/h.
Cx, X	: concentration en biomasse sèche, mole MS/l ou en g/l (MS : matière sèche).
E	: concentration en éthanol, g/l.
K_{ATP}	: coefficient global d'utilisation d'ATP, mole ATP/ mole MS.
m	: maintenance cellulaire, mole ATP/mole MS/h.
OUR, R_o	: vitesse d'assimilation de l'oxygène, mole/l/h.
P/O, δ	: efficacité de la phosphorylation oxydative, mole ATP/ atome d'oxygène.
q_{Ac}	: vitesse spécifique de production d'acétate, g/gMS/h.
q_{Ad}	: vitesse spécifique de production d'acétaldéhyde, g/gMS/h.
q_E	: vitesse spécifique de consommation d'éthanol, g/gMS/h.
q_{O_2}	: vitesse spécifique de consommation d'oxygène, g/gMS/h.
QR	: quotient respiratoire, mole CO_2 / mole O_2 .
r_1, r_2, r_3, r_4, r_5	: vitesses de réactions, mole/l/h.
R_{Ac}	: vitesse de production d'acétate, mole/l.h.
R_{Ad}	: vitesse de production d'acétaldéhyde, mole/l.h.
R_{ATP}	: variation globale de l'ATP, mole/l/h.
R_e	: vitesse de consommation d'éthanol, mole/l/h.
R_h	: variation globale d'équivalent réducteur H_2 , mole/l/h.
R_w	: vitesse de production d'eau, mole/l.h.
R_x	: vitesse de production de biomasse, mole MS/l/h.
Y_{max}	: rendement maximum, mole MS/ mole ATP.
α, β, γ	: coefficients stœchiométriques.
μ	: vitesse spécifique de croissance, 1/h

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1- Dekkers, J. G. J., De Kok, H. E., Roels, J. A., "Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 426 : comparison of anaerobic and aerobic glucose limitation", *Biotechnol. Bioeng.*, 23 (1981) 1023-1035.
- 2- Engasser, J.-M., Pons, M.-N., "Biotechnologies des levures", Larpent Ed., J.-P., Masson, Paris (1991) 217-223.
- 3- Krallish, I. L., Damberga, B. E., Beker, M. J., "State of adenosine phosphates during dehydration of yeast", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31 (1989) 194-199.
- 4- Mosrati, R., Fonteix, C., Marc, I., "Validation de mesures et analyse cinétique de bioprocédés par filtrage numérique non-stochastique", (en cours).
- 5- Mosrati, R., Fonteix, C., Marc, I., "Entraînement de l'acétaldéhyde par aération : cinétique et modélisation", (en cours).
- 6- Mosrati, R., Ghoul, M., Fonteix, C., Marc, I., "Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur discontinu aéré (I) : Croissance sur glucose, flux de carbone et énergie cellulaire", (en cours).
- 7- Oura, E., "Reactions leading to the formation of yeast cell material from glucose and ethanol", Alkon Keskus Laboratorio report 8078, Helsinki (1972).
- 8- Roels, J. A., "Energetics and kinetics in biotechnology", Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford (1983).
- 9- Stouthamer, A. H., "A theoretical study on the amount of ATP required for the synthesis of microbial cell material", *Antonie van Leeuwenhoek*, 39 (1973) 537-545
- 10- Gancedo, C., Serrano, R., "Energy-yielding metabolism", Chap VI in "The Yeasts", 2nd edit. by Rosa, A. H., Harrison, J. S., USA Acad. Press Inc., 3 (1989) 220-245.
- 11- Stouthamer, A. H., Verseveld, H. W., "Stoichiometry of microbial growth", *in* *Comprehensive biotechnology*, Pergamon Press Elmsford., 1 (1985) 215-238.

Considérations fonctionnelles du rôle de l'ATP et du NADH pour la modélisation du métabolisme et la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUME :

Les cinétiques de la biomasse, du glucose, de l'éthanol, du pyruvate, de l'acétaldéhyde, de l'acétate, de l'oxygène et du CO₂ ont été étudiées à partir de cultures d'une souche commerciale de *S. cerevisiae*, en réacteur discontinu aéré. En tenant compte de la biochimie de la levure, des relations et des fonctionnalités directes ont été établies entre les couples (NAD⁺/NADH) et (ADP/ATP) et la cinétique des différents composés suivis. Ces résultats suggèrent que la modélisation des cultures de levure, et d'une manière générale de cellules vivantes, devrait intégrer explicitement le rôle des molécules énergétiques en tant que système régulateur de l'activité métabolique du micro-organisme.

I. INTRODUCTION :

La levure de boulangerie est probablement l'un des microorganismes qui a bénéficié des études les plus diverses. Actuellement, sa physiologie et son métabolisme sont relativement bien élucidés. Toutefois, la multitude des modèles mathématiques [3,15,22,24], conçus pour simuler le comportement de cette levure, pose un problème réel de divergences conceptuelles. Bien que globalement performants, ces modèles sont d'une utilisation limitée à un domaine de validité restreint. En outre, les notions de rendements, de limitation respiratoire et d'énergie de maintenance, souvent discutées, sont différemment appréciées, d'où des interprétations fonctionnelles, c'est-à-dire mathématiques, diverses.

La présente contribution est un essai de synthèse, sur la physiologie, et d'étude des interactions multiples au niveau du métabolisme de *S. cerevisiae*. Des cultures discontinues aérées, en milieu glucosé, ont été réalisées. Le rôle des molécules énergétiques (NADH, ATP...) dans la régulation métabolique a été analysé en rapport avec les produits de la bioconversion et leurs cinétiques d'évolution. A l'issue de cette analyse, des associations fonctionnelles seront discutées et proposées comme bases de modélisation de la croissance de levure.

II. MATERIEL ET METHODES :

Les cultures ont été réalisées en réacteur discontinu aéré à différentes concentrations initiales de glucose : 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l et 50 g/l. La composition du milieu de culture ainsi que le matériel et les techniques de dosage ont été détaillées dans un précédent travail [15].

III. RESULTATS ET DISCUSSION :

La culture aérobie de la levure de boulangerie sur milieu glucosé présente classiquement trois phases successives. La levure commence par l'assimilation du glucose conduisant à une croissance cellulaire et à la production d'éthanol. Dès que le glucose est entièrement consommé, la croissance s'arrête transitoirement, puis reprend avec l'assimilation de l'éthanol accumulé pendant la "phase glucose" (figure 1). Tout au long de ce processus, d'autres composés sont excrétés en très faibles quantités, tels le pyruvate, l'acétaldéhyde et l'acétate. La figure 2 montre l'évolution de ces composés au cours de la culture. Différentes observations importantes peuvent être faites concernant ces trois intermédiaires métaboliques quantifiés :

(i) le pyruvate n'est produit que pendant la phase d'assimilation du glucose, à la fin de laquelle il est très rapidement réutilisé,

(ii) l'acétaldéhyde s'accumule au début de la croissance sur glucose, puis disparaît progressivement pendant que la production d'éthanol s'accélère. Une fois le glucose totalement consommé, l'acétaldéhyde se réaccumule de nouveau pendant que l'éthanol commence à être réassimilé lentement. La biomasse est alors en latence diauxique. A la reprise de la croissance sur éthanol, l'acétaldéhyde redisparaît simultanément et parallèlement à l'éthanol,

(iii) en présence de glucose, l'acétate est très peu produit. Pendant la phase de latence diauxique, cet acide s'accumule rapidement, tout comme l'acétaldéhyde, mais disparaît aussitôt.

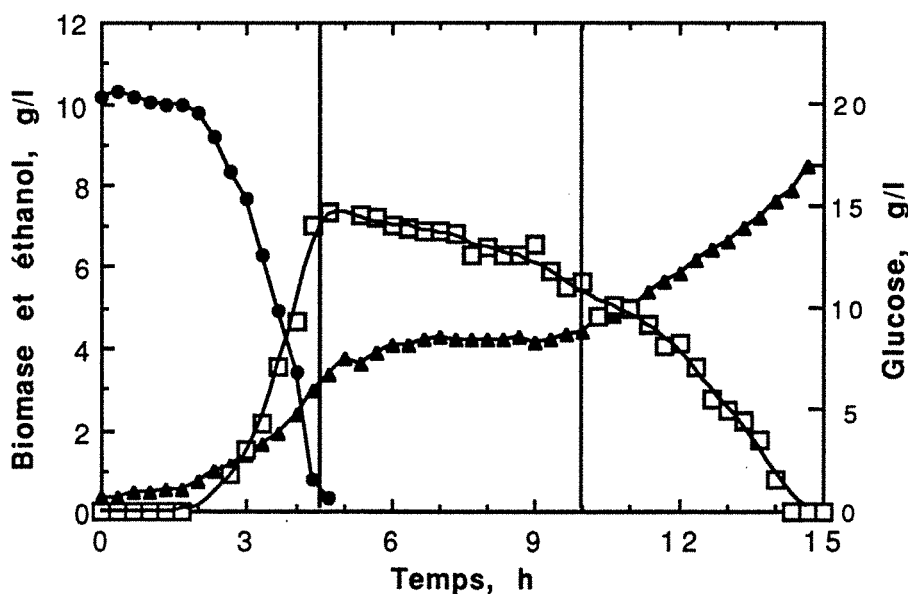


Figure 1 : Evolution de la biomasse (▲) et de l'éthanol (□) au cours d'une conversion aérobie du glucose (●), à 20 g/l initial.

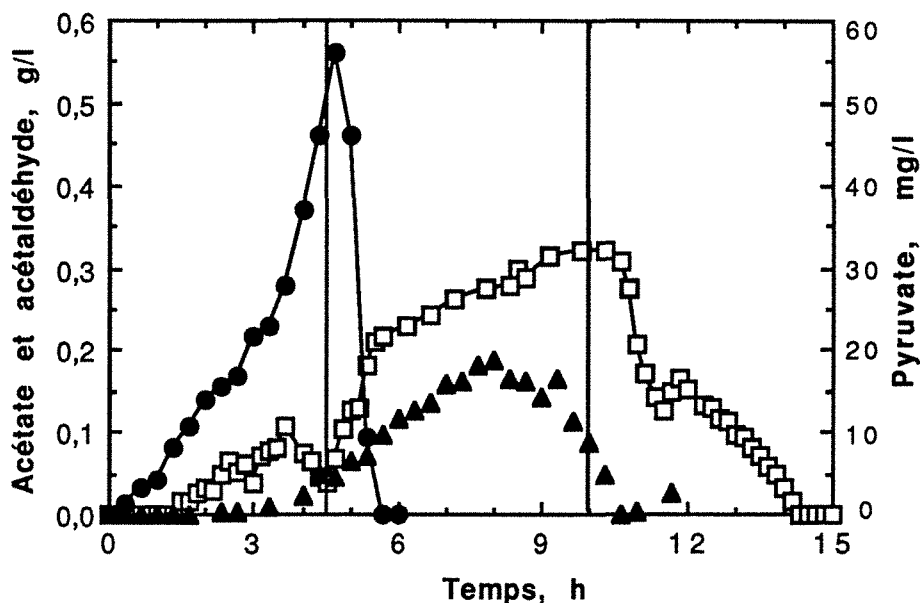


Figure 2 : Evolution du pyruvate (●), de l'acétaldéhyde (□) et de l'acétate (▲) au cours de la production de levure de boulangerie en conditions aérobies sur 20 g/l de glucose initial.

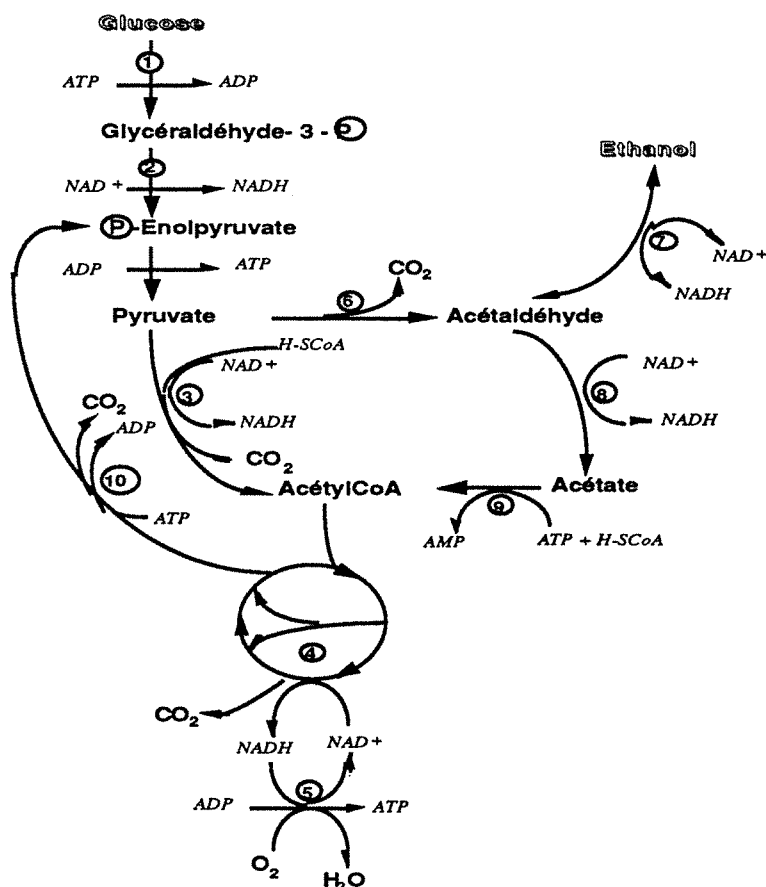


Figure 3 : Schéma synthétique du métabolisme du glucose et de l'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae*.

- [1] Hexokinase et glucokinase, phosphohexose isomérase, phosphofructokinase et aldolase.
- [2] Glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase, phosphoglycérate kinase, phosphoglycérate mutase, émolase, pyruvate kinase.
- [3] Pyruvate déshydrogénase.
- [4] Cycle de Krebs et du glyoxylate.
- [5] Chaîne respiratoire.
- [6] Pyruvate décarboxylase.
- [7] Alcool-déshydrogénase.
- [8] Acétaldéhyde déshydrogénase.
- [9] AcétylCoA synthétase.
- [10] PEP carboxykinase.

Ainsi, l'évolution de ces intermédiaires, au cours d'une culture, peut être révélatrice de phénomènes intracellulaires. L'étude de la cinétique de ces composés doit permettre de mieux comprendre le déroulement de ces processus. A cet effet, l'analyse des relations entre les cinétiques du glucose, du pyruvate, de l'acétaldéhyde, de l'acétate et de l'éthanol, a été réalisée en tenant compte du métabolisme de la levure. Celui-ci est la résultante d'un ensemble de réactions enzymatiques qui sont, le plus souvent, à deux substrats : un composé carboné et un cofacteur (NAD⁺, ATP...). L'ensemble de ces réactions, très connues, est schématisé dans la figure 3. Cette représentation tient compte des principales activités enzymatiques et des étapes nécessitant des cofacteurs cellulaires.

III. 1. Croissance sur glucose :

III. 1.1. Transport et assimilation du glucose :

Le glucose est transporté dans la cellule grâce à des protéines membranaires spécifiques (perméases) constitutives [14]. Deux types de transporteurs ont été identifiés [14,20]. Le premier, à *K_m* faible (1 à 2 mM), est actif en milieu peu concentré en glucose ($\leq 1-2$ g/l), et semble dépendre des activités hexo- et glucokinase [5,14,23]. Le second est caractérisé par un *K_m* élevé (20 à 50 mM). Les travaux de Lang *et al.* [14] suggèrent que ce deuxième transporteur agit par diffusion facilitée et prouve l'existence d'un flux contre-diffusionnel du glucose à travers la membrane cytoplasmique. Selon ces auteurs, en absence d'activité catabolique, le rapport des concentrations entre glucose intra- et extra-cellulaire est de 60%. Cet équilibre serait indépendant des concentrations mises en jeu.

Dans la cellule, une fraction du glucose absorbé est phosphorylée soit par l'hexokinase (*PI* ou *PII*), soit par la glucokinase (*GK*). Cette réaction consomme une mole d'ATP par mole de glucose et elle est rétro-inhibée par le glucose-6-phosphate (G6P), produit de la réaction. Ainsi, en considérant, d'une part, la réversibilité du transport du glucose, et d'autre part, l'étape de phosphorylation intra-cellulaire ATP-dépendante, il semble difficile de représenter, d'une manière satisfaisante, la cinétique apparente d'utilisation du glucose par un simple modèle michaélien [3,15,22,24]. En effet, la figure 4 montre que, pour les quatre cultures réalisées, la vitesse spécifique d'assimilation du glucose ne suit pas une loi de type michaélien. Au début des différentes cultures, le glucose, bien que non-limitant, est assimilé lentement. Son absorption s'accélère avec l'avancement du processus. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'au début des cultures, les cellules ne contiennent pas suffisamment d'ATP pour que l'hexokinase (et la glucokinase) transforme le glucose absorbé en G6P. Le glucose s'accumule, alors, dans les cellules et freine son propre transport à cause de la réversibilité des perméases (équilibre). Cependant, la fraction de glucose métabolisé va contribuer à l'augmentation de l'ATP intracellulaire d'où l'accélération progressive observée d'une manière globale et un aspect d'auto-stimulation du transport et de l'assimilation du glucose. Ce constat va dans le sens des travaux de Fuhrmann et Völker [9].

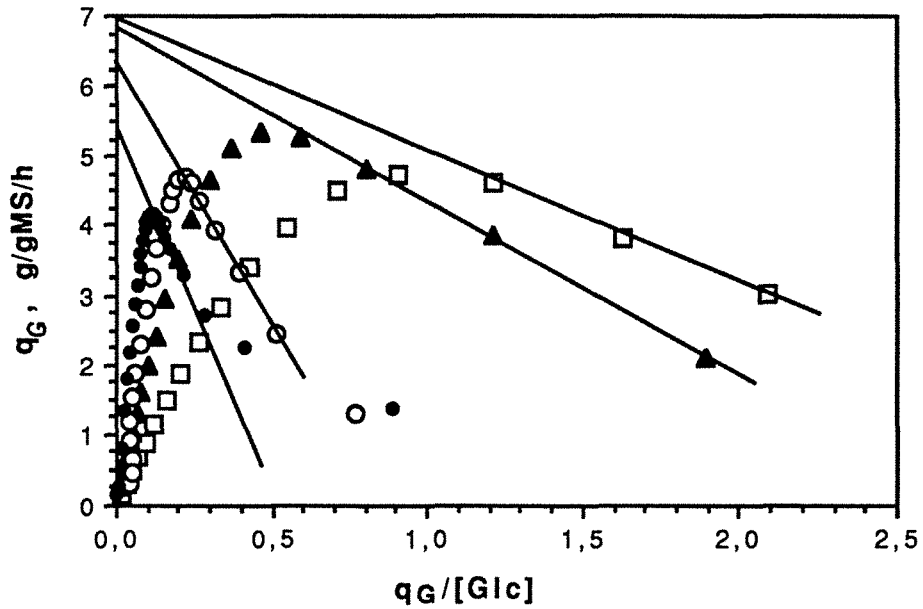


Figure 4 : q_G en fonction de q_G/G selon la représentation de Eadie-Hofstee. q_G : vitesse spécifique d'utilisation du glucose, $[Glc]$: concentration résiduelle de glucose (g/l). Concentrations initiales de glucose : (\square) : 10 g/l, (\blacktriangle) : 20 g/l, (\circ) : 30 g/l et (\bullet) : 50 g/l.

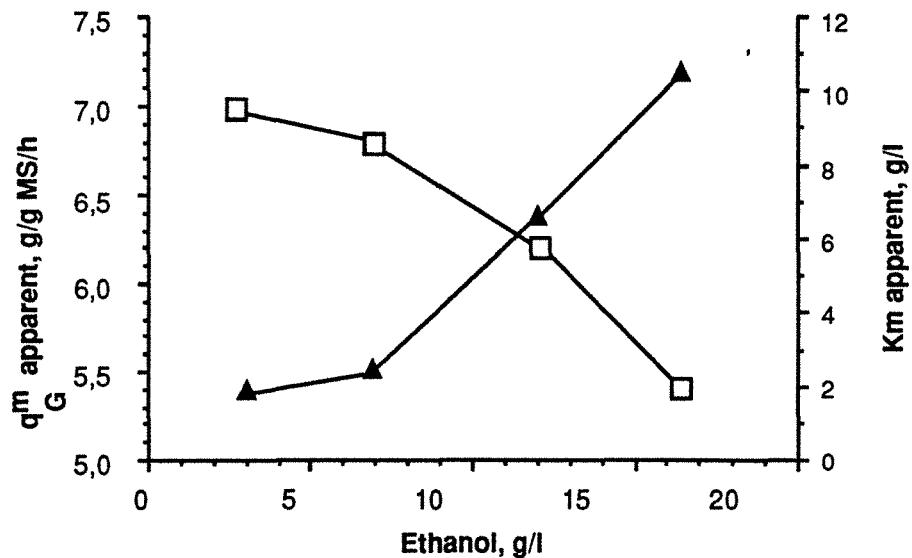


Figure 5 : Influence de l'éthanol extracellulaire accumulé sur les paramètres apparents de la cinétique d'assimilation du glucose.

(\square) : vitesse spécifique maximale, (\blacktriangle) : constante de saturation.

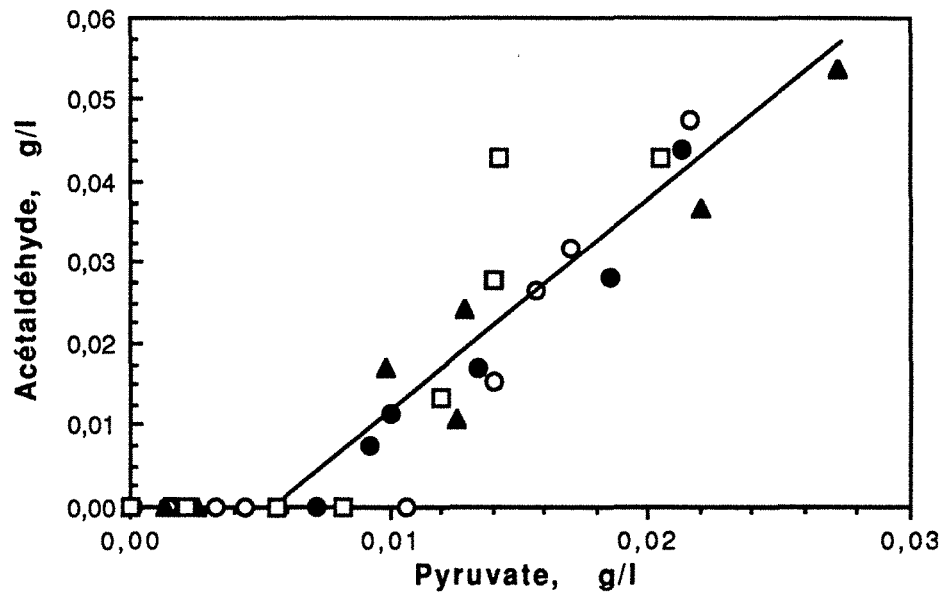
A la fin de la première phase, c'est-à-dire à faible concentration en sucre résiduel, la cinétique d'utilisation du glucose prend des allures michaéliennes, alors l'ATP ne serait plus un facteur limitant. Dans ces conditions, on note que les couples (q_G^m , Km) apparents sont différents. Les vitesses maximales, q_G^m , diminuent et les Km apparents augmentent, avec l'accumulation de l'éthanol (figure 5). L'inhibition de la croissance, ainsi que de l'assimilation du glucose par l'éthanol, est un phénomène bien connu [7,8,13,...]. Plus précisément, l'éthanol inhibe l'hexokinase [18] et donc l'assimilation du glucose, mais aussi l' α -cétoglutarate déshydrogénase, et par conséquent la croissance.

A l'issue de cette analyse, la formulation mathématique de la cinétique du glucose devrait tenir compte d'au moins trois fonctionnalités : les deux premières, à effet stimulateur, attribuées à la concentration du glucose extracellulaire et à l'ATP intracellulaire, la troisième due à l'action inhibitrice de l'éthanol. D'autres effets peuvent être, également, pris en considération tels que l'inhibition de l'hexo- et la glucokinase par le G6P [10] et l'inhibition allostérique de la phosphofructokinase par l'ATP et le citrate [25].

III. 1.2. Production de l'éthanol :

Les produits majeurs de la bioconversion aérobie du glucose sont la biomasse, avec un rendement de 12 à 16% massique, et l'éthanol, avec un rendement de 38 à 46% massique. Par ailleurs, comme l'indique la figure 2, d'autres métabolites sont excrétés en faibles quantités, en particulier, l'acide pyruvique, l'acide acétique et l'acétaldéhyde. La voie fermentaire est caractérisée par une enzyme clé qui est la pyruvate-décarboxylase (PDC). Cette activité est allostérique [6]. Le pyruvate, substrat de l'enzyme, est un effecteur homotropique positif. Par contre, le phosphate libre est un effecteur hétérotropique négatif. Récemment, il a été montré que l'activité PDC, chez les levures Crabtree-positives, est fortement corrélée à la vitesse spécifique de production de l'éthanol [27]. Ainsi, suite à une glycolyse intense, l'accumulation du pyruvate est favorable à la production d'éthanol ; également, l'accumulation d'ATP conduit à une baisse du taux de phosphate intracellulaire d'où la levée de l'inhibition allostérique. Les cultures réalisées pour ce travail montrent clairement le rôle du pyruvate au niveau de l'activation de la voie de l'éthanol (figure 6). Au dessus d'une concentration seuil de 6 mg/l de pyruvate extracellulaire, l'acétaldéhyde -précurseur direct de l'éthanol- est excrété.

Par ailleurs, l'alcool déshydrogénase (ADH) joue également un rôle important dans la voie de l'éthanol. En effet, l'acétaldéhyde (provenant de la décarboxylation du pyruvate) reçoit un équivalent H_2 grâce à une ADH NAD^+ -dépendante (isozyme I) et participe à la régénération des cofacteurs NAD^+ . Ceci signifie que si le taux intracellulaire de $NADH$ n'est pas suffisant, l'acétaldéhyde s'accumulera au détriment de l'éthanol. Ce comportement a été, précisément, observé lors des premières heures de croissance de la levure sur glucose (figure 2). On constate que, malgré l'accumulation du pyruvate et de l'acétaldéhyde, l'éthanol n'est produit qu'après 1 à 1,5 heures de culture. Pendant cette période, le quotient respiratoire augmente progressivement de 1 à 3 (figure 7) traduisant, ainsi, la déviation du métabolisme respiratoire



*Figure 6 : Relation entre l'accumulation du pyruvate et de l'acétaldéhyde pour des bioconversions à différentes concentrations initiales de glucose :
 (●) 10 g/l, (○) 20g/l, (▲) 30g/l, (□) 50g/l.*

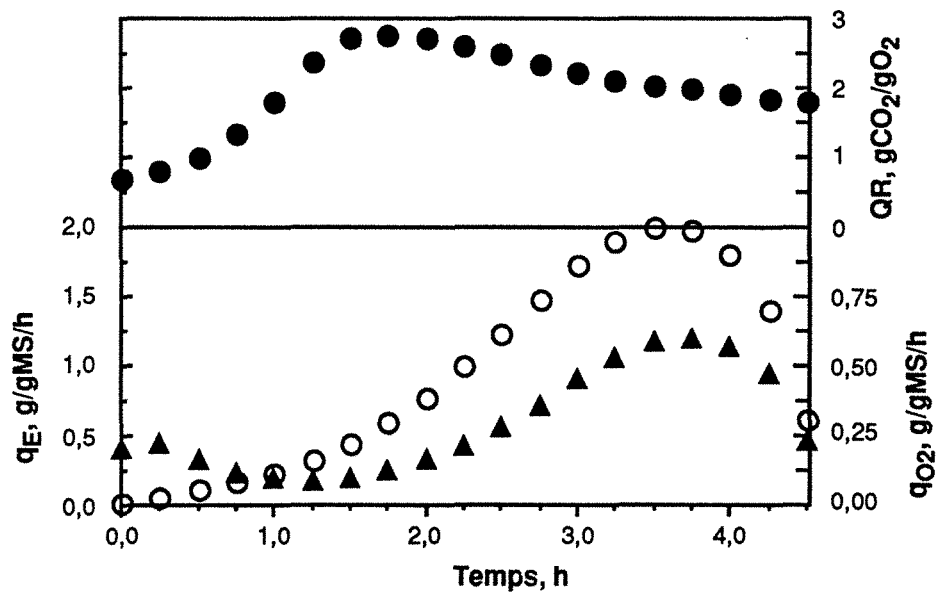


Figure 7 : Evolution des vitesses spécifiques d'utilisation de O_2 (▲), de production d'éthanol (○) et du quotient respiratoire (●) au cours d'une bioconversion à 20 g/l de glucose initial.

vers la voie fermentaire. On peut comprendre que, dans ce cas, il s'agit d'une limitation en NADH de sorte que la respiration suffit à elle seule, dans un premier temps, pour régénérer le NAD⁺ et que lorsque la glycolyse s'intensifie, l'excédent de NADH est pris en charge par l'ADH-I. Cette constatation va dans le sens de l'hypothèse de la limitation de la capacité respiratoire chez cette espèce de levure [24]. Or, l'activité respiratoire, mesurée par la vitesse spécifique d'utilisation de l'oxygène, continue à augmenter tout au long de la bioconversion du glucose indépendamment de la production d'éthanol (figure 7). Par ailleurs, on sait que l'ADH-I et la chaîne de transporteurs d'électrons utilisent le même substrat, le NADH, d'où une compétition s'établissant entre ces deux voies. L'effet de compétition peut être dû à une différence significative entre les propriétés cinétiques (V_m et K_m) des enzymes mises en jeu. Plus précisément, l'ADH et la chaîne de transporteurs d'électrons réagiraient différemment face à une même concentration cellulaire de NADH. D'autre part, le fait que la vitesse d'utilisation de l'oxygène augmente au cours de la fermentation du glucose, mais au même titre que celle de l'éthanol, montre que l'hypothèse d'adaptation de la levure [2] peut se confondre aisément à l'effet d'accumulation de NADH, d'où l'intensification des deux réactions sans qu'il y ait, forcément, une saturation manifeste de la respiration.

Pour résumer, l'ensemble de ce développement, appuyé par les résultats expérimentaux, permet de dégager une synthèse cohérente sur l'activité globale de la voie de l'éthanol en relation avec les conditions de culture et l'état physiologique des cellules. La cinétique de production d'éthanol peut être, alors, représentée par une expression fonctionnelle composée de deux termes stimulateurs dont l'un dépend du pyruvate et l'autre du NADH. Puis compte tenu de la réversibilité de l'ADH-I, un troisième terme peut être intégré pour rendre compte d'un effet inhibiteur de l'éthanol.

III. 1.3. La croissance cellulaire sur glucose :

Le processus de croissance cellulaire est la somme d'un grand nombre de réactions allant de la biosynthèse de monomères jusqu'à leur polymérisation (acides nucléiques, protéines, polysaccharides, lipides,...). De nombreux travaux ont permis de quantifier les besoins en substances carbonées, azotées et en énergie nécessaires à la synthèse de biomasse [10]. Du fait de la diversité des besoins cellulaires, d'une part, et du nombre élevé des réactions intervenant dans la biosynthèse, d'autre part, il est extrêmement difficile, voire impossible, de représenter fidèlement la cinétique de la croissance cellulaire. Néanmoins, dans cette optique de modélisation, des corrélations et lois empiriques ont été proposées [2,11,21]. Dans ce travail, la description de la croissance sera, aussi, développée sur des bases empiriques.

Considérant une culture où le glucose est source de carbone et d'énergie, les précurseurs des constituants cellulaires trouvent leurs origines à différents niveaux de la chaîne catabolique de ce sucre. Les oses proviennent du glucose-6-phosphate, les lipides du glycéraldéhyde et de l'acétylCoA ..., les acides aminés de l'oxaloacétate et de l' α -cétoglutarate,...

Si le glucose sert à la synthèse des autres sucres cellulaires, ce n'est pas le cas pour les acides aminés. Ces derniers proviennent en grande partie du pyruvate qui, en intégrant le cycle de Krebs via l'acétylCoA, va fournir les précurseurs nécessaires. Le rôle du pyruvate est illustré par la figure 8 qui montre que la vitesse spécifique de croissance augmente avec la concentration extracellulaire du pyruvate. Cette vitesse atteint son maximum (0,7 h⁻¹) vers 0,02 g/l de pyruvate, puis décroît lentement. Ce résultat indique que la croissance peut très bien être corrélée au pyruvate selon un modèle du type Monod. Quant à la diminution relative de la croissance, pyruvate > 0,02 g/l, elle peut s'interpréter par une baisse du taux de l'ATP ou/et par une inhibition par l'éthanol accumulé, en fin de culture. Le rôle de l'ATP est évident, c'est la source d'énergie pour les réactions de synthèse et de polymérisation. .

Ainsi, une représentation probable de la cinétique de croissance consiterait à définir deux fonctionnalités, à effets stimilants, pour rendre compte de l'influence du pyruvate et de l'ATP.

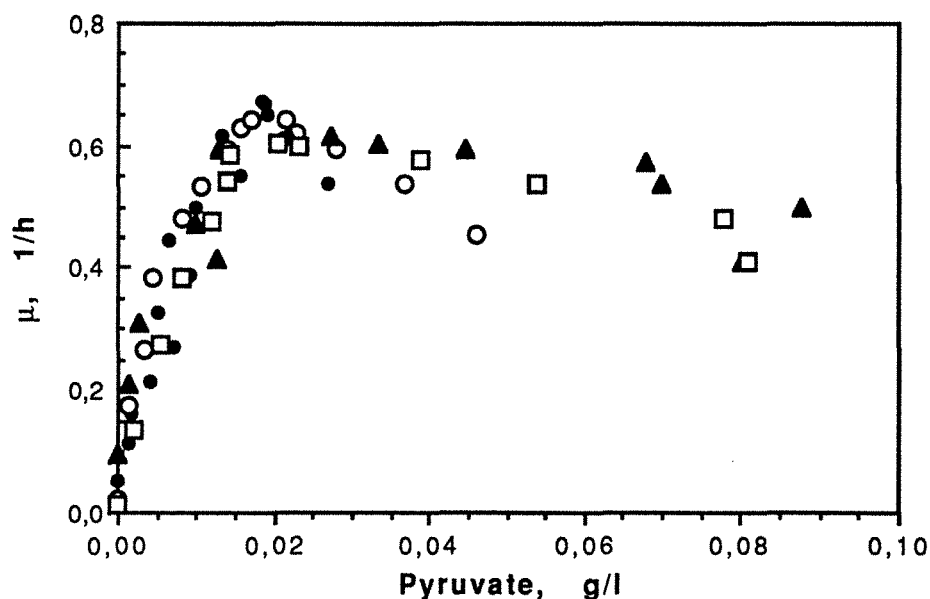


Figure 8 : Relation entre la vitesse spécifique de croissance, μ , et la concentration du pyruvate. Cas de cultures à glucose initial variable : (●) 10 g/l, (○) 20g/l, (▲) 30g/l, (□) 50g/l.

III. 2. Croissance sur éthanol :

Le métabolisme de l'éthanol, chez la levure, peut être décomposé en deux étapes similaires à celles du glucose. La première étape est une suite de réactions intracellulaires conduisant à l'activation de l'éthanol en acétylCoA. La seconde correspond au devenir de l'acétylCoA, c'est-à-dire soit une respiration oxydative totale conduisant à la production de CO₂ et d'ATP, soit la biosynthèse des constituants cellulaires d'où la croissance. Le comportement métabolique de *S. cerevisiae* sur éthanol est discuté en fonction des voies biochimiques connues et des résultats expérimentaux.

III. 2.1. Assimilation de l'éthanol :

Dès que le glucose est totalement consommé, la levure entre dans une phase de latence (adaptation) avant la reprise concrète de croissance sur éthanol (figure 1). Dans cette partie, seule la croissance sur éthanol sera étudiée. Quant au phénomène de latence, il sera étudié à la suite de ce chapitre.

L'éthanol est une molécule de petite taille et son transport, à travers la membrane cytoplasmique, se fait par simple diffusion [1]. Une fois dans la cellule, l'éthanol est transformé en acétaldéhyde grâce à une ADH (isozyme II). Cette réaction s'accompagne de la réduction d'une mole de NAD^+ en NADH. L'ADH-II catalyse cette réaction selon un même mécanisme que celui de l'ADH-I. A la différence génique, la forme II est réprimée en présence du glucose. La déshydrogénation de l'éthanol est une réaction réversible aussi bien par l'ADH-I que par l'ADH-II. La réversibilité de cette réaction conduit forcément à l'existence d'un équilibre qui sera fonction des propriétés cinétiques intrinsèques de la protéine catalyseur, mais aussi des concentrations des produits en question : l'éthanol, l'acétaldéhyde, NAD^+ et NADH. La figure 9 montre la relation d'équilibre entre la concentration de l'éthanol et de l'acétaldéhyde. La valeur de cet équilibre varie d'une fermentation à l'autre, ce qui montre la variation d'un (ou plusieurs) facteur, en l'occurrence le couple NAD^+ -NADH. D'autre part, la figure 10 montre que la cinétique d'assimilation de l'éthanol n'est pas typiquement michaelienne vis-à-vis de l'éthanol lui-même. Le tableau 1 résume l'évolution de V_{me} et de K_{me} , en fin de culture, pour les différentes expériences réalisées.

Le couple NAD^+ -NADH intervient, également, dans l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate. Via l'acétaldéhyde, cette oxydation agit en cascade sur la cinétique de consommation de l'éthanol. C'est-à-dire que si la cinétique d'oxydation de l'acétaldéhyde est rapide, celle de la déshydrogénation de l'éthanol le sera également.

Conditions de culture (glucose initial)	Concentrations initiales sur la phase Ethanol, g/l			Paramètres cinétiques apparents	
	Ethanol	Acétaldéhyde	Biomasse	V_{me} , h ⁻¹	K_{me} , g/l
10 g/l	2.5	0.06	2.4	0.24	0.18
20 g/l	6.0	0.15	4.7	0.41	0.50
30 g/l	8.0	0.32	7.7	0.44	1.33
50 g/l	13.2	0.57	9.1	0.46	3.07

Tableau 1 : Variation des paramètres cinétiques d'assimilation de l'éthanol. V_{me} et K_{me} sont déterminés à partir de la représentation de Eadie-Hofstee (figure 10).

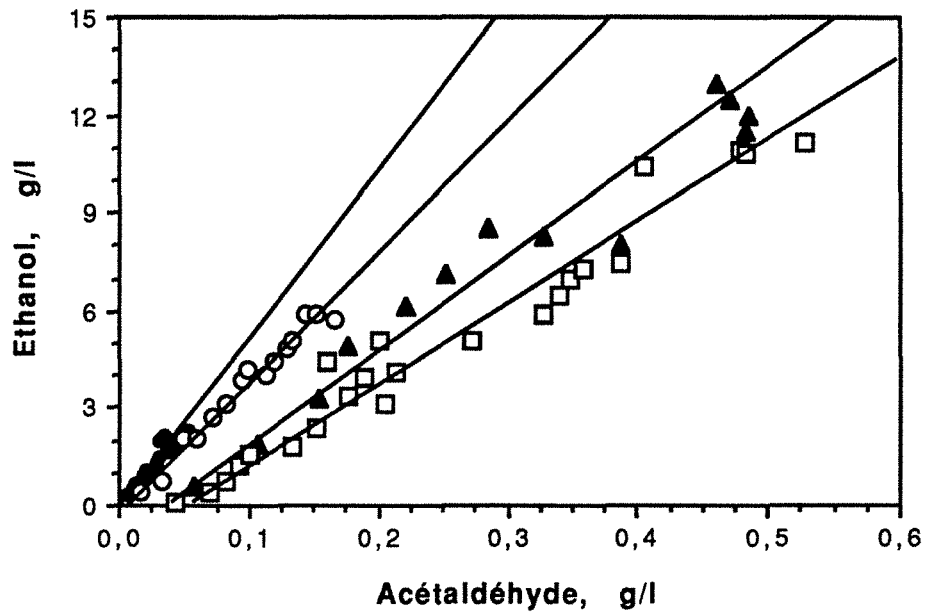


Figure 9 : Mise en évidence d'une relation d'équilibre entre les concentrations extracellulaires d'éthanol et d'acétaldéhyde au cours de la croissance sur éthanol. Glucose initial : (●) 10 g/l, (○) 20g/l, (▲) 30g/l, (□) 50g/l.

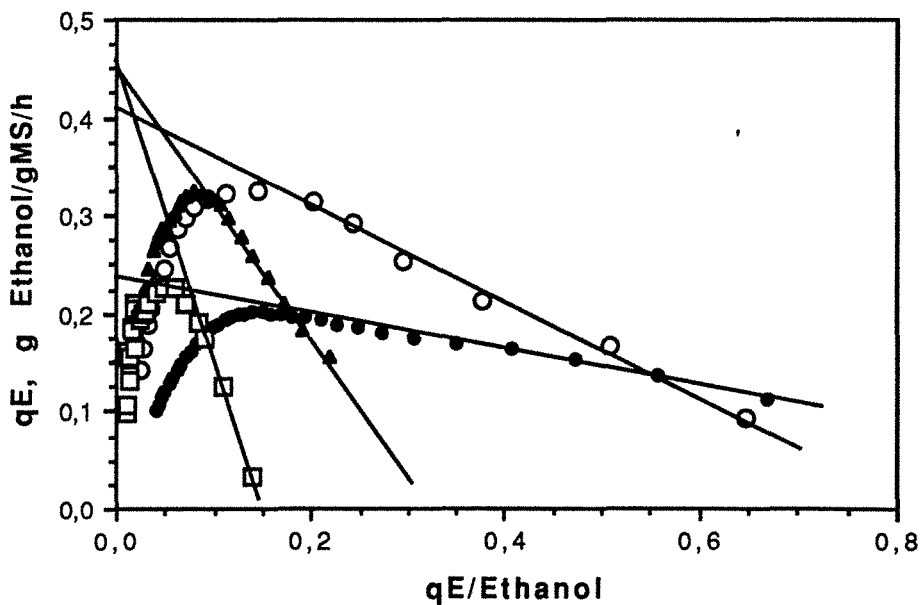


Figure 10 : Evolution de la vitesse d'assimilation de l'éthanol, q_E , en fonction du rapport $q_E/\text{Ethanol}$ selon la représentation de Eadie-Hofstee. Glucose initial : (●) 10 g/l, (○) 20g/l, (▲) 30g/l, (□) 50g/l.

L'étape suivante consiste en la synthèse de l'acétylCoA à partir de l'acétate. Cette réaction est d'une grande importance puisqu'elle consomme de l'énergie, soit une mole d'ATP par mole d'acétylCoA synthétisée. D'autre part, l'acétylCoA-synthétase est rétroinhibée par son propre produit, l'acétylCoA. Par conséquent, l'accumulation de l'acétylCoA ralentira sa propre synthèse et l'excédent d'acétate sera excrété dans le milieu extracellulaire (figure 2). Etant donné cet auto-contrôle de l'acétylCoA, son effet se répercutera, d'une part, sur la régénération des NAD^+ par la chaîne respiratoire et, donc, sur l'assimilation de l'éthanol, et, d'autre part, sur la croissance cellulaire qui dépend directement de l'acétylCoA comme précurseur et indirectement de la respiration, unique producteur d'ATP.

Cette description montre clairement, à travers les différents niveaux de régulation, l'importance et, plus précisément, le rôle des systèmes ATP-ADP et NAD^+ -NADH dans le métabolisme de l'éthanol. De même, ces mécanismes expliquent l'apparition et l'évolution des intermédiaires tels l'acétate et l'acétaldéhyde. Il ressort que la cinétique d'assimilation de l'éthanol ne peut être représentée simplement sans prendre en compte l'évolution des concentrations d'acétaldéhyde, du NAD^+ -NADH et, selon le besoin, l'influence de l'acétate et de l'ATP.

III. 2.3. La croissance cellulaire sur éthanol :

La croissance sur éthanol est caractérisée par sa lenteur (figure 11). La figure 12 permet de comparer les rendements instantanés Y_{X/O_2} sur glucose et sur éthanol, représentant la demande en oxygène. Sur éthanol, Y_{X/O_2} est évidemment très inférieur à celui sur glucose. La faible vitesse de consommation de l'éthanol conduit à une faible production de NADH et par la même occasion à une respiration lente, d'où un faible flux de production d'ATP et la limitation de la croissance.

Un autre aspect, typique de la croissance sur éthanol, est la gluconéogenèse. Cette voie biochimique est vitale pour la levure car elle lui permet de synthétiser un grand nombre de métabolites contenant plus de 2 atomes de carbone par molécule à partir de l'acétate (en C_2). C'est un processus qui consomme beaucoup d'ATP, d'où le surcoût énergétique par rapport à la glycolyse qui non seulement fournit ces intermédiaires par dégradation du glucose mais produit de l'ATP. Le besoin en ATP, pour la gluconéogenèse, a été quantifié dans un précédent travail [17].

Dès lors, la cinétique de croissance peut être formulée comme étant le produit de deux facteurs stimulants, le premier est l'acétate, par image interposée à l'acétylCoA, le second est l'ATP ayant un rôle énergétique.

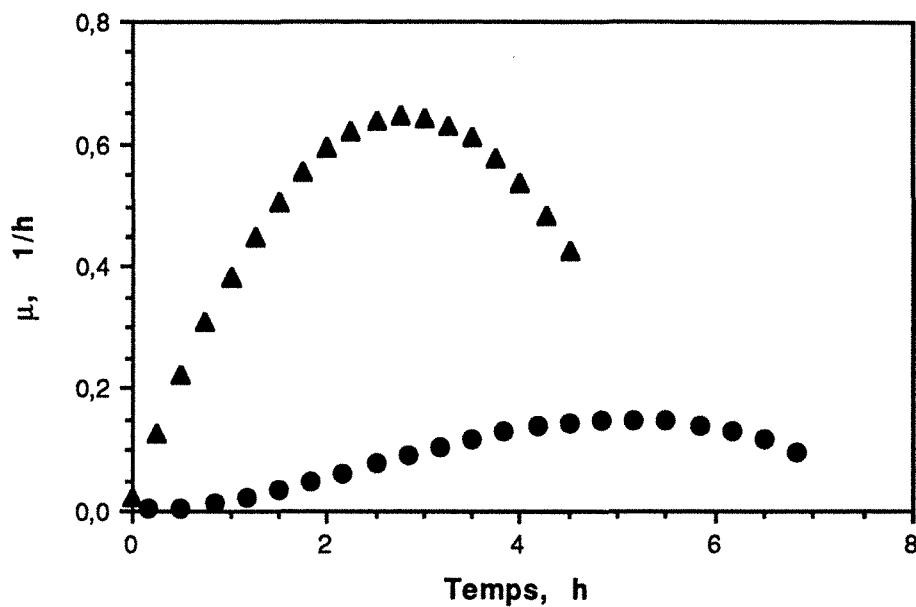


Figure 11 : Comparaison des vitesses spécifiques de croissance sur glucose (▲) et sur éthanol (●). Cas d'une culture réalisée à 20 g/l de glucose initial.

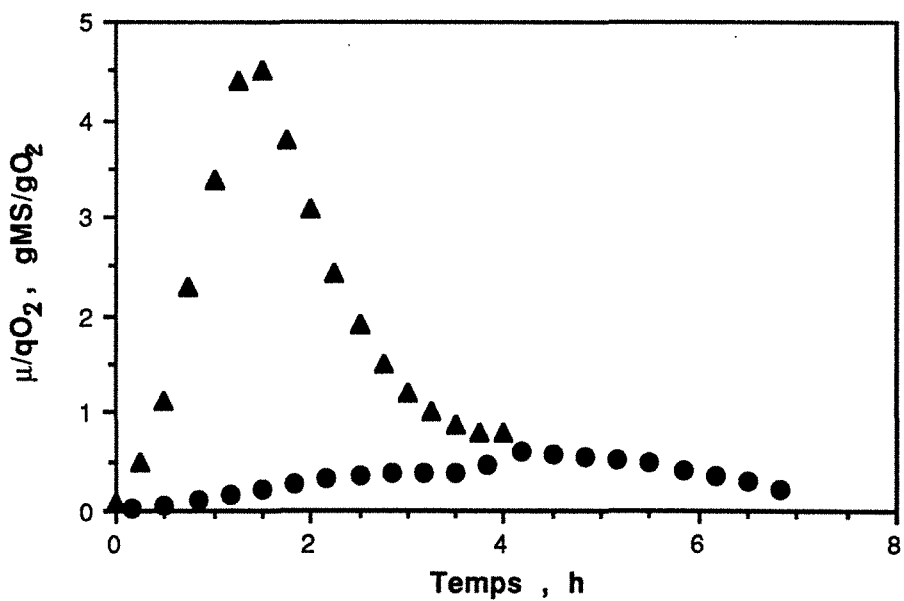


Figure 12 : Comparaison des rendements instantanés Y_{X/O_2} (μ/q_{O_2}) sur glucose (▲) et sur éthanol (●). Cas d'une culture réalisée à 20 g/l de glucose initial.

III. 3. Réponse de la levure au changement de substrats :

Généralement, les micro-organismes sont capables d'adapter leur métabolisme à la source de carbone et d'énergie disponible dans leur environnement. Cette adaptation est, principalement, le produit de divers mécanismes qui contrôlent l'expression du génôme. Contrairement à la régulation de l'intensité d'une voie métabolique qui s'opère par des mécanismes d'inhibition ou d'activation, le changement métabolique implique la substitution d'une batterie d'enzymes par une autre. Ces modifications profondes de la composition enzymatique d'un micro-organisme surviennent comme une réponse à des variations importantes dans les propriétés physico-chimiques du milieu réactionnel.

Chez la levure *S. cerevisiae*, le passage du métabolisme du glucose à celui de l'éthanol se manifeste par un arrêt transitoire de la croissance cellulaire (figure 1). Des dosages d'activités enzymatiques [4,12,21] ont montré que pendant cette phase les enzymes du cycle glyoxylique et de la gluconéogenèse sont déréprimées. Sans croissance apparente, ces activités augmentent progressivement jusqu'à des taux normaux qui, une fois atteints, rétablissent la croissance et la multiplication cellulaire. Parallèlement à ce processus d'adaptation, l'éthanol commence déjà à être assimilé. Son absorption débute pendant la disparition du pyruvate et s'accompagne d'une accumulation d'acétaldéhyde et d'acétate (figure 2). Ceci montre que l'ADH-II et l'acétaldéhyde déshydrogénase ont une réponse rapide vis-à-vis de la dérépression en l'absence du glucose. Ainsi, pendant cette phase de latence, la levure ne croît pas mais reste en activité métabolique pour assurer l'apport d'énergie et de matière nécessaires à sa restructuration. L'analyse quantitative de ce phénomène a suscité la dissociation du métabolisme de la croissance. La cinétique de transition métabolique a fait l'objet de quelques travaux visant à modéliser la phase de latence [19,26]. Basés sur les mécanismes de répression, ces modèles décrivent relativement bien la latence, mais ne tiennent pas compte du métabolisme de l'éthanol source de carbone et énergie, et à l'origine de l'accumulation de l'acétaldéhyde et de l'acétate.

Afin de mieux comprendre la latence chez *S. cerevisiae*, ce phénomène a été étudié sur plusieurs cultures discontinues. Ces cultures ont été réalisées à différentes concentrations initiales de glucose 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l et 50 g/l. L'évolution de la biomasse, de l'éthanol, de l'acétate et de l'acétaldéhyde sont présentées dans la figure 13. La culture à 20 g/l de glucose initial est illustrée dans les figures 1 et 2. Ces expériences montrent des caractéristiques constantes de la phase de latence : (i) arrêt de la croissance, (ii) accumulation de l'acétaldéhyde, (iii) accumulation de l'acétate. L'excrétion de ces deux métabolites correspond à une assimilation rapide d'éthanol (1 à 1,4 g/gMS/h) qui diminue progressivement jusqu'à la reprise de la croissance (0,3 à 0,5 g/gMS/h) [17]. On constate, également, que la durée de la phase de latence augmente avec la concentration initiale de glucose, avec l'éthanol accumulé, ainsi qu'avec la biomasse (figure 14 : a, b et c). Cette observation est en contradiction avec les hypothèses et modèles actuels représentatifs de la phase de latence. Sweere *et al* [26] postulent

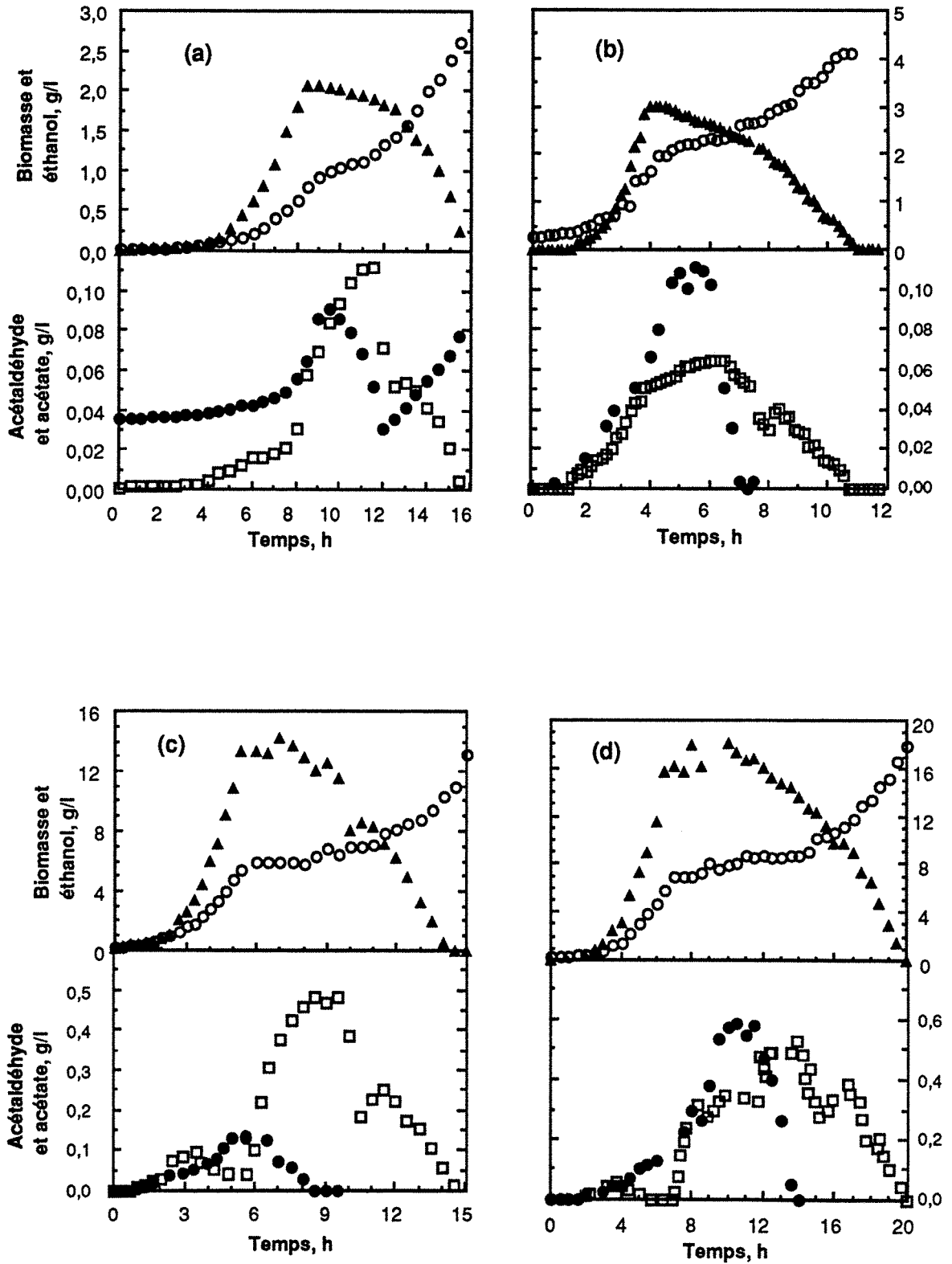


Figure 13 : Evolution de la biomasse (○), de l'éthanol (▲), de l'acétate (●) et de l'acétaldéhyde (□), au cours de la transition métabolique de l'assimilation du glucose à l'assimilation de l'éthanol. Cas de cultures discontinues à différentes concentrations initiales de glucose :
 (a) 5 g/l, (b) 10 g/l, (c) 30 g/l, (d) 50 g/l.

que la cinétique de la transition métabolique est activée par l'éthanol et l'oxygène selon un modèle de Monod, et qu'elle est inhibée par le glucose. Ce modèle qui rend compte, qualitativement, du rôle de ces composés dans l'induction de la croissance sur éthanol, est insuffisant pour évaluer quantitativement cette cinétique. En effet, selon ce modèle, des concentrations en éthanol élevées devraient accélérer l'induction de la croissance d'où une courte latence. Ceci est contradictoire avec les phénomènes cinétiques classiquement observés (figure 14b).

Bien qu'il n'y ait aucun doute sur l'induction par l'éthanol et la répression par le glucose, il est clair que la cinétique de transition dépendrait, aussi, d'autres facteurs. En effet, la figure 14c permet de constater que la durée de la latence augmente avec la quantité de biomasse produite pendant la croissance à partir de glucose. Plus précisément, cette phase peut être corrélée à l'âge de la biomasse produite sur glucose. La figure 15a montre que la latence augmente avec le nombre de divisions cellulaires N_g . A titre d'exemple, ce résultat permettrait de prédire la durée de la latence selon une expression du type :

$$L = L^m \frac{2^{N_g} - 1}{K + 2^{N_g}}$$

où

{	N_g	: Nombre de dédoublement de la population, $N_g = \frac{\ln(X/X_0)}{\ln 2}$,
	L^m	: Latence maximale, égal à 12 heures,
	K	: constante homogène à 2^{N_g} , égale à 24.

Cette corrélation empirique représente, d'une manière satisfaisante, les résultats expérimentaux (figure 15a et 15b). Par ailleurs, elle introduit l'effet du facteur de dilution des enzymes de la gluconéogenèse au cours de la multiplication cellulaire sur glucose. En effet, les précultures utilisées pour ces expériences ont toutes été rigoureusement préparées dans les mêmes conditions avec un milieu glucosé. Le réacteur a toujours étéensemencé lorsque la biomasse de la préculture commençait à utiliser l'éthanol accumulé. Ainsi, la biomasse injectée dans le réacteur aurait déjà un taux initial T_0 d'enzymes de la voie d'éthanol, c'est le taux de base nécessaire à induire une croissance sur éthanol. Dans le réacteur, le glucose réprime l'expression des gènes correspondant à ces activités ; puis, suite à la multiplication cellulaire sur glucose, le taux de ces enzymes va se trouver dilué dans les cellules filles de manière à ce qu'à la $n^{\text{ème}}$ génération ce taux d'enzyme devienne $T_n = T_0 / n$. Enfin, dès que le glucose est entièrement utilisé, les cellules vont reconstituer leurs potentiels enzymatiques de manière à ce qu'elles redisposent, de nouveau, du taux de base T_0 . La durée de latence augmente alors avec l'écart $T_0 - T_n$. Ainsi, une culture prolongée sur glucose conduirait à un lessivage total de ces enzymes et l'écart $T_0 - T_n$ deviendrait simplement égal à T_0 , d'où une durée de latence maximale L^m .

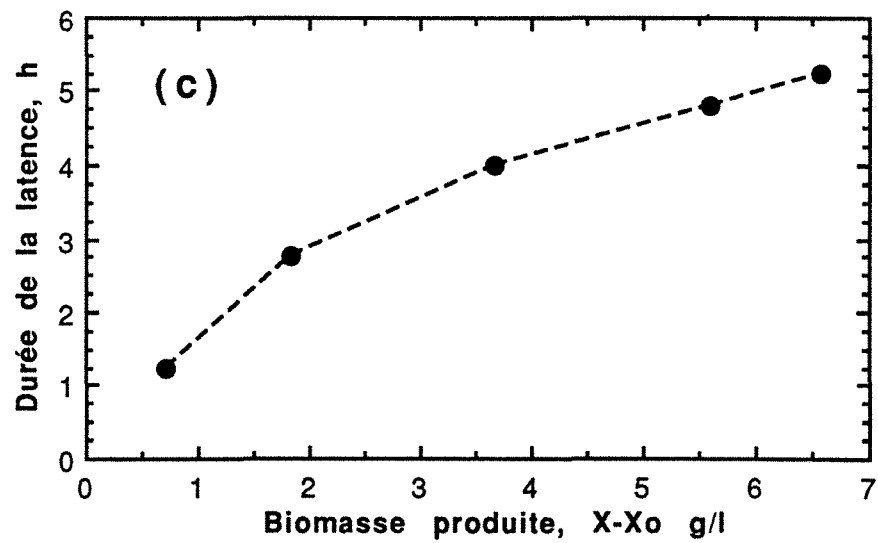
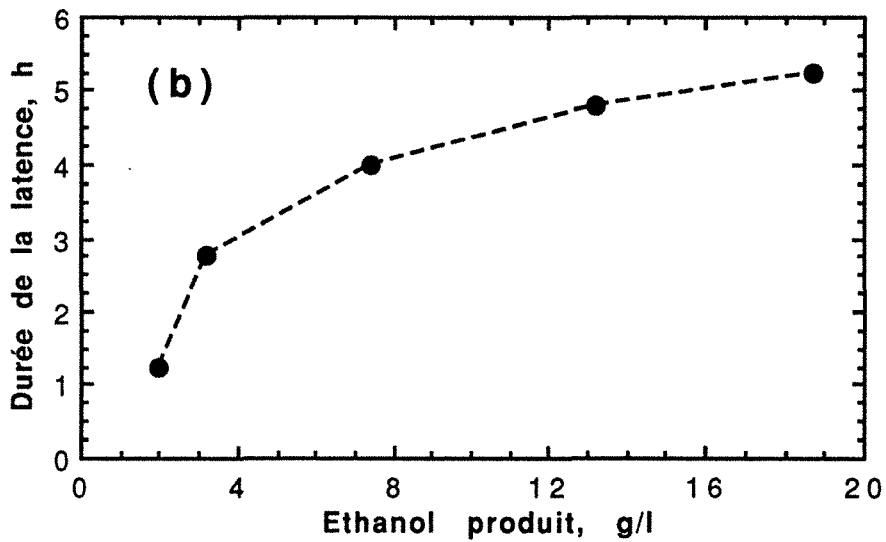
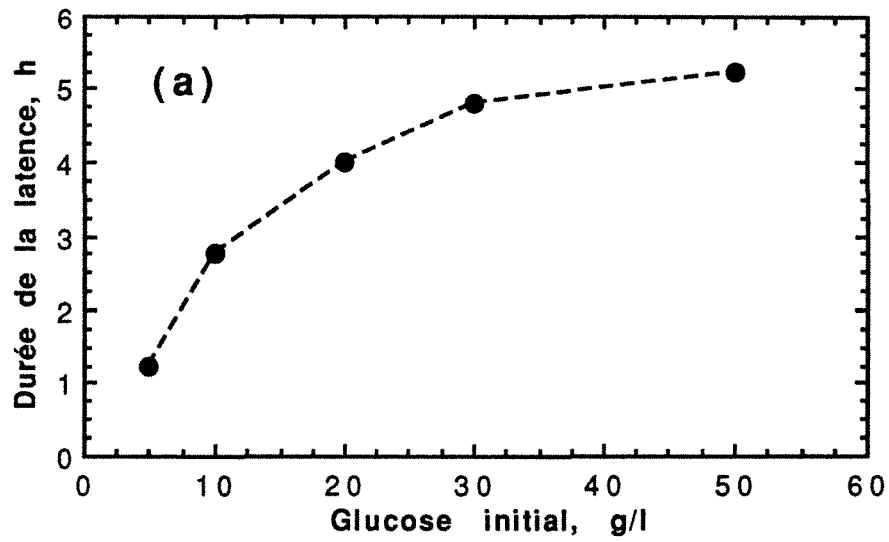


Figure 14 : Evolution du temps de latence en fonction de la concentration initiale de glucose (a), de l'éthanol produit (b) et de la biomasse produite (c).

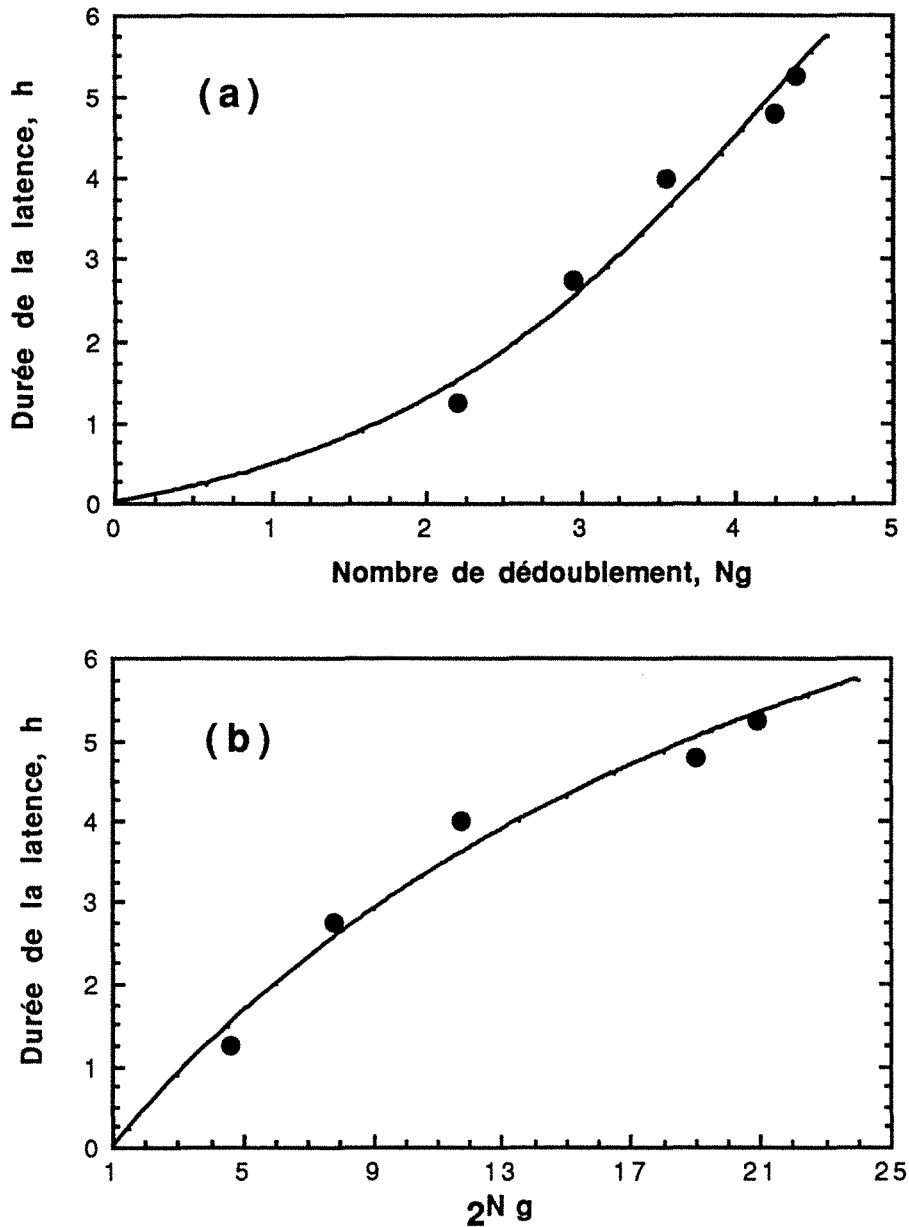


Figure 15 : Relation entre la durée de la latence, L , et le nombre de division cellulaire N_g (a).

Comparaison entre les résultats expérimentaux (●) et le modèle théorique (traits) :

$$(b) : L = L^m \frac{2^{N_g} - 1}{K + 2^{N_g}}, \text{ avec : } L^m = 12 \text{ h, } K = 24 \text{ et } 2^{N_g} = X/X_0.$$

Quant à la transition inverse, le passage du métabolite de l'éthanol à celui du glucose est instantané (figure 16). Ce changement est provoqué par l'ajout du glucose à une culture sur éthanol. Le pyruvate est, aussi, immédiatement absorbé dès qu'il est rajouté. Cependant, l'assimilation de l'éthanol continue tandis que l'accumulation d'acétate ralentit. Ce ralentissement peut être expliqué par une inhibition de l'acétaldéhyde déshydrogénase par le pyruvate. Ce phénomène est également observé lors de l'accumulation du pyruvate pendant la phase de culture sur glucose où peu d'acétate est produit.

Par ailleurs, dans sa globalité, ce résultat confirme que les enzymes glycolytiques sont constitutives d'où l'assimilation immédiate du glucose ou du pyruvate. Mais aussi, l'assimilation continue de l'éthanol montre que le glucose, ou le pyruvate, n'agit pas directement sur les enzymes de la voie de l'éthanol, mais plutôt sur l'expression de leur gènes respectifs. Ces constatations sont en accord avec les résultats précédents concernant la relation entre la durée de la latence et le taux d'enzymes de la voie de l'éthanol lors de la transition de la croissance du glucose vers l'éthanol.

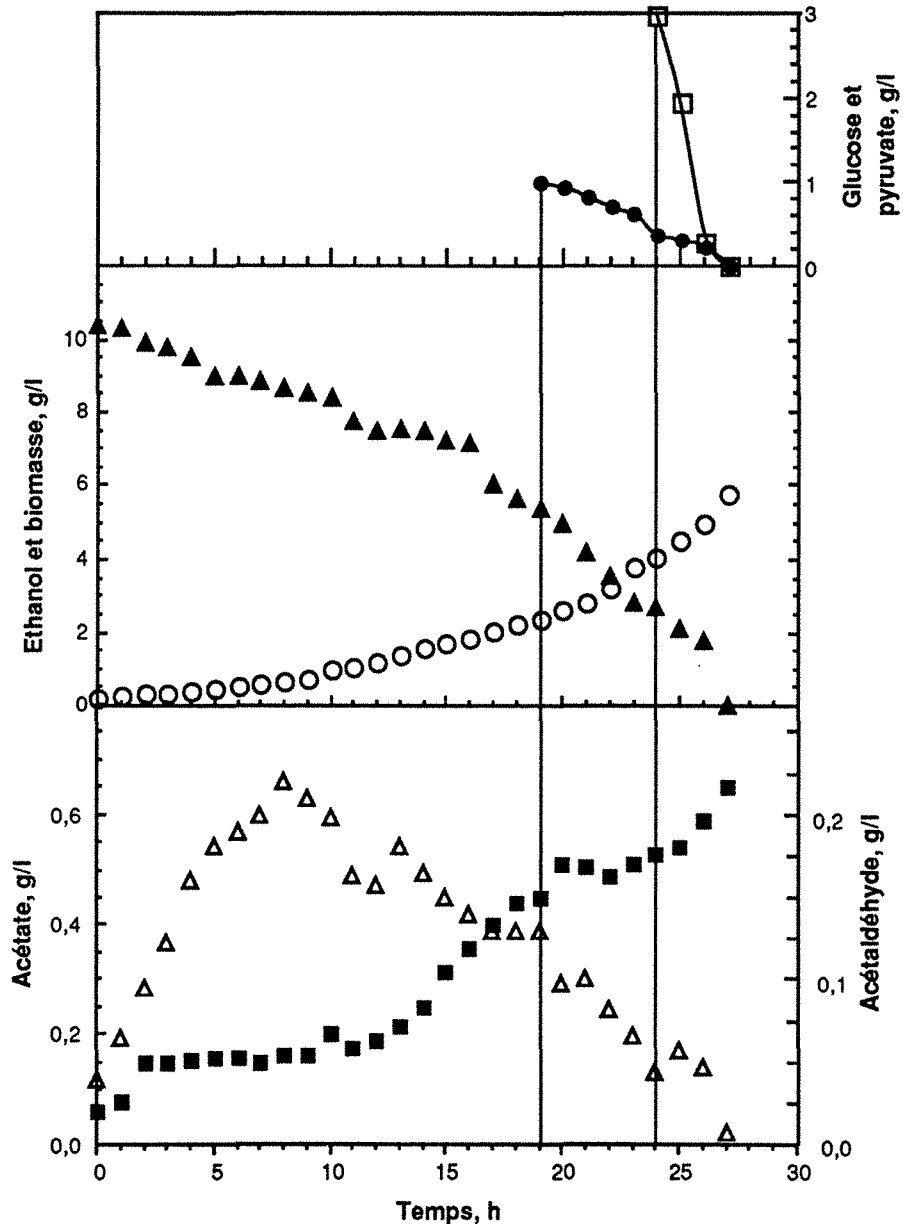


Figure 16 : Effet de l'ajout du pyruvate (●) et du glucose (□) sur la cinétique de la croissance de la levure en réacteur discontinu à 10 g/l d'éthanol initial. Evolution de l'acétate (■), l'acétaldéhyde (Δ), la biomasse (○) et de l'éthanol (▲).

REFERENCES :

- 1- Bailey, J. E., Ollis, D. F., "Transport across cell membranes", in "Biochemical engineering fundamentals", McGraw-Hill Inc., 2nd ed. (1986) 263-265.
- 2- Barford, J. P., "A general model for aerobic yeast growth. Part II: Continuous culture". *Biotechnol. Bioeng.*, 35 (1990) 921-927.
- 3- Barford, P. J. Ph., Orlowski, J. H., "A new model of uptake sugars by *S. cerevisiae* (Part I and II)", *Bioproc. Eng.*, 7 (1992) 297-302.
- 4- Bartrons, R., van Schaftingen, E., Vissers, S., Hers, H., G., "The stimulation of yeast phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate", *FEBS Lett.*, 143 (1982) 137-140.
- 5- Bisson, L. F., Fraenkel, D. G., "Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*", *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 80 (1983) 1730-1734.
- 6- Boiteux, A., Hess, B., "Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase", *FEBS Lett.*, 9 (1970) 293-296.
- 7- D'amore, T., Stewart, G., "Ethanol tolerance of yeast", *Enz. Microb. Technol.*, 9 (1987) 322-330.
- 8- Dasari, G., Worth, M. A., Connor, M.A., Pamment, N. B., "Reasons for the apparent difference in the effects of produced and added ethanol on culture viability during rapid fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Bioeng.*, 35 (1990) 109-122.
- 9- Fuhrmann, G., F., Völker, B., "Regulation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Biothech.*, 27 (1992) 1-15.
- 10- Gancedo, C., Serrano, R., "Metabolism and physiology of yeasts", in "The Yeasts", 2nd edit. by Rosa, A. H., Harrison, J. S., U.S.A. Acad. Press Inc., 3 (1989) 220-228.
- 11- Grosz, R., Stephanopoulos, G., "Physiological, biochemical and mathematical studies of micro-aerobic continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*", Part III. *Biotechnol. Bioeng.*, 36 (1990) 1030-1040.
- 12- Haarasilta, S., Oura, E., "On the activity and regulation of anaplerotic and gluconeogenic enzymes during the growth process of baker's yeast", *Eur. J. Biochem.*, 52 (1975) 1-7.
- 13- Kilian, S. G., du Preez, J. C., Gericke, M., "The effects of ethanol on growth rate and passive proton diffusion in yeasts", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32 (1989) 90-94.
- 14- Lang, J. M., Cirillo V. P., "Glucose transport in kinaseless *Saccharomyces cerevisiae* mutant", *J. Bacteriol.*, 169 (1987) 2932-2937.
- 15- Engasser, J.-M., Pons, M.-N., "Biotechnologies des levures", Larpent Ed., J.-P., Masson, Paris, (1991) 217-223.
- 16- Mosrati, R., Ghoul, M., Fonteix, C., Marc, I., "Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur discontinu aéré (I) : Croissance sur glucose, flux de carbone et énergie cellulaire", (en cours).
- 17- Mosrati, R., Fonteix, C., Marc, I., "Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur discontinu aéré (II) : Croissance sur éthanol, stœchiométrie et énergie cellulaire", (en cours).

- 18- Nagdawithana *et al* , J. Am. Soc. Brew. Chem. 35 (1977) 179-183.
- 19- Pamment, N., B., Hall, R., J., Barford, J., P., "Mathematical modelling of lag phases in microbial growth", Biotech. Bioeng., 20 (1978) 349-381.
- 20- Postma, E., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P., "Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066", Yeast, 5 (1989) 159-165.
- 21- Rajab, A., Engasser, J.-M., Germain, P., Miclo, A., "A physiological model of yeast growth", III rd Eur. Congr. Biotech., Munchen FRG, 2 (1984) 43-48.
- 22- Reyman, G., "Modelling and control of fed-batch fermentation of bakers' yeast", Food control, January (1992) 33-44.
- 23- Schuddemat, J., van den Broek, P. J. A., van Steveninck, J., "The influence of ATP on sugar uptake mediated by the constitutive glucose carrier of *Saccharomyces cerevisiae* ", Biochim. Biophys. Acta., 937 (1988) 81-87.
- 24- Sonnleitner, B., Käppeli, O., "Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity : formulation and verification of a hypothesis", Biotech. Bioeng., 28 (1986) 927-937.
- 25- Stadtman, E. R., "Allosteric regulation of enzyme activity", Adv. Enzymology, 28 (1966) 71-117.
- 26- Sweere, A., P., J., Giesselbach, J., Barendes, R., de Krieger, R., Honderd, G., Luyben, C., A., M., "Modelling the dynamic behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* and its application in control experiments", Appl. Microbiol. Biotechnol., 28 (1988) 116-127.
- 27- van Urk, H., Voll, W. S. L., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P., "Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and crabtree-negative yeasts", Appl. Environ. Microb., 56 (1990) 281-287.

Modélisation de la croissance aérobie de *S. cerevisiae* en réacteur discontinu : Métabolisme, Energie et Structure cellulaire.

RESUME :

Un modèle métabolique-énergétique-structuré est proposé pour décrire la croissance de la levure *S. cerevisiae* sur glucose et sur éthanol, en réacteur discontinu. Ce modèle est basé sur des bilans de matière et d'énergie et sur les propriétés enzymatiques des principales voies métaboliques, constitutives ou inductibles. Outre le glucose, le pyruvate, l'éthanol et la biomasse, les cinétiques proposées prennent en compte le rôle des molécules énergétiques (ATP, NADH et l'acétyl-CoA), en tant que substrat ou régulateur. Ce modèle permet de représenter correctement les différentes variables macroscopiques (glucose, pyruvate, éthanol, biomasse totale, les vitesses de consommation d'oxygène et de production de CO₂), ainsi que la durée de latence. De plus, il permet une évaluation très satisfaisante des métabolites intracellulaires et de l'état physiologique de la biomasse.

I. INTRODUCTION :

Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire la croissance de *S. cerevisiae*. Ces modèles peuvent être classés en trois grandes familles : macroscopiques [23], métaboliques [2,25] et physiologiques [22,29]. Ces modèles ont contribué à une meilleure connaissance et maîtrise des procédés de cultures de levures. Toutefois, ces modèles présentent des limites d'utilisation qui ne prennent en compte, la plupart du temps, qu'un seul des aspects de la croissance. La combinaison des différentes approches, en réunissant ces informations dans un seul modèle, devrait conduire à l'amélioration de la représentation des cinétiques observées. Ceci est l'objet de cette contribution.

Dans un travail précédent [16], la croissance en milieu synthétique glucosé d'une souche commerciale de *S. cerevisiae* a été étudiée en réacteur discontinu et aéré. Ce mode de culture en régime transitoire, a permis d'apporter des précisions importantes sur la cinétique et l'énergétique de la croissance. Ainsi, il a été observé que les vitesses spécifiques de croissance, d'assimilation du glucose et de production d'éthanol augmentent puis diminuent. Il a été également montré que la maintenance augmente avec la vitesse spécifique d'utilisation de l'oxygène alors que dans d'autres travaux, elle est considérée comme associée à la croissance [2, 23].

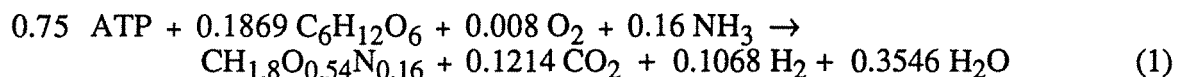
Les liens entre la cinétique et les couplages énergétiques ont été discutés sur des bases physiologiques [14]. Cette analyse a montré la nécessité de prendre en compte l'énergétique cellulaire pour une meilleure compréhension et une modélisation plus précise des cinétiques observées. Il en ressort que l'ATP stimulerait l'assimilation du glucose, la croissance et la maintenance. Ces hypothèses sont en accord avec d'autres travaux [9]. En outre, la dualité du rôle du NADH intervenant dans la respiration de l'oxygène et la production de l'éthanol [14], impliquerait une compétition entre ces deux réactions. La réassimilation de l'éthanol sera également étudiée avec une approche métabolique et énergétique. Nous nous intéresserons davantage au phénomène de latence et à sa signification sur le plan structural de la biomasse.

II. STÉCHIOMETRIE DE LA BIOCONVERSION :

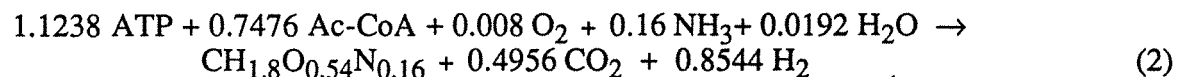
La stœchiométrie du processus de croissance de la levure sur glucose et sur éthanol est représentée par 9 schémas réactionnels [16, 17] :

II.1. l'anabolisme :

On y distingue la synthèse de la biomasse à partir du glucose :



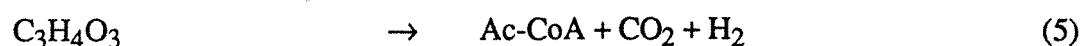
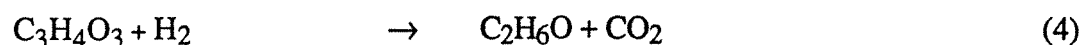
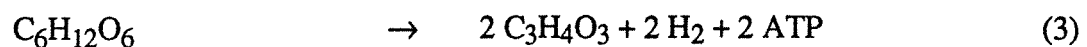
et à partir de l'éthanol, où le précurseur direct est l'acétyl-CoenzymeA, Ac-CoA, :

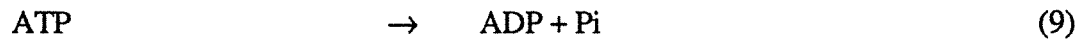
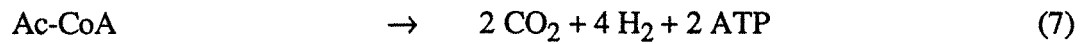
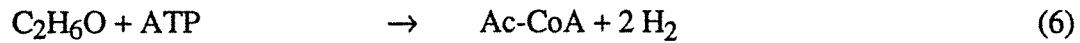


$\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.54}\text{N}_{0.16}$ est la formule brute de la biomasse. Compte tenu d'un taux de cendre de 7%, son poids molaire est de 26,7 g.

II.2. Le catabolisme :

On désignera par H_2 l'équivalent de l'ensemble des cofacteurs réduits (NADH, NADPH, FADH, QH_2 ...), et par ATP l'équivalent de l'ensemble des nucléotides triphosphates intervenant dans les réactions de phosphorylation ou de couplage énergétique (ATP, GTP, UTP...). L'acétyl-CoenzymeA, Ac-CoA, est considéré comme un équivalent "Acétate".





La réaction (8) produit l'ATP avec une efficacité P/O prise égale à 1 [2,9]. Par ailleurs, afin d'alléger l'écriture des bilans, les molécules ADP, NAD et H₂O ne sont pas mentionnées. Excepté pour la réaction (9), l'ADP apparaît comme produit de l'hydrolyse de l'ATP : c'est la maintenance.

III. STRUCTURE DE LA BIOMASSE :

Chez la levure, tout comme chez d'autres organismes, les gènes de structure sont de deux types : constitutifs ou inductibles/repressibles. Au cours de la croissance de *S. cerevisiae*, il a été montré que son lot enzymatique évolue en s'adaptant aux conditions de culture, notamment, à la source de carbone [20, 21]. Lors de la transition de l'assimilation du glucose à celle de l'éthanol, la levure passe par une phase de latence plus ou moins longue.

Par ailleurs, la biomasse totale peut être subdivisée, d'un point de vue physiologique, en quatre fractions structurales distinctes : (1) enzymes de la glycolyse, (2) enzymes anaplérotiques, l'Alcool-déshydrogénase-II (ADH-II) et l'acétyl-CoA synthétase (Ac-CoAsyn), (3) enzymes respiratoires et (4) protéines dégradées et inactives.

En se référant à des études précédentes [10,14], plusieurs observations expérimentales ont conduit à préciser les comportements suivants : les enzymes de la glycolyse et de la respiration sont constitutives, alors que la voie anaplérotique, ainsi que l'ADH-II et l'Ac-CoAsyn, sont réprimées en présence du glucose. La croissance prolongée de la levure sur glucose et à forte concentration conduit à une phase de latence très longue, avant qu'elle ne commence à réassimiler l'éthanol. Ceci s'explique bien par la répression des enzymes anaplérotiques, l'ADH-II et de l'Ac-CoAsyn, qui vont se trouver diluées dans la biomasse nouvelle. Cependant, le fait que la durée de la latence ait une valeur maximale [14], de l'ordre de 12h, rend l'hypothèse de dilution insuffisante.

A ce sujet, certains auteurs [10,19,28] suggèrent des hypothèses complémentaires. Bien qu'exprimé de manières différentes, le concept de base est de supposer une reconversion directe des enzymes glycolytiques en enzymes anaplérotiques. Cette hypothèse a été représentée par des expressions empiriques de vitesses de changement d'état physiologique [21]. Les modèles basés sur cette hypothèse permettent effectivement de simuler une phase de latence dont la durée est, cependant, constante. Ces modèles sont totalement incapables de prédire une durée de latence variable telle que le montre l'expérience [14].

Pour mieux rendre compte de ce phénomène, une hypothèse originale est proposée dans ce travail. Nous considérons deux mécanismes de base : i) la dégradation continue des protéines cellulaires d'une manière non-spécifique sous l'action de protéases, ii) la redistribution de ces protéines selon l'état d'expression des gènes correspondants. Cette hypothèse repose sur des résultats expérimentaux concernant l'existence de protéases cellulaires, l'évolution des activités enzymatiques et de la fraction protéique inactive [13,20,24,29].

Le remaniement enzymatique fonctionne selon un mécanisme de répression (figure 1). En présence de glucose, les gènes codant pour les activités de la voie anaplérotique sont réprimés. Les enzymes correspondantes ne se renouvellent plus. Par contre, elles sont dégradées pour donner de la biomasse inactive. Ce matériau inactif est détourné vers la synthèse d'enzymes constitutives telles que de la glycolyse et de la respiration. Lorsque le glucose disparaît, les gènes de la voie d'utilisation de l'éthanol s'expriment de nouveau. Ainsi, d'un point de vue activité, la biomasse totale est somme de quatre composantes :

- 1- X_g représente les activités enzymatiques assurant la glycolyse,
- 2- X_m pour l'activité respiratoire des mitochondries,
- 3- X_e pour les enzymes responsables de l'assimilation et de la croissance sur éthanol,
- 4- X_i pour les protéines et matériaux cellulaires enzymatiquement inactifs.

Des cinétiques complexes concernant la dégradation et synthèse protéique ont été proposées [26]. Cependant nous proposons de simplifier ces cinétiques par :

- la vitesse de protéolyse, R_{pr} , est proportionnelle à la biomasse active ($X_g+X_e+X_m$) :

$$R_{pr} = K_{pr} (X_g+X_e+X_m) \quad (10)$$

- la vitesse de la nouvelle synthèse protéique est proportionnelle à la biomasse inerte :

$$R_{syn} = K_{syn} X_i * \left\{ \frac{ATP}{K_{ATP}+ATP} \right\} \quad (11)$$

- la répartition du flux total de synthèse de biomasse active :

Ce flux total, R_{tot} équation (12), est la somme du flux de croissance pure provenant de l'assimilation d'un substrat carboné, R_x , et du flux de renouvellement, R_{syn} . La répartition du flux est donnée par le système (13).

$$R_{tot} = R_x + R_{syn} \quad (12)$$

$$\begin{cases} R_{xm} &= \alpha R_{tot} \\ R_{xe} &= (1 - \alpha) \beta (1 - \phi) R_{tot} \\ R_{xg} &= R_{tot} - R_{xm} - R_{xe} \end{cases} \quad (13)$$

où : ϕ est une fonction de la concentration du glucose, du type : $\phi = \frac{G}{K_G + G}$. Cette fonction traduit l'effet répresseur du glucose sur les gènes codant pour les enzymes de la voie d'utilisation de l'éthanol,
 α est la fraction de biomasse active assurant la respiration,
 β est la fraction maximale, lorsque ϕ est égal à 0, de biomasse qui assimile l'éthanol,
 R_{xm} , R_{xe} et R_{xg} sont respectivement les vitesses de synthèse de X_m , X_e et X_g .

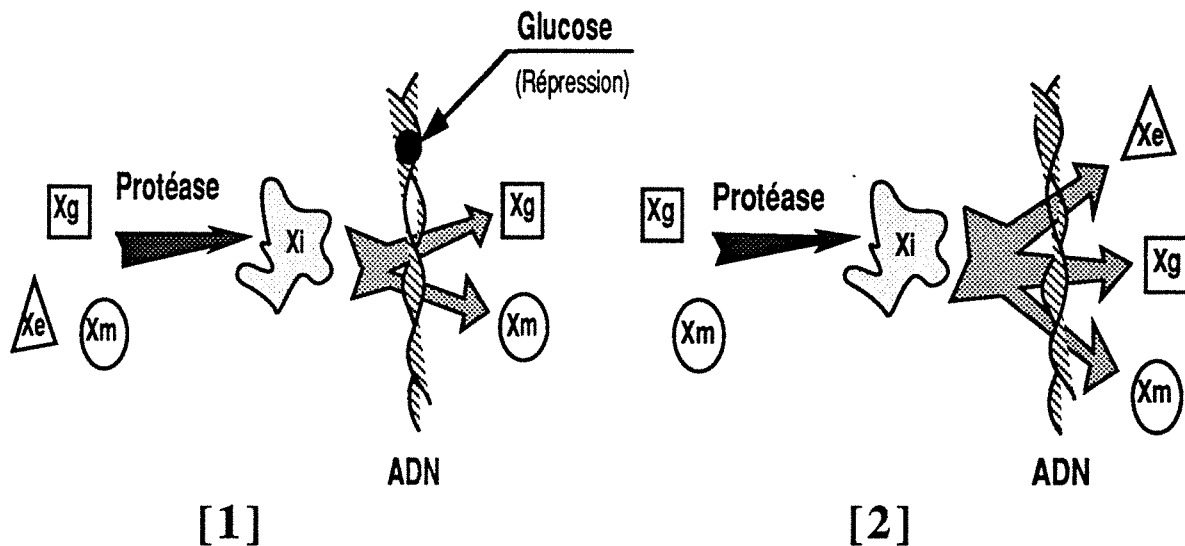


Figure 1: Représentation schématique du mécanisme du remaniement enzymatique et de la modification de l'état physiologique et métabolique de la biomasse.
 (1) Transition de l'assimilation de l'éthanol à l'assimilation du glucose,
 (2) Transition de la croissance sur glucose à la croissance sur éthanol.

IV. LOIS CINÉTIQUES:

Pour introduire les variables et les expressions cinétiques du modèle, la figure 2 schématise l'essentiel des voies métaboliques et des interactions entre les différentes molécules considérées. Le modèle repose sur la validation des bilans élémentaires de matière. Le glucose et l'éthanol, ainsi que leurs dérivés métaboliques, sont supposés unique source de carbone et d'énergie. L'oxygène, l'azote et les sels minéraux sont considérés non-limitants. La formule élémentaire de la biomasse est supposée constante au cours de la croissance. Les fuites de carbone, en acétate et acétaldéhyde extracellulaires, sont prises en compte sous forme d'équivalent éthanol. Ces fuites représentent 1% par rapport à l'éthanol produit. Cette hypothèse a été préalablement vérifiée [16].

Comme le montre la figure 2, le modèle repose sur huit étapes clés, qui sont :

- (i) le transport du glucose et son catabolisme jusqu'au pyruvate (glycolyse),
- (ii) la conversion du pyruvate en éthanol,
- (iii) la conversion du pyruvate en acétyl-CoA,
- (iv) l'activation de l'éthanol en acétyl-CoA,
- (v) l'oxydation de l'acétyl-CoA en CO₂ et en NADH,
- (vi) la régénération oxydative du NAD et la production d'ATP,
- (vii) les processus d'hydrolyse de l'ATP,
- (viii) l'anabolisme et croissance cellulaire.

Le glucose est transporté par des perméases membranaires. La vitesse de transport est limitée par la concentration extra-cellulaire du sucre, mais aussi par l'activité glycolytique des cellules [7]. Dans des conditions non-limitantes en ce substrat, Groz et Stephanopoulos [9] proposent que la cinétique de transport dépende linéairement de l'ATP et qu'elle soit inhibée indirectement par un produit de la glycolyse (glucose-6-phosphate, pyruvate ou l'ATP lui-même). Toutefois, cette cinétique linéaire ne rend pas compte de la nature enzymatique de ces réactions et enlève à ces phénomènes biologiques la notion de saturation. Pour pallier cela, la vitesse de transport du glucose peut être décrite par l'expression suivante :

$$R_G = q_G^m * X_g * \left\{ \frac{G}{K_1 + G} \right\} * \left\{ \frac{ATP}{K_2 + ATP} \right\} * \left\{ \frac{K_3}{K_3 + E} \right\} \quad (14)$$

où : q_G^m est la vitesse spécifique maximale de transport du glucose, gGlucose/gMS/h,

K_1 est la constante de saturation pour le glucose, G en g/l,

K_2 est la constante de saturation pour l'ATP intracellulaire, ATP en $\mu\text{mol/gMS}$,

K_3 est une constante d'inhibition par l'éthanol, E en g/l,

X_g représente la biomasse assurant la glycolyse, en g/l.

Une fois dans la cellule, le glucose est transformé en diverses molécules, notamment en pyruvate. Pour donner de l'éthanol, cet acide subit une décarboxylation puis une hydrogénation. De ce fait, on peut dire que la cinétique de production de l'éthanol est doublement contrôlée, par le pyruvate dans la première étape puis par le NADH, dans la deuxième. A cette limitation s'ajoute la réversibilité de la déshydrogénase et l'éthanol se comporte alors comme inhibiteur de sa propre production. Ces trois effets sont pris en compte dans l'expression de la vitesse spécifique de production de l'éthanol à partir du pyruvate :

$$R_{E1} = q_{E1}^m * X_g * \left\{ \frac{\text{Pyr}K_4}{K_5 + \text{Pyr}K_4} \right\} * \left\{ \frac{\text{NADH}}{K_6 + \text{NADH} + K_7E} \right\} \quad (15)$$

où : q_{E1}^m est la vitesse spécifique maximale de production d'éthanol, E en gEthanol/gMS/h,

Pyr, $\mu\text{mol/l}$, et NADH, $\mu\text{mol/gMS}$, sont les concentrations intracellulaires de pyruvate

et de cofacteurs réduits "H₂". K5 et K6 sont leurs constantes de saturations respectives, K4 est un coefficient homotropique positif associé au pyruvate, K7 est la constante d'inhibition par l'éthanol, E en g/l.

La pyruvate-déshydrogénase est située dans la mitochondrie, et transforme le pyruvate en acétyl-CoA selon une cinétique supposée michaélienne [2], et inhibée par l'acétyl-CoA :

$$R_{\text{pyr}} = q_{\text{pyr}}^m * X_m * \left\{ \frac{\text{Pyr}}{K_8 + \text{Pyr}} \right\} * \left\{ \frac{K_9}{K_9 + \text{Ac-CoA}} \right\} \quad (16)$$

où : q_{pyr}^m est la vitesse spécifique maximale, g d'équivalent Ac-CoA/gMS/h,

K8 est une constante de saturation associée au pyruvate, Pyr $\mu\text{mol/l}$,

K9 est la constante d'inhibition par l'acétyl-CoA, en $\mu\text{mol/gMS}$,

X_m est la biomasse qui représente l'activité respiratoire mitochondriale.

La réassimilation de l'éthanol est assurée par une alcool-déshydrogénase, ADH-II, caractérisée par un équilibre déplacé vers l'acétaldéhyde. Au cours de la croissance sur l'éthanol, l'acétaldéhyde s'accumule rapidement puis se met en équilibre avec l'éthanol jusqu'à leur disparition totale [14] Ces deux molécules traversent la membrane plasmique par simple diffusion [1]. La réversibilité de la réaction fait que l'acétaldéhyde se comporte comme inhibiteur et du fait qu'il se met en équilibre avec l'éthanol, ce dernier peut représenter l'effet de l'acétaldéhyde à travers la constante d'équilibre. Par ailleurs, l'ADH-II est une enzyme de la voie de l'éthanol, Xe. Elle est reprîmée par le glucose. La cinétique de réassimilation de l'éthanol peut être décrite par l'expression (17) :

$$R_{E2} = q_{E2}^m * X_e * \left\{ \frac{E}{K_{10} + E + K_{11}E} \right\} \quad (17)$$

où : q_{E2}^m est la vitesse spécifique maximale, gEthanol/gMS/h

K10 est une constante de saturation associée à l'éthanol, en g/l,

K11 est la constante d'inhibition par l'éthanol, E,

X_e est la biomasse qui représente la voie de réassimilation de l'éthanol, gMS/l.

L'acétyl-CoA peut être oxydé, entièrement, en CO₂ et en NADH dans les mitochondries suivant le cycle des acides tricarboxyliques. Cette conversion totale est typique de la croissance de la levure sur glucose. Sur éthanol, l'oxydation est partielle [10]. Ceci est dû à l'activation du shunt glyoxylique qui assure l'alimentation de la gluconéogenèse. Cette voie est vitale pour la levure. La voie anaplérotique se superpose au cycle de Krebs et réduit le flux d'acétyl-CoA destiné à la respiration. Ceci s'accorde parfaitement avec les résultats expérimentaux obtenus [15,16]. En effet, une vitesse spécifique de consommation d'oxygène plus faible sur éthanol que sur glucose a été observée. Une loi cinétique originale est proposée pour rendre compte de

ce phénomène :

$$R_{\text{resp}} = q_{\text{resp}}^m * \{ X_m - K_{12} X_e (1 - \phi) \} * \left\{ \frac{\text{Ac-CoA}}{K_{13} + \text{Ac-CoA}} \right\} \quad (18)$$

où : q_{resp}^m est la vitesse spécifique maximale d'oxydation de l'acétyl-CoA, gAc-CoA/gMS/h,
 K_{13} est une constante de saturation associée à l'acétyl-CoA intracellulaire, $\mu\text{mol/gMS}$,
 $1 - \phi$ est un terme d'inhibition par le glucose, définie dans l'équation (13). La différence
 "Xm - K12 Xe (1 - ϕ)" représente l'effet de "shunt" glyoxylique, Xe, sur la respiration, Xm.

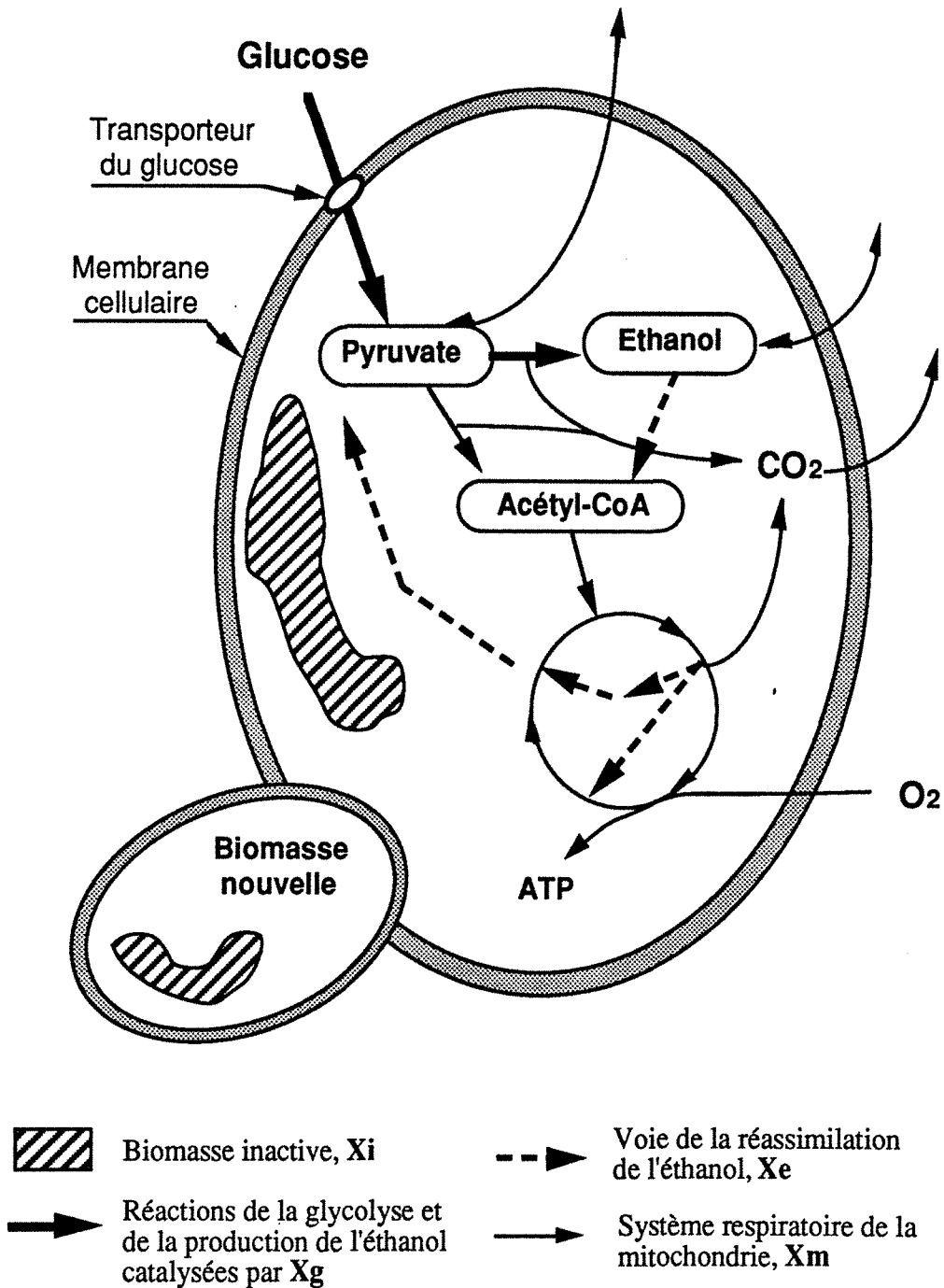


Figure 2: Représentation schématique du catabolisme du glucose, de l'éthanol et de la croissance cellulaire de *S. cerevisiae*.

Les cofacteurs NADH, produits par la glycolyse, le cycle de Krebs, l'activation de l'éthanol en acétyl-CoA et par la croissance, sont régénérés, en NAD, essentiellement par la chaîne de transporteurs d'électrons. Cette réaction consomme de l'oxygène et produit de l'ATP avec une efficacité P/O égale à 1. En toute rigueur, la cinétique de la respiration de l'oxygène devrait prendre en compte l'effet des deux substrats qui sont l'oxygène et le NADH. Toutefois, il ne sera pas tenu compte de la limitation par l'oxygène. L'ensemble des expériences présentées dans ce travail a été réalisé à des concentrations en oxygène dissous régulées à 45% de saturation. Dans ce cas, la cinétique d'assimilation de l'oxygène par la chaîne de transporteurs d'électrons est supposée michaélienne vis-à-vis du NADH :

$$R_{O_2} = q_{O_2}^m * X_m * \left\{ \frac{NADH}{K_{14} + NADH} \right\} \quad (19)$$

où : $q_{O_2}^m$ est la vitesse spécifique maximale de consommation d'oxygène,

K_{14} est la constante de saturation associée au NADH,

X_m est la biomasse représentative de l'activité mitochondriale.

Cette expression cinétique, (19), est particulièrement intéressante dans la mesure où pour la première fois le cycle des acides tricarboxyliques est séparé de la chaîne des transporteurs d'électrons. Cette distinction est très utile dans la compréhension des mécanismes énergétiques de la croissance. En effet, il est bien connu que le cycle de Krebs et du glyoxylate sont vitaux pour la multiplication cellulaire. Ils fournissent, à partir de l'acétyl-CoA, des précurseurs essentiels à la croissance. Ceci implique forcément le fonctionnement de ces cycles, même à des vitesses très lentes. Or, leur activité est modulée par la vitesse de régénération du NAD, qui elle-même dépend du système final récepteur des électrons.

Ainsi, l'expression (19) peut, également, représenter la production du glycérol dans le cas des cultures strictement anaérobies [6,8].

L'énergie nécessaire à la croissance est fournie par les réactions cataboliques, sous forme d'ATP. L'utilisation d'ATP est de deux types. Une consommation associée à la croissance et définit la notion de rendement maximum Y_{ATP} . Ce rendement représente le besoin strict en ATP pour la synthèse d'une mole de biomasse. Plusieurs auteurs [2,18,27] s'accordent sur la constance de ce paramètre, situé généralement entre 0.6 et 0.9 mole de matière sèche produite par mole d'ATP consommée, le poids molaire de matière sèche étant de l'ordre de 25 à 28 g. Le deuxième type de consommation d'ATP est considéré comme un phénomène de maintenance qui a fait l'objet de plusieurs études. A ce titre, différents modèles ont été proposés. Certains travaux [6] suggèrent que la maintenance soit proportionnelle à la vitesse spécifique de croissance. D'autres auteurs [9] ont observé que la vitesse d'utilisation de l'ATP augmente avec les concentrations d'oxygène dissous et d'ATP intracellulaire. Dans un

travail précédent [15,16], il a été montré que la maintenance augmente linéairement avec la vitesse spécifique de consommation d'oxygène. Cette dernière constatation s'accorde avec d'autres travaux [3] montrant que la production de chaleur augmente linéairement avec l'utilisation de l'oxygène. Il a été, également, rapporté que la production de chaleur est linéaire à la production du glycérol quand la levure est cultivée sur glucose et en anaérobiose [6].

Compte tenu de ces informations, la maintenance dépendrait de l'état énergétique des cellules. Ce phénomène se manifeste indépendamment de l'accepteur final d'électron, oxygène ou glycérol. Ainsi, la maintenance peut être simplement considérée comme étant une activité ATPasique. L'accroissement de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène, ou de production de glycérol, contribue à l'augmentation du taux d'ATP intracellulaire. Ceci intensifie l'activité ATPasique. La maintenance peut être assimilée à une activité ATPasique mitochondriale puisqu'elle est fortement corrélée à la consommation de l'oxygène :

$$R_{ATP} = q_{ATP}^m * X_m * \left\{ \frac{ATP}{K_{15} + ATP} \right\} \quad (20)$$

où : q_{ATP}^m est la vitesse spécifique maximale d'hydrolyse d'ATP.

K_{15} est la constante de saturation associée à l'ATP.

Enfin, la dernière cinétique concerne la vitesse spécifique de croissance. Le processus de croissance est le produit de très nombreuses, et complexes, réactions de biosynthèses. Il est extrêmement difficile de rendre compte de toutes ces réactions en détail. Cependant, dans la littérature, plusieurs formulations ont été proposées. Les plus courantes reposent sur : la limitation par le substrat [22], la limitation de la capacité respiratoire [25] et la limitation par l'ATP [2,9]. Dans un travail précédent [14], nous avons montré que la vitesse spécifique de croissance dépendrait de la concentration cellulaire en métabolites carbonés précurseurs. L'ATP est également un facteur qui limite la croissance. Compte tenu de l'ensemble de ces constatations, la cinétique de croissance peut être décrite par une seule expression valable aussi bien sur le glucose que sur l'éthanol :

$$R_X = \mu^m * (X_g + X_e + X_m) * \left\{ \frac{Ac-CoA}{K_{16} + Ac-CoA} \right\} * \left\{ \frac{ATP}{K_{17} + ATP} \right\} * \left\{ \frac{K_{18}}{K_{18} + E} \right\} \quad (21)$$

où : μ^m est la vitesse spécifique maximale de croissance,

K_{16} et K_{17} : constantes de saturations associées à l'acétyl-CoA et à l'ATP,

K_{18} est une constante d'inhibition par l'éthanol, E ,

la croissance est catalysée par toute la biomasse active X_g, X_e , et X_m .

L'inhibition de la croissance par l'éthanol est un phénomène connu [4,5,11]. Cette inhibition a pu être vérifiée dans le cas de plusieurs cultures [14].

V. BILANS DE MATIERE ET SYSTEME DIFFERENTIEL POUR UNE CULTURE EN REACTEUR DISCONTINU :

Trois types de bilans sont considérés. Le premier concerne le réacteur discontinu en tant que système macroscopique. Le second conduit à prendre la biomasse comme un système fermé pour l'ATP, le NADH et l'acétyl-CoA. Ces molécules sont produites et consommées dans la cellule et ne peuvent en être excrétées. Enfin, le troisième type concerne la structure de la biomasse.

V.1. Bilan macroscopique :

$$\frac{dX_{tot}}{dt} = R_X \quad (22)$$

$$\frac{dG}{dt} = -R_G \quad (23)$$

$$\frac{dE}{dt} = R_{E1} - R_{E2} \quad (24)$$

$$\frac{dC_{pyr}}{dt} = \frac{R_G}{90} - 1.01 \frac{R_{E1}}{46} - \frac{R_{pyr}}{60} - 0.014 \cdot \phi \cdot R_X \quad (25)$$

$$OUR = 3 \cdot 10^{-4} R_X + \frac{1}{32} R_{O_2} \quad (26)$$

$$CPR = 10^{-3}(18.55 - 14 \cdot \phi) \cdot R_X + \frac{1.01}{46} R_{E1} + \frac{1}{60} R_{pyr} + \frac{2}{60} R_{resp} \quad (27)$$

X, E et G sont les concentrations de la biomasse totale, de l'éthanol et du glucose en g/l. C_{pyr} est la concentration du pyruvate en mole/l, supposée identique de part et d'autre de la membrane cellulaire. Sa variation est, alors, exprimée en mole/l/h. OUR et CPR sont, respectivement, les vitesses de consommation d'oxygène et de production de CO₂, en mole/l/h. Les variations de la biomasse, du glucose et de l'éthanol sont en g/l/h. Les vitesses de réaction, R_i exprimées en g/l/h, sont décrites dans le paragraphe précédent.

V.2. Bilan sur les composés intracellulaires :

Il s'agit des bilans concernant l'ATP, le NADH et l'acétyl-CoA. Ces molécules sont toutes intracellulaires. Pour effectuer ce type de bilans, deux équations de bases sont utilisées. La première, (28), représente les bilans élémentaires de matière. La deuxième, (29), est relative à la non-diffusion de ces molécules hors des cellules. La combinaison de ces deux types

d'équations conduit à l'expression finale des bilans sur l'ATP, le NADH et l'acétyl-CoA.
Soit un produit P, la variation de sa concentration sur un volume réactionnel V est :

$$\frac{d[P_T \cdot V_T]}{dt} = V_T \cdot \sum_{i=1}^n R_i \quad (28)$$

où : P_T est la concentration totale du composé P, en mole/l,
 V_T est le volume réactionnel total, en l,
 R_i est la ième vitesse de réaction, en mole/l/h.

La rétention de composé P, dans les cellules, est formulée par :

$$P_T \cdot V_T = P_i \cdot V_i + P_e \cdot V_e \quad \text{avec} \quad \begin{cases} V_i + V_e = V_T \\ P_e = 0 \end{cases} \quad (29)$$

où : P_i est la concentration intracellulaire, en mole/l de cellule,
 P_e est la concentration extracellulaire, en mole/l de milieu réactionnel extracellulaire,
 V_i est le volume totale de cellule, en l,
 V_e est le volume total liquide extracellulaire, en l.

La concentration intracellulaire peut être déduite de (29) : $P_i = \frac{P_T \cdot V_T}{V_i}$,

En considérant un volume cellulaire constant, les expressions suivantes sont obtenues :

$$\begin{cases} V_i = v \cdot X \cdot V_T \\ P_i \cdot v = \frac{P_T}{X} = P_i^* \end{cases} \quad (30)$$

où : v est le volume cellulaire, en l de cellule/gMS,
 X est la biomasse totale, en gMS/l de milieu réactionnel total,
 P_i^* est la concentration intracellulaire exprimée en mole/gMS.

Après dérivation, la variation de la concentration P_i^* est obtenue :

$$\frac{dP_i^*}{dt} = \left\{ \frac{dP_T}{dt} - P_i^* \frac{dX}{dt} \right\} \cdot \frac{1}{X} \quad (31)$$

Finalement, en remplaçant les termes $\frac{dP_T}{dt}$ et $\frac{dX}{dt}$ par leurs expressions correspondantes,
l'équation (31) devient :

$$\frac{dP_i^*}{dt} = \left\{ \sum_{i=1}^n R_i - P_i^* R_X \right\} \cdot \frac{1}{X} \quad (32)$$

Les bilans finaux sur l'ATP, le NADH et l'acétyl-CoA ont pu être, alors, explicités en fonction des différentes vitesses de réaction:

$$\frac{dC_{Ac-CoA}}{dt} = \left\{ \frac{0.99}{46} R_{E2} + \frac{1}{60} [R_{pyr} - R_{resp} - 1.68.R_X.(1 - \phi)] - C_{Ac-CoA}.R_X \right\} \frac{1}{X_{tot}} \quad (33)$$

$$\frac{dC_{NADH}}{dt} = \left\{ (0.032-0.042.\phi).R_X + \frac{1}{90} R_G + \frac{1}{60} R_{pyr} - \frac{1}{46} R_{E1} + \frac{2}{46} R_{E2} + \frac{4}{60} R_{resp} - \frac{2}{32} R_{O_2} - C_{NADH} R_X \right\} \frac{1}{X_{tot}} \quad (34)$$

$$\frac{dC_{ATP}}{dt} = \left\{ \frac{1}{90} R_G + \frac{2}{32} R_{O_2} + \frac{1}{60} R_{resp} - \frac{2}{46} R_{E2} - 0.00421 R_X - R_{ATP} - C_{ATP} R_X \right\} \frac{1}{X_{tot}} \quad (35)$$

Les quantités C_{Ac-CoA} , C_{NADH} et C_{ATP} sont, respectivement, les concentrations intracellulaires d'acétyl-CoA, de NADH et d'ATP, exprimées en mole/gMS. Cette écriture des bilans tient compte, ainsi, du facteur de dilution dû à la croissance cellulaire.

V.3. Bilan sur la structure de la biomasse :

Ces bilans reprennent le concept du remaniement des protéines cellulaires décrit dans ce travail. En se basant sur les cinétiques proposées, l'équation d'état de la structure de la biomasse est donnée par :

$$\frac{dX_g}{dt} = R_{Xg} - K_{pr} X_g$$

$$\frac{dX_e}{dt} = R_{Xe} - K_{pr} X_e$$

$$\frac{dX_m}{dt} = R_{Xm} - K_{pr} X_m$$

$$X_i = X_{tot} - X_g - X_e - X_m$$

Ainsi posé, l'ensemble des équations différentielles a été intégré numériquement par la méthode de Runge-Kutta-Wes d'ordre 4. Les paramètres cinétiques du modèle sont résumés dans le tableau 1.

Paramètre	Valeur	Unité	Paramètre	Valeur	Unité
Métabolisme			K9	180.	μmol/gMS
q_G^m	12.5	g/gMS/h	K10	0.05	g/l
q_{E1}^m	7.0	g/gMS/h	K11	0.25	---
q_{E2}^m	1.63	g/gMS/h	K12	0.8	---
q_{pyr}^m	0.65	g/gMS/h	K13	3.0	μmol/gMS
q_{resp}^m	0.66	g/gMS/h	K14	2.0	μmol/gMS
$q_{O_2}^m$	2.0	g/gMS/h	K15	14.	μmol/gMS
q_{ATP}^m	0.32	molATP/gMS/h	K16	5.0	μmol/gMS
μ^m	1.4	h ⁻¹	K17	3.0	μmol/gMS
K1	0.2	g/l	K18	36.	μmol/gMS
K2	5.0	μmol/gMS	Structure de la biomasse		
K3	80.	g/l	α	0.4	---
K4	1.4	---	β	0.6	---
K5	320.	μmol/l	KATP	2.0	μmol/gMS
K6	2.0	μmol/gMS	K _{pr}	0.2	h ⁻¹
K7	0.1	---	K _{syn}	0.2	h ⁻¹
K8	70.	μmol/l	KG	0.5	g/l

Tableau 1 : Liste des valeurs et unités des constantes du modèle. (μmol : micro-mole, gMS : gramme de matière sèche, l : litre de milieu réactionnel, --- : sans unité)

VI. SIMULATIONS ET DISCUSSION DES RESULTATS :

Pour l'ensemble des calculs le réacteur est supposé infiniment mélangé et le milieu réactionnel est considéré comme une solution isotrope, y compris la biomasse.

Des simulations ont été réalisées et comparées aux résultats expérimentaux issus des cultures effectuées à 10, 20 et 50 g/l de glucose initiale. Les résultats obtenus sont présentés respectivement dans les figures 3, 4 et 5. Ces dernières montrent l'évolution des concentrations de la biomasse, du glucose, de l'éthanol et du pyruvate, ainsi que l'évolution des vitesses de consommation d'oxygène et de production de CO₂. Ces figures montrent également l'évolution théorique des concentrations intracellulaires d'ATP, du NADH et de l'acétyl-CoA, ainsi que l'évolution de la composition relative de la biomasse en fraction inerte et active. La composition de la fraction active en X_g, X_e et X_m est également présentée.

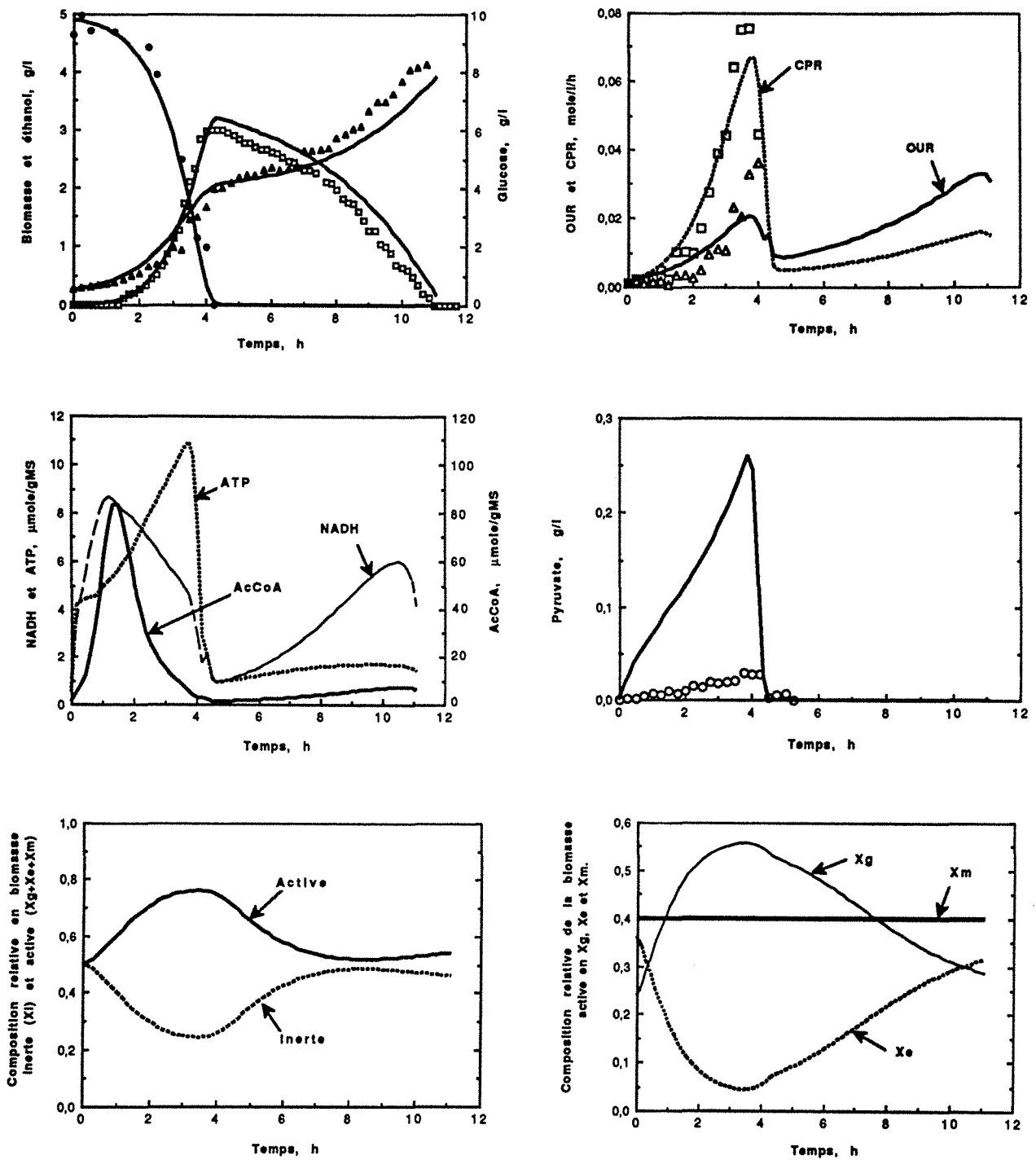


Figure 3 : Comparaison de la simulation du modèle avec les résultats expérimentaux, dans le cas d'une culture à 10 g/l de glucose initial. Biomasse (▲), Glucose (●) et éthanol (□). La composition initiale de la biomasse étant : $X_g = 0.12$, $X_e = 0.18$, $X_m = 0.20$ et $X_i = 0.50$.

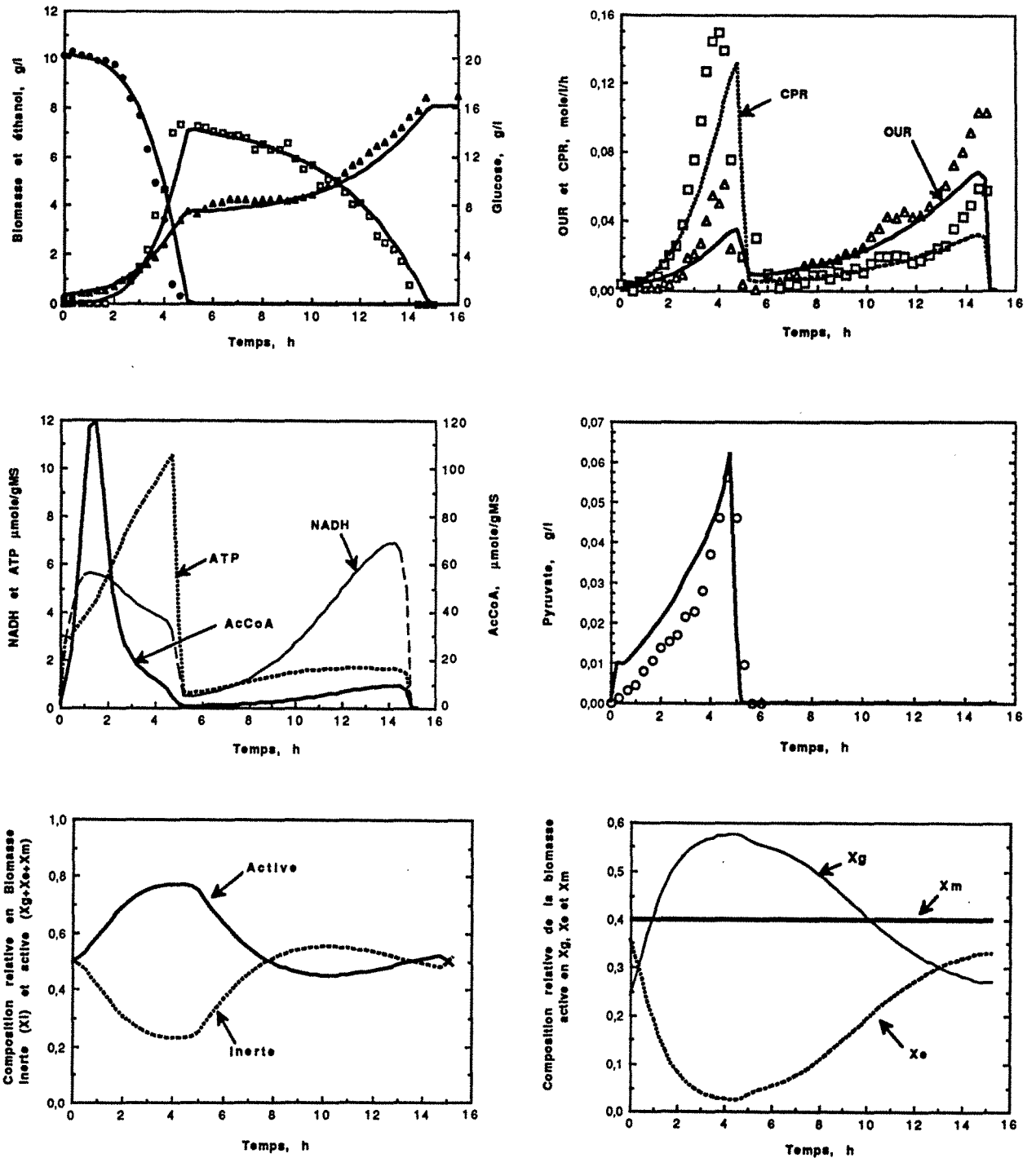


Figure 4 : Comparaison de la simulation du modèle avec les résultats expérimentaux, dans le cas d'une culture à 20 g/l de glucose initial. Biomasse (▲), Glucose (●) et éthanol (□). La composition initiale de la biomasse est : $X_g = 0.12$, $X_e = 0.18$, $X_m = 0.20$ et $X_i = 0.50$.

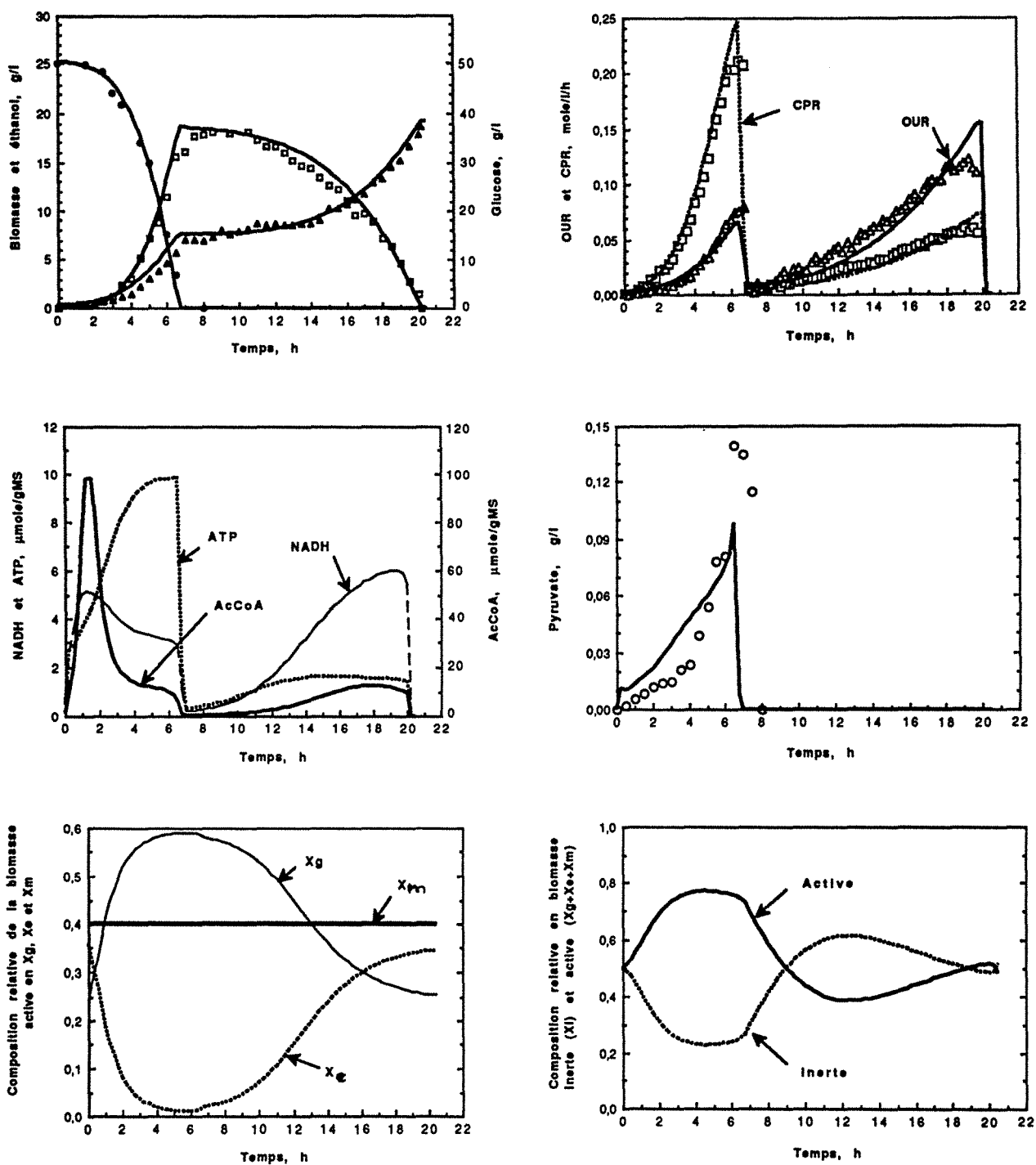


Figure 5 : Comparaison de la simulation du modèle avec les résultats expérimentaux, dans le cas d'une culture à 50 g/l de glucose initial. Biomasse (▲), Glucose (●) et éthanol (□). La composition initiale de la biomasse étant : $X_g = 0.12$, $X_e = 0.18$, $X_m = 0.20$ et $X_i = 0.50$.

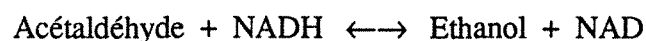
Les simulations obtenues sont satisfaisantes et concordent bien avec les résultats expérimentaux. Toutefois, pour l'obtention de ce bon comportement du modèle vis-à-vis des différentes expériences, nous avons dû ajuster et adapter à chaque simulation trois paramètres qui sont : 1) la vitesse spécifique de dégradation de la biomasse active, K_{pr} , 2) la constante de saturation associée au pyruvate intervenant dans la cinétique de production de l'éthanol, K_5 , 3) la vitesse spécifique d'assimilation de l'éthanol, q_{E2}^m , ou la constante d'inhibition de cette cinétique, K_{11} .

Les valeurs des paramètres présentées dans le tableau 1 concernent la simulation de la culture réalisée à 50 g/l de glucose initiale. Pour la culture à 10 g/l de glucose, K_{pr} est égal à 0.22 h^{-1} , la valeur de K_5 est $2.10^3 \text{ } \mu\text{mol/l}$ de pyruvate, enfin K_{11} vaut 0.18 (sans unité). Pour la culture à 20 g/l de glucose initial, les valeurs de ces paramètres sont : $K_{pr} = 0.21 \text{ h}^{-1}$, $q_{E2}^m = 1.8 \text{ gEthanol/gMS/h}$ et $K_{11} = 0.22$ (sans unité).

Excepté K_5 , qui passe de 320 à $2.10^3 \text{ } \mu\text{mol pyruvate/l}$, la variation des valeurs des trois autres paramètres est de l'ordre de 10%. Pour expliquer cette difficulté de simulation, nous mettons en premier plan le problème d'estimation de ces 32 paramètres. En effet, à partir des expériences et des mesures possibles, on peut constater que le nombre de variables observables, 6 en tout, est inférieur à celui des variables simulées, 7+6. Ainsi, 7 variables inconnues, y compris leurs cinétiques, sont à déduire. L'utilisation du bilan élémentaire de matière et du bilan sur la répartition de la biomasse réduit le nombre d'inconnus à 5. Cependant le problème reste posé vu la complexité des équations du modèle.

Par ailleurs, on constate que l'imprécision sur les paramètres du modèle affecte essentiellement la cinétique de l'éthanol et celle de la restructuration de la biomasse. Dans le modèle proposé, ces cinétiques ont été simplifiées.

En ce qui concerne l'éthanol, nous savons que l'alcool-déshydrogénase, ADH, possède deux isozymes distincts. Cette activité convertit réversiblement l'acétaldéhyde en éthanol, en oxydant une mole de NADH en NAD selon le schéma suivant :



En toute rigueur, l'expression cinétique de cette réaction complexe devrait tenir compte de l'acétaldéhyde et du NAD en plus du NADH et de l'éthanol. Cette cinétique serait de la forme suivante :

$$q_{E1} = q_{E1}^m * \left\{ \frac{[\text{Acétaldéhyde} * \text{NADH}] - \alpha [\text{Ethanol} * \text{NAD}]}{\beta + [\text{Acétaldéhyde} * \text{NADH}] + \gamma * [\text{Ethanol} * \text{NAD}]} \right\}$$

Cette loi cinétique fait apparaître le rôle de l'acétaldéhyde et du NAD et explique l'évolution de l'équilibre apparent entre l'acétaldéhyde et l'éthanol pour différentes cultures (figure 6). Ces observations n'ont pas été considérées dans le modèle par souci de simplification.

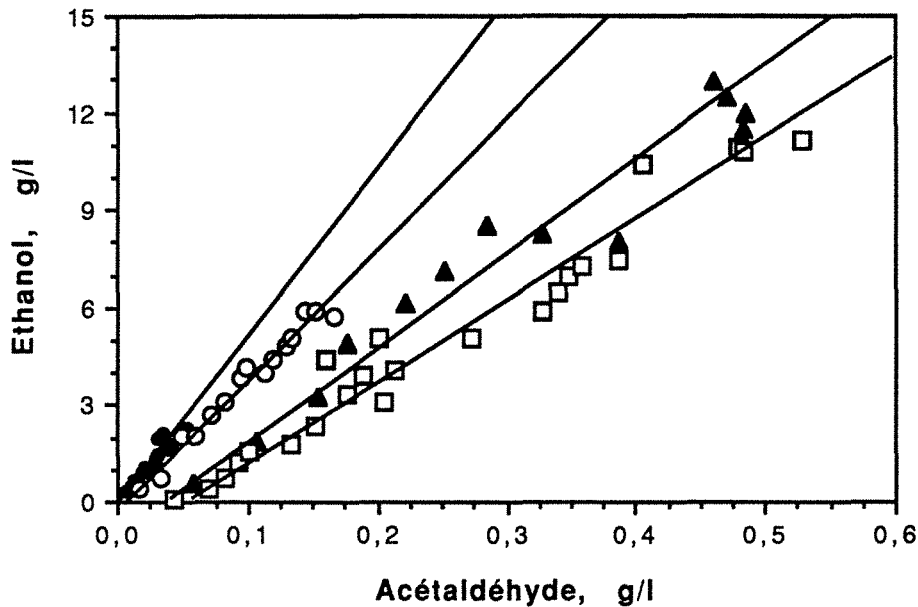


Figure 6 : Mise en évidence d'une relation d'équilibre entre les concentrations extracellulaires d'éthanol et d'acétaldéhyde au cours de la croissance sur éthanol. Glucose initial : (●) 10 g/l, (○) 20g/l, (▲) 30g/l, (□) 50g/l.

Une autre limitation du modèle consiste en l'association structurale de l'activité glycolytique à la production de l'éthanol via la pyruvate-décarboxylase, PDC. Cette hypothèse n'est pas suffisante puisque cette enzyme clé n'est pas constitutive comme cela a été supposé. On ne connaît pas avec précision l'inducteur du gène *pdh*, mais il est probable que l'AMPc, ou un intermédiaire de la glycolyse provoque l'expression de ce gène. Ainsi, pour améliorer le modèle, il serait nécessaire d'introduire une nouvelle espèce de biomasse qui rendrait compte de l'évolution de l'activité PDC. Cette modification aurait pour effet de fixer la constante de saturation K_5 et de mieux représenter la croissance de la levure dans des conditions de respiration totale du glucose.

Quant aux cinétiques de dégradation et de synthèse de protéines, elles sont plus complexes que la forme présentée dans ce modèle. Plusieurs auteurs [12,28] ont proposé une cinétique michaelienne de la protéolyse dans laquelle la biomasse active est à la fois catalyseur et substrat. La loi cinétique préconisée est du type :

$$R_{pr} = K_{pr} * X_{active} * \frac{X_{active}/X_{total}}{K_{ac} + X_{active}/X_{total}}$$

Cette expression représente mieux une cinétique enzymatique que la loi de premier ordre que nous avons utilisée.

La même approche de cinétique enzymatique a été proposée pour décrire la synthèse de protéines [26]. Cette cinétique tient compte de l'ATP, comme nous l'avons proposé dans le modèle, mais aussi du pool d'acides aminés disponibles dans la cellule (biomasse inactive). La vitesse de synthèse des protéines est donnée par :

$$R_{syn} = K_{syn} * X_{active} * \frac{X_{inerte}/X_{total}}{K_{in} + X_{inerte}/X_{total}} * \frac{ATP}{K_{ATP} + ATP}$$

Enfin, le modèle pourrait être amélioré au niveau de l'énergie de maintenance en prenant en compte la quantité d'ATP dépensée pour cette synthèse protéique.

Malgré ces simplifications, des simulations correctes ont été obtenues. Sous sa forme actuelle, le modèle peut être exploité de plusieurs façons. Premièrement, on a pu montrer l'intérêt de l'approche mécanistique en validant les bilans de matière et d'énergie cellulaire. Ceci nous a permis d'obtenir des profils d'ATP et de NADH en accord avec des résultats expérimentaux de la littérature [12]. Deuxièmement, nous avons mis en évidence la nécessité d'une approche structurale pour la modélisation du comportement de la levure, et notamment la modélisation des phénomènes de latence, d'accélération et les mécanismes d'adaptation à différents substrats. Ensuite, nous avons pu valider les hypothèses de la variation de la maintenance et de l'effet de l'activation du shunt glyoxylique qui réduit l'activité respiratoire lorsque la levure croît sur éthanol. Enfin, l'obtention de bonnes simulations, en ajustant les paramètres du modèle, fournirait des informations complémentaires aux mesures expérimentales et permettrait d'utiliser l'ensemble de ces données pour une meilleure identification avec des techniques d'optimisations appropriées.

NOMENCLATURE :

Ac-CoA :	concentrations intracellulaires d'acétyl-CoA, $\mu\text{mole/gMS}$,
ATP :	concentrations intracellulaires d'ATP, $\mu\text{mole/gMS}$,
C _{Ac-CoA} :	concentrations intracellulaires d'acétyl-CoA, mole/gMS,
C _{ATP} :	concentrations intracellulaires d'ATP, mole/gMS,
C _{NADH} :	concentrations intracellulaires d'équivalent NADH, mole/gMS,
E :	concentration en éthanol, g/l,
G :	concentration en glucose, g/l
K ₁ :	constante de saturation pour le glucose, g/l,
K ₂ :	constante de saturation pour l'ATP intracellulaire, $\mu\text{mol/gMS}$,
K ₃ :	constante d'inhibition par l'éthanol, g/l,
K ₄ :	coefficient homotropique positif associé au pyruvate,
K ₅ :	constante de saturation associée au pyruvate, $\mu\text{mol/l}$,
K ₆ :	constante de saturation associée au NADH, $\mu\text{mole/gMS}$,
K ₇ :	constante d'inhibition par l'éthanol, g/l,
K ₈ :	constante de saturation associée au pyruvate, Pyr $\mu\text{mol/l}$,
K ₉ :	constante d'inhibition par l'acétyl-CoA, en $\mu\text{mol/gMS}$,

K10 :	constante de saturation associée à l'éthanol, en g/l,
K11 :	constante d'inhibition par l'éthanol, E,
K13 :	constante de saturation associée à l'acétyl-CoA intracellulaire, $\mu\text{mol/gMS}$,
K14 :	constante de saturation associée au NADH, $\mu\text{mole/gMS}$,
K15 :	constante de saturation associée à l'ATP, $\mu\text{mole/gMS}$,
K16 :	constantes de saturations associées à l'acétyl-CoA, $\mu\text{mole/gMS}$,
K17 :	constantes de saturations associées à l'ATP, $\mu\text{mole/gMS}$,
K18 :	constante d'inhibition par l'éthanol, E,
K _{ATP} :	constante de saturation associée à l'ATP, $\mu\text{mole/gMS}$,
K _G :	constante de saturation en glucose, g/l,
K _{pr} :	constante de réaction, h ⁻¹ ,
K _{syn} :	constante de réaction, h ⁻¹ ,
NADH :	concentrations intracellulaires d'équivalent NADH, $\mu\text{mole/gMS}$,
Pyr :	concentration totale en pyruvate, $\mu\text{mole/l}$,
q _{ATP} ^m :	vitesse spécifique maximale d'hydrolyse d'ATP, mole/gMS/h,
q _{E1} ^m :	vitesse spécifique maximale de production d'éthanol, gEthanol/gMS/h,
q _{E2} ^m :	vitesse spécifique maximale d'assimilation de l'éthanol, gEthanol/gMS/h
q _G ^m :	vitesse spécifique maximale d'assimilation du glucose, gGlucose/gMS/h,
q _{O2} ^m :	vitesse spécifique maximale de consommation d'oxygène, g/gMS/h
q _{pyr} ^m :	vitesse spécifique maximale de déshydrogénation du pyruvate, gAc-CoA/gMS/h,
q _{resp} ^m :	vitesse spécifique maximale d'oxydation de l'acétyl-CoA, gAc-CoA/gMS/h,
R _{ATP} :	vitesse d'hydrolyse d'ATP, mole /l/h
R _{E1} :	vitesse de production d'éthanol, gEthanol/l/h,
R _{E2} :	vitesse de consommation d'éthanol, g/l/h,
R _G :	vitesse d'assimilation du glucose, gGlucose/l/h,
R _{O2} :	vitesse d'assimilation de l'oxygène, g/l/h,
R _{pr} :	vitesse de protéolyse, gMS/l/h,
R _{pyr} :	vitesse de déshydrogénation du pyruvate, g d'équivalent Ac-CoA/gMS/h,
R _{resp} :	vitesse d'oxydation de l'acétyl-CoA, g/l/h,
R _{syn} :	vitesse de synthèse de biomasse active à partir de la biomasse inerte X _i , gMS/l/h,
R _{tot} :	vitesse totale de synthèse de biomasse active X _g + X _e + X _m , gMS/l/h,
R _X :	vitesse de croissance, gMS/l/h,
R _{Xe} :	vitesse de synthèse X _e , gMS/l/h,
R _{Xg} :	vitesse de synthèse X _g , gMS/l/h,
R _{Xm} :	vitesse de synthèse X _m , gMS/l/h,
X _e :	biomasse assurant l'assimilation et de la croissance sur éthanol, gMS/l
X _g :	biomasse assurant la glycolyse et la production d'éthanol, gMS/l,
X _i :	biomasse enzymatiquement inactive, gMS/l
X _m :	biomasse assurant la respiration mitochondriale, gMS/l,

SYMBOLES :

α :	fraction de X _m par rapport à X _g + X _e + X _m ,
β :	fraction maximale, lorsque ϕ est égal à 0, de X _e par rapport à X _g + X _e + X _m
ϕ :	fonction de régulation par le glucose, du type : $\phi = \frac{G}{KG+G}$,
μ^m :	vitesse spécifique maximale de croissance, h ⁻¹ ,

REFERENCES :

- 1- Bailey, J. E., Ollis, D. F., "Transport across cell membranes", in "Biochemical engineering fundamentals", McGraw-Hill Inc., 2nd ed., (1986) pp 263-265 .
- 2- Barford, J. P., "A general model for aerobic yeast growth. Part I: Batch growth, part II: Continuous culture", *Biotechnol. Bioeng.*, 35 (1990) 907-927.
- 3- Cooney, C. L., Wang, D. I. C., Mateles, R. I., "Measurement of heat evolution and correlation with oxygen consumption during microbial growth", *Biotechnol. Bioeng.*, 11 (1968) 269-283.
- 4- D'amore, T., Stewart, G., "Ethanol tolerance of yeast", *Enzy. Microb. Technol.* 9 (1987) 322-330.
- 5- Dasari, G., Worth, M. A., Connor, M.A., Pamment, N. B., "Reasons for the apparent difference in the effects of produced and added ethanol on culture viability during rapid fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 109-122.
- 6- Dekkers, J. G. J., De Kok, H. E., Roels, J. A., "Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 426 : Comparison of anaerobic and aerobic glucose limitation", *Biotechnol. Bioeng.*, 23 (1981) 1023-1035.
- 7- Fuhrmann, G., F., Völker, B., "Regulation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Biotech.* 27 (1992) 1-15.
- 8- Gancedo, C., Serrano, R., "Energy-yielding metabolism", in "The Yeasts", 2nd ed., Rosa, A. H., Harrison, J. S., Eds. U.S.A. Acad. Press Inc., 3 (1989) 220-245.
- 9- Grosz, R., Stephanopoulos, G., "Physiological, biochemical and mathematical studies of micro-aerobic continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* . Part I,II and III. *Biotechnol. Bioeng.*, 36 (1990) 1006-1040.
- 10- Haarasilta, S., Oura, E., "On the activity and regulation of anaplerotic and gluconeogenic enzymes during the growth process of baker's yeast", *Eur. J. Biochem.*, 52 (1975) 1-7.
- 11- Kilian, S. G., du Preez, J. C., Gericke, M., "The effects of ethanol on growth rate and passive proton diffusion in yeasts", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 (1989) 90-94.
- 12- Krallish, I. L., Damberg, B. E., Beker, M. J., "State of adenosine phosphates during dehydration of yeast", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31 (1989) 194-199.
- 13- Lopez, S., Gancedo, T., "Effect of metabolic conditions on protein turnover in yeast", *Biochem. J.*, 178 (1979) 769-776.
- 14- Mosrati, R., Fonteix, C., Marc, I., "Considérations fonctionnelles du rôle de l'ATP et du NADH pour la modélisation du métabolisme et de la croissance de *S. cerevisiae*", (en cours).
- 15- Mosrati, R., Fonteix, C., Marc, I., "Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur discontinu aéré II. : Croissance sur éthanol, stœchiométrie et énergie cellulaire", (en cours).
- 16- Mosrati, R., Ghoul, M., Fonteix, C., Marc, I., "Culture de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur discontinu aéré I. : Croissance sur glucose, flux de carbone et énergie cellulaire", (en cours).
- 17- Munack, A., Thoma, M., "Application of modern control for biotechnological processes", *I.E.E. Proc.*, 133 (1986) 194-198.

- 18- Oura, E., "Reactions leading to the formation of yeast cell material from glucose and ethanol", Alkon Keskus Laboratorio report 8078, Helsinki (1972).
- 19- Pamment, N., B., Hall, R., J., Barford, J., P., "Mathematical modelling of lag phases in microbial growth", *Biotech. Bioeng.*, 20 (1978) 349-381.
- 20- Postma, E., Verduyn, C., Sheffers, W. A., van Dijken, J. P., "Enzymatic analyse of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat culture of *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Envir. Microbiol.*, Feb (1989) 468-477.
- 21- Rajab, A., "Un modèle physiologique de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur continu et discontinu", Thèse - Docteur ingénieur INPL-Nancy, France (1983).
- 22- Rajab, A., Engasser, J.-M., Germain, P., Miclo, A., "A physiological model of yeast growth", IIIrd Eur. Congr. Biotech., Munchen FRG, 2 (1984) 10-14 Sept., 43-48.
- 23- Roels, J. A., "Energetics and kinetics in biotechnology", Elsevier Biomedical Press, Ads. Elsevier Inc. Amsterdam - New York - Oxford (1983).
- 24- Sebastian, J., Mian, F., Halvorson, H. O., *Febs. letters* Vol34, N° 2, (1973).
- 25- Sonnleitner, B., Käppeli, O., "Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controled by its limited respiratory capacity : formulation and verification of a hypothesis", *Biotech. Bioeng.*, 28 (1986) 927-937.
- 26- Steinmeyer, D., E., Shuler, M., L., "Structured model for *Saccharomyces cerevisiae*", *Chem. Eng. Scien.*, 44 (1989) 2017-2030
- 27- Stouthamer, A. H., "A theoretical study on the amount of ATP required for the synthesis of microbial cell material", *Antonie van Leeuwenhoek*, 39 (1973) 537-545.
- 28- Sweere, A., P., J., Giesselbach, J., Barendes, R., de Krieger, R., Honderd, G., Luyben, C., A., M., "Modelling the dynamic behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* and its application in control experiments", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 (1988) 116-127.
- 29- Warner, J., R., Gorenstien, C., "Yeast has a true stringent response", *Nature.*, 275 (1978) 338-339.

PARTIE 3

SOMMAIRE

Recherche Analytique des Conditions de conduite Optimale d'une fermentation semi-continue de levure.....	126
RESUME.....	126
I. INTRODUCTION.....	126
II. LE MODELE.....	127
III. RECHERCHE ANALYTIQUE DES CONDITIONS OPTIMALES.....	128
IV. COMMANDE OPTIMALE.....	129
V. SIMULATIONS.....	130
VI. CONCLUSION.....	132
REFERENCES.....	132
Contrôle d'une fermentation semi-continue de levure à l'aide d'une Commande Prédicative.....	134
RESUME.....	134
I. INTRODUCTION :.....	134
II. METHODOLOGIE GENERALE ET THEORIE	135
DE LA COMMANDE UTILISEE	135
II. 1. Simulation	135
II. 2. Commande prédictive	136
II. 3. Elaboration du modèle	137
II. 4. Conditions de simulation	138
III. RESULTATS ET DISCUSSION	138
III. 1. Application de la commande en l'absence de perturbations.....	138
III. 2. Augmentation de 25% de l'horizon de prédiction.....	138
III. 3. Réponse de la commande dans le cas d'une perturbation en concentration de l'alimentation.....	139
III. 4. Réponse de la commande dans le cas d'une perturbation en débit de l'alimentation.....	139
III. 5. Comparaison des productivités et des rendements de croissance	141
IV. CONCLUSION.....	141
REFERENCES.....	143
Fuzzy Control of baker's yeast fed-batch bioprocess : a Robustness Study.....	145
ABSTRACT	145

I. INTRODUCTION.....	145
II. EXPERT KNOWLEDGE.....	146
II. 1. Knowledge of the glucose metabolism of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	146
II. 2. Knowledge of the process.....	147
III. SIMULATION OF THE YEAST PRODUCTION FED-BATCH PROCESS	148
IV. OPTIMAL PROCESS CONTROL FOR BIOMASS PRODUCTION.....	150
V. FUZZY PROCESS CONTROL	150
V. 1. Construction of the Fuzzy Controller	151
V. 2. Process control	153
V. 3. Validation of the linguistic control model.....	153
V. 4. Fuzzy controller robustness	155
VI. CONCLUSION.....	158
REFERENCES.....	159

INTRODUCTION :

La haute complexité et la forte non-linéarité des systèmes microbiens sont les principales difficultés de la mise en œuvre à l'échelle industrielle. En effet, outre les aspects techniques (stérilité, équipements, conception et dimensionnement du réacteur, opérations de transfert...), la conduite des cultures nécessite une attention particulière puisqu'elle représente le cœur du procédé. Afin de contrôler son évolution, selon une stratégie précise, les conditions physico-chimiques de la bioconversion sont soumises à des régulations et contrôles divers (température, oxygène dissous, pH, agitation, alimentation en différents substrats...). La réussite de l'opération, dans sa globalité, va dépendre de l'efficacité des régulations utilisées.

C'est le cas du procédé semi-continu de production de levure. Le réacteur, initialement ensemencé par des levures, est alimenté progressivement par un milieu riche en glucose. L'objectif est d'aboutir au meilleur rendement de conversion du glucose en biomasse, sous la contrainte d'une productivité maximale. La particularité de ce procédé est que la levure peut fermenter le glucose en éthanol. Si tel est le cas, ceci conduit à une chute considérable du rendement en biomasse et de la productivité. Pour éviter la dérive du procédé vers la fermentation alcoolique, il faut conduire la culture dans des conditions d'aération suffisante et alimenter le réacteur de manière à ce que les concentrations du glucose résiduel soient très faibles, de l'ordre de 0,1 à 0,5 g/l selon les souches. Mais aussi, il faut qu'il y est suffisamment de glucose pour une croissance rapide. A ce sujet, les industriels ont acquis le savoir-faire nécessaire pour mener à bien ce type de procédé. Cependant, des améliorations peuvent encore être apportées par des techniques nouvelles de commande.

C'est dans ce cadre que se situe cette dernière partie de la thèse, où :

- nous montrerons l'intérêt des modèles de connaissance de type physiologiques en tant qu'outil d'aide au choix d'une stratégie de conduite et pour la mise au point et la comparaison de commandes,
- nous mettrons au point et comparerons trois types de commandes dites à modèles internes : Proportionnelle, Intégrale et Dérivée (PID), la Commande Prédictive Généralisée (GPC) et la Commande Floue (FC).

Dans toute cette partie, nous avons utilisé un modèle physiologique pré-existant proposé par Rajab¹ puis par Dantigny². Ce travail s'est développé parallèlement au travail expérimental et de modélisation décrit dans la première et la deuxième partie de ce mémoire. De ce fait, le nouveau modèle proposé n'a pu être utilisé dans le cadre de l'étude concernant les commandes.

¹ Rajab, A., "Un modèle physiologique de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur continu et discontinu", Thèse de Docteur ingénieur INPL-Nancy, France (1983).

² Dantigny, Ph., "Cinétique, modélisation de la croissance de *Saccharomyces cervisiae*, commandes non-linéaires de type L/A d'un procédé semi-continu", Thèse de Docteur de l'INPL-Nancy, France (1989).

Recherche Analytique des Conditions de conduite Optimale d'une fermentation semi-continue de levure.

MOSRATI R., FONTEIX C. et MARC I.
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique
- C.N.R.S. - E.N.S.I.C. - E.N.S.A.I.A.
1, rue Grandville - B.P. 541 - 54001 NANCY-CEDEX.

Récents Progrès en Génie des procédés, Lavoisier, Paris.
"Mesure-Capteur-Simulation-Commande", Vol. 5 (1991) 275-280

RESUME:

Un modèle, précédemment proposé, concernant *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation aérobie a été étudié dans le but d'établir une stratégie de conduite optimale. L'identification et la résolution des équations clés du modèle, relatives à l'objectif prédéfini, ont été effectuées. Il en résulte que le contrôle du glucose à une concentration de 0,07 g/l est la conduite optimale à réaliser. La commande, satisfaisant cette consigne sur le glucose, a été calculée à partir du bilan de matière sur ce substrat. Les simulations du procédé montrent l'intérêt de cette approche et celui des modèles physiologiques. Ainsi, une vitesse spécifique de croissance égale à 0,264 h⁻¹ a été obtenue constante au cours de la culture simulée. Le glucose étant rigoureusement maintenu à sa concentration optimale, des production et productivité de biomasse élevées, respectivement 145 g/l et 5,8 g/l/h, ont été atteintes au bout de 25 h de culture.

I. INTRODUCTION:

Une meilleure connaissance des processus physiologiques et des procédés de fermentations permet de définir les mécanismes de régulations des voies métaboliques en vue d'une meilleure exploitation des microorganismes. Cette connaissance est particulièrement utile quand elle prend la forme de modèles, pour plusieurs raisons :

- * la représentation mathématique des processus permettra l'utilisation des méthodes d'optimisation, de contrôle et de commande adéquates,

- * la modélisation prend en compte les mécanismes clés régissant le comportement du microorganisme, et fournit donc l'information nécessaire sur l'état du procédé,

- * un modèle, suffisamment élaboré, intègre les limites physiologiques et génétiques du microorganisme. La connaissance de ces limites permet d'anticiper sur l'efficacité du procédé et de définir la stratégie de conduite optimale correspondante.

Actuellement, l'amélioration des bioprocédés se heurte, essentiellement, à deux problèmes. Le premier est l'aptitude limitée de certains modèles (empiriques ou uniquement des bilans de matières) à représenter correctement les processus et, en particulier, les réactions des

microorganismes, d'où le manque d'information nécessaire. Le second est relatif à la complexité des méthodes de l'automatique, appropriées aux systèmes non linéaires et, notamment, les systèmes biologiques. Un exemple classique de ces bioprocédés est celui de la production de la levure de boulangerie en réacteur semi-continu. Plusieurs travaux, rapportés dans la littérature [1,13,17,18], illustrent les difficultés rencontrées et montrent que malgré la diversité des méthodes d'optimisation, de contrôle et de commande les résultats obtenus sont pratiquement les mêmes avec des productivités relativement faibles.

Ce procédé a fait l'objet de nombreuses études fondamentales. Ces dernières s'accordent sur le fait que la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* implique trois voies métaboliques centrales où l'une prédomine relativement les deux autres selon les conditions physico-chimiques environnantes [8,10,15,16]. Ces trois voies métaboliques caractérisent : la respiration du glucose, sa fermentation en éthanol et la respiration de ce dernier. Cependant, différentes formulations mathématiques ont été proposées [4,5,9,11,12,15]. Rajab [12] a proposé un modèle qui s'appuie sur une approche semi-structurale en dosant les enzymes clés des trois voies métaboliques précédemment décrites. Cette approche tient compte des remaniements enzymatiques nécessaire et intègre le phénomène de limitation de la capacité respiratoire de la levure. Ce modèle simule correctement les cultures continues et discontinues de *S.cerevisiae*.

L'objet de cette contribution est de montrer l'intérêt des modèles suffisamment élaborés, notamment physiologiques, dans la recherche et la définition de la stratégie de conduite optimale d'un bioprocédé. Ce travail traite le cas de la production de levure de boulangerie selon le modèle de Rajab [12], validé sur la souche étudiée par Dantigny [7].

II. LE MODELE :

La croissance de la levure *S. cerevisiae* est représenté par la combinaison de trois états physiologiques limites (X_1 , X_2 , X_3). Le passage d'un état à l'autre s'opère suivant des lois d'activation de type michaelien et/ou d'inhibition (figure 1). Deux états de la biomasse utilisent le glucose : l'un est respiratoire (X_1), l'autre est fermentaire (X_2) et conduit à la formation d'éthanol. Le troisième état (X_3) est celui de la respiration de l'éthanol.

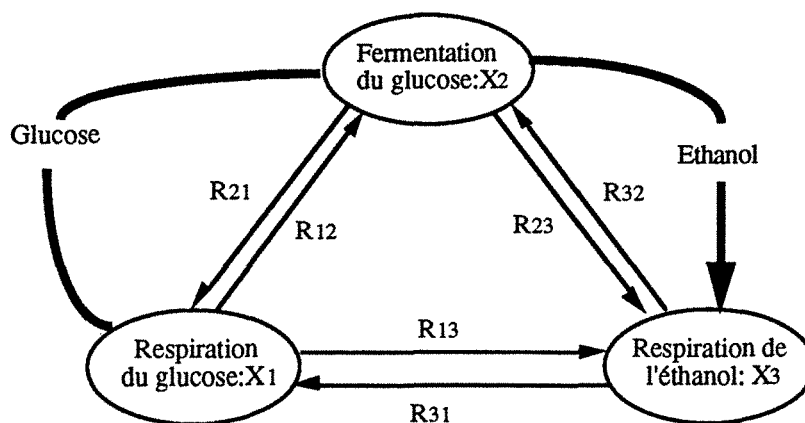


Figure 1 : Représentation schématique du modèle de Rajab [12].

avec :

$$R_{12} = 0,1 X_1 Q(\text{Glc})$$

$$R_{21} = 2 X_2 [1 - Q(\text{Glc})]$$

$$R_{13} = 0,4 X_1 \text{Eth} / (0,5 + \text{Eth})$$

$$R_{31} = 2 X_3 \text{Glc} / (0,05 + \text{Glc})$$

$$R_{23} = 0,2 X_2 [1 - Q(\text{Glc})] \text{Eth} / (0,2 + \text{Eth})$$

$$R_{32} = 0,5 X_3 \text{Glc} / (0,01 + \text{Glc})$$

$$Q(\text{Glc}) = [\text{Glc} / 0,1] / (1 + [\text{Glc} / 0,1])$$

où X_1 , X_2 et X_3 correspondent aux concentrations (g/l) de biomasses représentatives de chaque état physiologique,
 Glc : concentration en glucose, en g/l,
 Eth : concentration en éthanol, en g/l,
 $Q(\text{Glc})$: fonction modélisant la répression catabolique par le glucose à une concentration critique de 0,1 g/l.

Les vitesses de changement d'état R_{ij} traduisent l'adaptation progressive de la biomasse à son environnement. Ces vitesses prennent en compte, également, la limitation de la capacité respiratoire représentée par la fonction $Q(\text{Glc})$.

III. RECHERCHE ANALYTIQUE DES CONDITIONS OPTIMALES :

La respiration du glucose est l'état physiologique, X_1 , qui permet d'atteindre le meilleur rendement de production de biomasse, soit 0,5 gramme de levure sèche produite par gramme de sucre consommé. Cet état est obtenu pour des concentrations en glucose inférieures à des valeurs seuil variant de 0,1 à 0,5 g/l selon les souches. Cette valeur critique est déterminée par l'expérience [7,11,14]. Dans le cas de la souche étudiée, la concentration critique du glucose est de 0,1 g/l [7,12].

L'analyse des équations du modèle, en particulier les mécanismes de transition, suggère que la dynamique des états physiologiques ait le rôle le plus important dans le choix de la stratégie de conduite du procédé : les vitesses de changements d'état physiologique R_{ij} sont fonction des variables d'état du procédé (X_1 , X_2 , X_3 , Glc, Eth). Plus précisément, le glucose et l'éthanol jouent des rôles régulateurs au niveau de la cinétique de transition. Il est, alors, facile de déduire que les équations clés du modèle pour l'optimisation du procédé sont celles qui représentent la dynamique des états physiologiques.

Ainsi, pour favoriser la respiration du glucose, il est nécessaire de maximiser les vitesses R_{21} et R_{31} , et plus précisément, optimiser les fonctions de régulations correspondantes F_{21} et F_{31} . Ces fonctions, déduites des expressions de R_{21} et R_{31} , sont les suivantes :

$$F_{21} = 1 - Q(\text{Glc}) = 10 / (10 + \text{Glc})$$

$$F_{31} = \text{Glc} / (0,05 + \text{Glc})$$

Or, ces fonctions, F21 et F31, ne dépendent que de la concentration du milieu en glucose. F21 est inhibée par ce dernier, inversement, F31 est activée. Il est donc logique de chercher un compromis entre ces deux régulations à tendances opposées, de sorte que la solution minimise une fonction coût donnée. Notons que ces deux fonctions sont adimensionnelles et varient dans l'intervalle [0,1]. La fonction objective "J" est donc la somme des carrés pondérés des compléments à "1" de F21 et F31 :

$$J = \alpha[1 - F21]^2 + \beta[1 - F31]^2$$

Les coefficients α et β sont choisis égaux à 1 de manière que la solution soit dans l'intervalle [0, 0,5]. Minimiser la fonction coût "J" revient à annuler sa dérivée par rapport au glucose. L'expression de cette dérivée est la suivante :

$$dJ / dGlc = 200 Glc (0,05+Glc)^3 - 5.10^{-3} (1+10 Glc)^3$$

La solution, 0,07 g/l, de l'équation $dJ/dGlc=0$ représente la concentration optimale en glucose. Cette solution, 0,07 g/l inférieure à la concentration critique de 0,1 g/l, est unique. Une stratégie de conduite optimale est déduite à partir de ce résultat ; c'est le contrôle de la concentration du glucose à une valeur de consigne égale 0,07 g/l.

Ainsi, l'optimisation du procédé est ramené à un problème classique de contrôle de la concentration du glucose autour d'un point de consigne donné.

IV. COMMANDE OPTIMALE :

Le principe est de calculer, à partir du modèle réel et complet, le taux de dilution optimal qui compense la quantité de glucose assimilée et maintient la concentration de ce dernier constante à 0,07 g/l. La commande qui vérifie ces conditions est obtenue en appliquant la théorie de l'état quasi stationnaire sur le bilan de matière en glucose :

$$dGlc / dt = Rs + (Glc_e - Glc) D$$

Rs : vitesse totale de consommation du glucose (g/l/h), Rs est négative,

Glc_e : concentration du glucose dans la solution d'alimentation (g/l),

Glc : concentration du glucose dans le réacteur (g/l),

D : taux de dilution (h⁻¹), variable de commande.

Quand la consigne est atteinte, l'état stationnaire sur le glucose est appliquée :

$$dGlc / dt = 0$$

On en déduit le taux de dilution optimal (D_{op}) correspondant :

$$D_{op} = - R_s / (Glc_e - Glc_c)$$

Glc_c est la consigne sur le glucose, et la vitesse R_s est calculée à partir du modèle.

Dans le cas où le glucose est supérieur à sa consigne, la commande est nulle. Le débit est restauré quand la consigne est de nouveau atteinte.

V. SIMULATIONS :

L'intégration du modèle a été effectuée de sorte que la consigne sur le glucose (0,07 g/l) soit réalisée à tout instant du calcul selon la commande proposée (Figures 2a,2b,2c,2d). Une production de 145 g/l de biomasse et une productivité de 5,8 g/l/h finales ont été atteintes au bout de 25 heures de culture. La vitesse spécifique de croissance, au cours de toute l'opération, est restée constante à 0,264 h⁻¹. Très peu d'éthanol a été produit, sa concentration n'a jamais dépassé 0,08 g/l. Ces résultats traduisent les performances maximales de la souche étudiée dans le cadre de ce procédé. Dans la littérature [2,3,6,19], seul 30-40% de ces performances sont atteints.

Afin de vérifier l'optimalité de la consigne 0,07 g/l de glucose, deux autres simulations ont été réalisées avec la même lois de commande à deux autres points de consigne. La première est effectuée à 0,2 g/l et la seconde à 0,03 g/l. Les résultats de ces simulations sont reportés, respectivement dans les figures 2e et 2f. Bien que ces deux consignes sont voisines de 0,07 g/l, une perte de productivité est mise en évidence dans ces deux cas. Quand la consigne est à 0,2 g/l, il y a production d'éthanol et chute de la production de biomasse. Lorsque la consigne est à 0,03 g/l, l'apport en glucose est insuffisante et conduit à la chute de la vitesse spécifique de croissance.

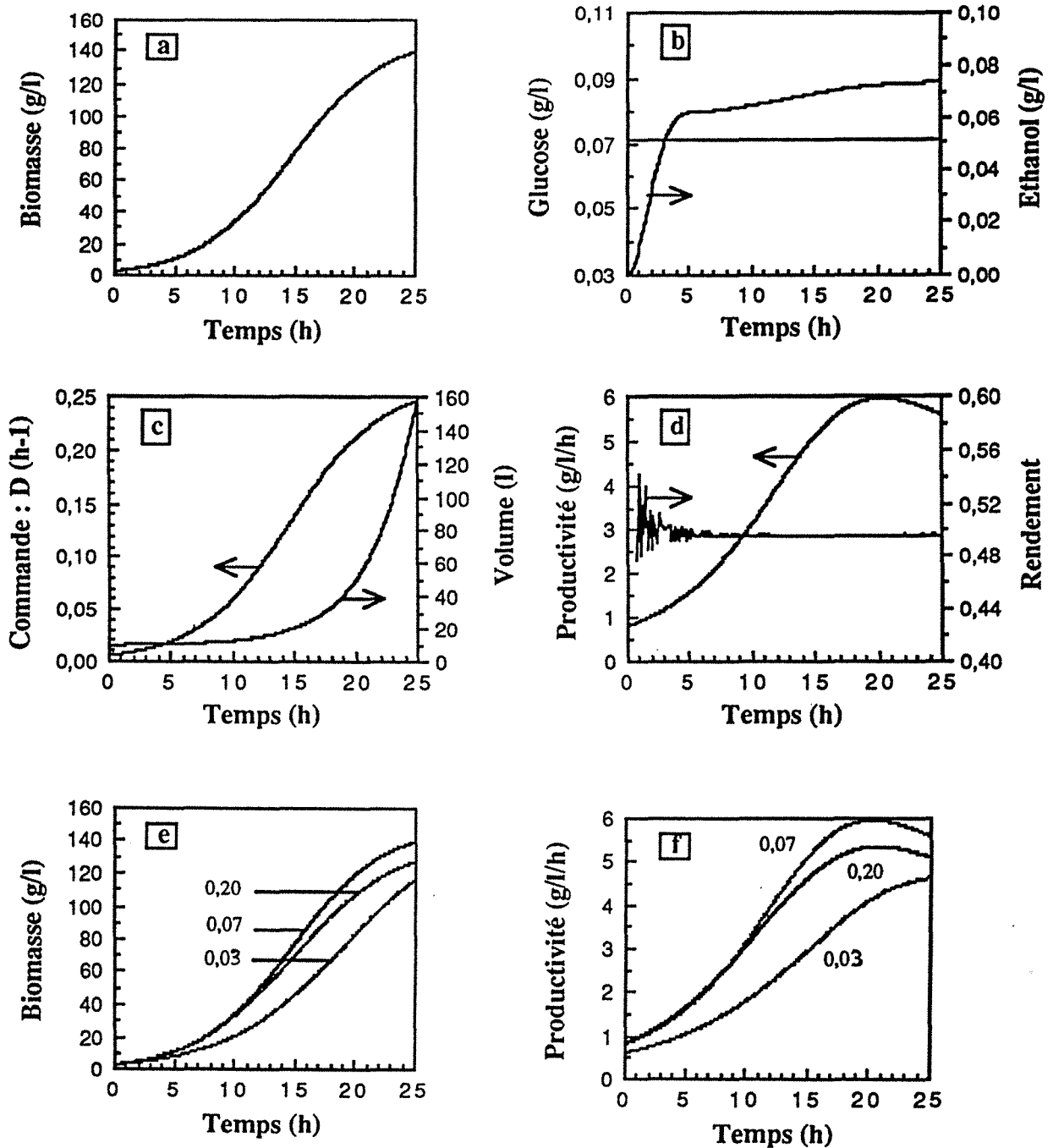


Figure 2 : représentation de l'évolution de la biomasse (a), de l'éthanol et du glucose (b), du taux de dilution et du volume (c), et du rendement et de la productivité (d) pour une consigne sur le glucose égale à 0,07 g/l. Comparaison des production de biomasse (e), et de productivité (f), obtenues sous les consignes 0,03, 0,07 et 0,20 g/l de glucose. Toutes les simulations sont réalisées avec les mêmes conditions initiales : biomasse = 3g/l, volume = 10 l, éthanol = 0 g/l ; le glucose est initialisé à sa consigne.

VI. CONCLUSION :

Le présent travail a été mené dans le but de montrer l'intérêt des modèles biologiques malgré leur complexité. L'exemple de la fermentation aérobie de la levure a été étudié. L'analyse du modèle utilisé a montré que les équations décrivant les phénomènes d'adaptation sont essentielles pour une meilleure maîtrise du procédé étudié. Deux équations clés ont servi à la définition d'une stratégie de conduite optimale d'un réacteur semi-continu pour la production de biomasse. La résolution analytique d'une fonction coût, utilisant ces deux équations, montre que le maintien du glucose à une consigne fixe permet une conduite optimale. Afin de contrôler le glucose, la commande proposée, a conduit à des production et productivité en biomasse élevées. La démarche suivie montre que l'utilisation d'un modèle physiologique et l'analyse des phénomènes métaboliques permettent de définir des commandes simples et performantes.

REFERENCES :

- 1- AIBA S., NAGAI S. et NISHIZAWA Y., "Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* : a perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation", *Biotechnol. Bioeng.*, 12 (1976) 1001-1016.
- 2- AGRAWAL P., KOSHY G. et RAMSEIER M., "An algorithm for operating a fed- batch fermentor at optimum specific-growth rate", *Biotechnol. Bioeng.*, 33 (1989) 115-125.
- 3- AXELSSON J. P., MANDENIUS C. F., HOLST O., HAGANDER P. et MATTIASSON B., "Experience in using an ethanol sensor to control molasses fed-rates in baker's yeast production", *Bioproc. Eng.*, 3 (1988) 1-9.
- 4- BARFORD J.P. et HALL R.J., "A mathematical model for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a saturated respiratory quotient", *Biotechnol. Bioeng.*, 23 (1981) 1735-1762.
- 5- BIJKERK A.H. et HALL R.J., "A mechanistic model of the growth of *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Bioeng.*, 19 (1977) 267-296.
- 6- DAIRAKU K., IZOMOTO E. et MORIKAWA H., "Optimal quality of bakers' yeast fed-batch culture using population dynamics", *Biotechnol. Bioeng.*, 24 (1982) 2661-2674 .
- 7- DANTIGNY Ph., Thèse de Doctorat de l'I.N.P.L., Nancy - France (1989).
- 8- FRALLEIGH S., BUNGAY H. et FIECHTER A., "Regulation of oxidoreductive yeast metabolism by extracellular factors", *J. Biotechnol.*, 12 (1989) 185-198 .
- 9- MARIANI L., MARTELGANI E. et ALBERGHINA L., "Yeast population models for monitoring and control of biotechnical process", *I. E. E. Proc.*, 133 (1986) 210-216.
- 10- POSTMA E., VERDUYN C., SCHEFFERS W. A. et VAN DIJKEN J.P., "Enzymatic analysis of Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Env. Microbiol.*, (1989) 468-471.
- 11- RAJAB A., Thèse de Doctrat d'état, I. N. P. L., Nancy - France (1986).
- 12- RAJAB A., ENGASSER J-M., GERMAIN P. NICLO A., "A physiological model of yeast growth", *Thierd Eur. Congr. Biotechn, Munchen FRD*, 10-14 sept., 2 (1984) 43-48.

- 13- SHIMIZU H., SHIOYA S., SUGA K. et TAKAMATSU T., "Profile control of the specific growth rate in fed-batch experiments, *Appl. Microbiol. Biothechnol.*, 30 (1989) 276-283 .
- 14- SONNLEITNER B. et KÄPPELI O., "Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiration capacity : formulation and verification of a hypothesis", *Biotechnol. Bioeng.*, 28 (1986) 927-937.
- 15- SWEERE A. P. J., GIESSELBACH J., BARENDSE R., de KRIEGER R., HONDERD G. et LUYBEN K.C.A.M., "Modelling the dynamic behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* and its application in control experiments", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28 (1988) 116 - 127.
- 16- VAN DER AAR P.C., VAN VERSVELD H. W. et STOUTHAMER A.H., "Stimulated glycolytic flux increases the oxygen uptake rate and aerobic ethanol production, during oxidoreductive growth of *Saccharomyces cerevisiae* ", *Appl. Envir. Microbiol.*, (1978) 382-389.
- 17- WANG H., COONEY C.L. et WANG D., "Computer-aided baker's yeast fermentations", *Biotechnol. Bioeng.*, 19 (1977) 69-86.
- 18- WILLIAMS D., YOUSEFPOUR P. et WELLINGTON E.M.H., "On-line adaptive control of a fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* ", *Biotechnol. Bioeng.*, 28 (1986) 631-645.
- 19- WOEHRER W. et ROEHR M., "Regulation aspects of bakers' yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures", *Biotechnol. Bioeng.*, 23 (1981) 567-581.

Contrôle d'une fermentation semi-continue de levure à l'aide d'une Commande Prédicative.

C. FONTEIX, R. MOSRATI, I. MARC
CNRS - ENSIC - ENSAIA, B.P. 451, F-54001 NANCY CEDEX

D. MEHDI, C. HUMBERT
CNRS - ESSTIN, Parc Robert Benz, F-54500 VANDOEUVRE-lès-NANCY

Paris, 14-16 Nov. 1990, 2nd International Symposium of Automatic Control of Food Process.

RESUME

L'intérêt d'une commande GPC a été montré dans le cas d'un procédé fortement non linéaire : la production en semi-continu de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce type de commande présente l'avantage d'utiliser une connaissance minimale du procédé, mise sous forme d'un modèle autorégressif. La réponse de la commande à 2 valeurs différentes de l'horizon de prédiction, et à 2 types de perturbation est présentée : échelon de concentration de glucose dans l'alimentation, et coupure temporaire de l'alimentation. La performance de ce type de commande en mono-variable, avec la concentration en éthanol pour seule mesure et seule consigne, est discutée.

I. INTRODUCTION :

L'automatisation des procédés biotechnologiques et agro-alimentaires nécessite la connaissance en temps réel de différents paramètres ou grandeurs spécifiques comme, par exemple, les concentrations en substrats, biomasse, métabolites ou encore les paramètres opératoires. L'estimation de ces grandeurs peut se faire à l'aide d'un nombre restreint de mesures et d'un modèle qui peut être, soit non descriptif de type autorégressif, soit de type physiologique, capable de représenter, notamment, la production de biomasse et de métabolites (1). L'outil mathématique permettant d'effectuer cette opération est généralement un estimateur optimal comme le filtre de Kalman (2).

La commande adaptative correspond à un outil efficace en vue de l'automatisation de nombreux procédés. Ceci semble particulièrement vérifié dans le cas de systèmes complexes tels que les procédés biotechnologiques (3,4). Par ailleurs, la nécessité de produire un maximum de biomasse ou d'un produit peut être réalisée par des algorithmes d'optimisation

(5,6). Pour cela, il est important de disposer de modèles linéaires prédictifs sur une période de temps relativement longue (7,8). La commande G.P.C. est une technique récente qui présente l'avantage d'utiliser un modèle simple de type ARMA (9-12).

La production de levure en réacteur discontinu, puis alimenté par un débit variable en nutriments, notamment en glucose, représente un procédé de fermentation industriellement important. Ce type de procédé sert de base à la mise au point des techniques d'estimation et de commande présentées dans cette étude. L'efficacité de la Commande Prédictive Généralisée a donc été testée en simulation dans différents cas de fonctionnement ou de perturbations.

II. METHODOLOGIE GENERALE ET THEORIE DE LA COMMANDE UTILISEE

II. 1. Simulation

Un modèle physiologique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* (13) permettant de simuler ce type de fermentation, a été utilisé. Ce modèle prend en compte les différents états physiologiques de la levure, fermentation du glucose et respiration du sucre et de l'éthanol, en fonction des conditions opératoires. Il permet de représenter avec une précision suffisante l'évolution des différentes cinétiques rencontrées au cours de l'évolution d'un procédé de production de levure, notamment lors d'un fonctionnement discontinu ou semi-continu. Cependant, ce modèle n'est plus représentatif de la réalité pour des concentrations en biomasse supérieures à 60 g/l, c'est pourquoi nous avons limité notre étude à 30 heures.

La mise au point de la stratégie de commande a été réalisée à partir de simulations du procédé étudié, à l'aide du modèle indiqué. Le modèle fournit les valeurs de concentrations des différentes variables d'état (biomasse, glucose, éthanol) au cours du temps. Cependant, seule la concentration en éthanol est utilisée par la commande proprement dite : le modèle physiologique et les concentrations autres que celle de l'éthanol sont supposés inconnus lorsque l'on met en oeuvre la commande. Ils ne représentent donc qu'une simulation du procédé réel.

Avec le développement des capteurs dans le domaine des fermentations, certaines variables d'état du système peuvent désormais être directement mesurées, ou calculées à partir d'une mesure indirecte corrélée. C'est le cas de la concentration en éthanol. Ici, nous simulons une mesure de la concentration en éthanol, la période d'échantillonnage retenue pour effectuer les pseudo-mesures ayant été fixée à 15 mn. La commande utilise un modèle de type "boîte grise" basé sur l'utilisation de simples bilans de matière qui ne nécessite qu'une seule mesure.

II. 2. Commande prédictive

La commande prédictive généralisée (9,10) a été employée par différents auteurs et s'est montrée performante dans le cas du contrôle de procédés complexes différents des procédés biotechnologiques. Ce type de commande a donc été essayé.

Le principe d'une commande prédictive est de calculer les futures valeurs du paramètre de commande dans une plage de temps donnée, appelée "horizon de contrôle". Ceci est réalisé par minimisation d'une fonction coût J sur un "horizon de prédiction", qui est lui-même supérieur en durée à l'"horizon de contrôle" :

$$J = \sum_{j=k}^N (\psi(t+j) - w(t+j))^2 + \sum_{j=1}^{Nu} L(j)(\Delta u(t+j-1))^2 \quad (1)$$

où : N est l'horizon de prédiction,
Nu est l'horizon de contrôle,
L(j) est le poids affecté au terme de commande
 $\psi(t+j)=P(z^{-1})y(t+j/t)$

$P(z^{-1})$ est une fonction de transfert pouvant être interprétée comme un modèle de référence correspondant à la dynamique moyenne du système :

$$P(z^{-1}) = P_n(z^{-1})/P_d(z^{-1})$$

z^{-1} est l'opérateur retard

Δ est l'opérateur différentiel $1-z^{-1}$

w est la consigne en éthanol

y est l'objectif prédit (la concentration d'éthanol)

et u est la valeur de commande (la pente du taux de dilution).

L'objectif prédit peut être présenté sur l'ensemble de l'horizon de prédiction comme une fonction des commandes futures et des valeurs de y et u, déjà connues. Pour cela, nous avons utilisé un modèle CARIMA (Controlled Auto-Regressive Integrator Moving Average) :

$$A(z^{-1})y(t) = B(z^{-1})u(t-1)+C(z^{-1})\zeta(t)/\Delta \quad (2)$$

dont l'expression a été transformée grâce aux identités :

$$P_n(z^{-1})C(z^{-1}) = E_j(z^{-1})P_d(z^{-1})A(z^{-1})\Delta + z^jF_j(z^{-1}) \quad (3)$$

$$E_j(z^{-1})B(z^{-1}) = G_j(z^{-1})C(z^{-1}) + z^jH_j(z^{-1}) \quad (4)$$

où : $\zeta(t)$ est une séquence aléatoire non corrélée, A, B, C, E_j et F_j sont des polynômes en z^{-1} .

En effet, nous obtenons :

$$\psi(t+j) = (G_j\Delta)u(t+j-1) + (F_j/P_dC)y(t) + (H_j\Delta/C)u(t-1) \quad (5)$$

où : G_j est un polynôme en z^{-1} calculable.

II. 3. Elaboration du modèle

Les bilans de matière concernant le glucose et l'éthanol peuvent être simplement décrits par les équations suivantes :

$$\begin{aligned} \text{pour le glucose,} \quad S_K - S_{K-1} &= S_{in}(t_K - t_{K-1})(D_K + D_{K-1})/2 - \alpha S_{K-1} \\ \text{pour l'éthanol,} \quad E_K - E_{K-1} &= \beta S_{K-1} - \gamma E_{K-1} \end{aligned}$$

où : S_K est la concentration en glucose à l'instant t_K
 S_{in} est la concentration en glucose dans l'alimentation
 $(t_K - t_{K-1})$ est l'intervalle de temps entre deux mesures
 D_K est le taux de dilution à l'instant t_K
 E_K est la concentration en éthanol à l'instant t_K
 α, β, γ sont des paramètres variant lentement au cours du temps.

Ces équations permettent d'aboutir à l'expression (6) :

$$E_K - (2 - \alpha - \gamma)E_{K-1} + (1 - \alpha)(1 - \gamma)E_{K-2} = \beta S_{in}(t_K - t_{K-1})(D_{K-1} + D_{K-2})/2 \quad (6)$$

La variable de contrôle utilisée est $u_K = D_{K+1} - D_K$. Ceci conduit à la définition d'un modèle autorégressif d'un type correspondant à l'équation (2). Par simulations préalables, nous avons pu déterminer les polynômes A, B, C :

$$\begin{aligned} A(z^{-1}) &= 1 - 2.97z^{-1} + 2.94z^{-2} - 0.97z^{-3} \\ B(z^{-1}) &= b(z^{-1} + z^{-2}) \\ C(z^{-1}) &= 1 - cz^{-1}. \end{aligned}$$

Dans ce cas, b est déterminé par une technique adaptative : ce paramètre est maintenu constant si la concentration en éthanol croît, ou multiplié par un coefficient inférieur à 1, dans les autres cas. Par contre, c est calculé par une méthode de type R.P.E. qui minimise l'expression :

$$\lambda c^2 + \sum \varepsilon_i^2, \text{ la sommation se faisant de } i=1 \text{ à } i=K. \quad (7)$$

où λ est une constante et ε , une estimation de ζ . La valeur initiale de c est égale à 0.

$$\begin{aligned} \text{Par ailleurs, } \varepsilon_K - c\varepsilon_{K-1} &= \omega_K \\ \text{avec, } \omega_K &= \Delta(A(z^{-1})E_K - B(z^{-1})u_{K-1}) \end{aligned} \quad (8)$$

En posant $\phi_i = d\varepsilon_i / dc$, et en dérivant l'expression (8) par rapport à c, nous obtenons :

$$\varepsilon_{K-1} = \phi_K - c\phi_{K-1} \quad (9)$$

La dérivation de l'expression (7) par rapport à c conduit à :

$$\lambda c + \sum \varepsilon_i \phi_i = 0 \quad (10)$$

Enfin, en reportant l'équation (9) dans (8) et (10), nous aboutissons à l'algorithme :

$$c_K = (c_{K-1}^2 \sum \phi_i \phi_{i-1} - \sum \omega_i \phi_i) / (\lambda + \sum \phi_i^2) \quad (11)$$

$$\phi_{K+1} = \omega_K + 2c_K \phi_K - c_K^2 \phi_{K-1} \quad (12)$$

II. 4. Conditions de simulation

Dans l'ensemble du travail réalisé, les conditions initiales correspondent à 0,1 g/l de biomasse dans un volume de milieu de culture ne contenant aucune source carbonée. La concentration du glucose dans la solution d'alimentation est de 300 g/l. La consigne correspond à 0,005 g/l d'éthanol. La commande fonctionne avec un horizon de contrôle de 15 mn et un horizon de prédiction de 5 heures, soit, 20 périodes d'échantillonnage.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III. 1. Application de la commande en l'absence de perturbations

La figure (1) présente l'évolution de la concentration en éthanol pendant 30 heures de fermentation semi-continue, par rapport à sa consigne. Nous observons qu'il existe une phase de mise en régime d'environ 15 heures et que la concentration en éthanol n'atteint pas 0,03 g/l. L'évolution des concentrations de biomasse et de glucose est simulée par la figure (2). Nous constatons une production élevée de biomasse de l'ordre de 60 g/l. En outre, la concentration en glucose passe par un maximum de 0,25 g/l. Après une chute rapide, elle se stabilise, au bout de 7 heures, à 0,01 g/l. La figure (3) montre l'évolution des paramètres b et c du modèle autorégressif. L'adaptation de c s'effectue correctement et c reste voisin de 0 durant la majeure partie du temps. Enfin, l'évolution du taux de dilution et du paramètre de commande, u , qui représente son accroissement, est indiquée dans la figure (4). Nous remarquons que le système se comporte correctement pendant les 27 premières heures. Ensuite, apparaît une instabilité, par ailleurs visible sur les concentrations de glucose et d'éthanol, qui se traduit par une variation importante du paramètre c . Cette variation correspond à une limitation de la performance du modèle qui nécessiterait, certainement, une modification du polynôme A .

III. 2. Augmentation de 25% de l'horizon de prédiction

Dans ce qui suit, nous avons, toutes choses égales par ailleurs, augmenté l'horizon de prédiction de 25% correspondant à 25 périodes d'échantillonnage. Sur la figure (5), nous constatons une allure de la variation de la concentration en éthanol semblable à celle de la figure (1). Cependant le maximum est moins élevé, et la valeur sur laquelle elle se stabilise est inférieure à la consigne. Cela indique que la dynamique moyenne du système, symbolisé par

l'expression de $P(z^{-1})$, n'est pas indépendante de l'horizon de prédiction. La figure (6) nous montre que la productivité de biomasse est inférieure à celle obtenue précédemment, la variation de la concentration de glucose restant semblable à celle de la figure (2), mais avec des valeurs toujours inférieures. La figure (7) présente l'évolution des paramètres b et c , c restant toujours proche de 0. Nous ne constatons pas d'instabilité du taux de dilution ni de la commande sur la figure (8) comme dans le cas précédent.

III. 3. Réponse de la commande dans le cas d'une perturbation en concentration de l'alimentation

A 15 heures, nous avons simulé une perturbation de type échelon de la concentration de glucose à l'alimentation, toutes choses égales par ailleurs. Brutalement, nous changeons de bac d'alimentation, la nouvelle concentration en glucose de la solution correspondante étant de 150 g/l, au lieu de 300g/l.

La figure (9) présente l'évolution de la concentration en éthanol par rapport à sa consigne. Nous observons qu'à partir de 15 heures la concentration en éthanol diminue et reste inférieure à sa consigne. L'évolution des concentrations de biomasse et de glucose est simulée par la figure (10). Nous constatons une production moins élevée de biomasse n'atteignant que 30 g/l. En outre, la concentration en glucose chute au moment de la perturbation, puis remonte lentement, sans pour autant rattraper la valeur obtenue dans le premier cas. Le paramètre c réagit simultanément à la perturbation due à une modification dans l'alimentation du substrat carboné comme le montre la figure (11). De même, le palier observé entre 20 et 25 heures concernant le paramètre b , correspond à son adaptation à la nouvelle situation. Nous observons, figure (12), que la perturbation induit une oscillation du paramètre de commande s'amortissant rapidement.

III. 4. Réponse de la commande dans le cas d'une perturbation en débit de l'alimentation

Une perturbation de type créneau est créée après 15 heures, simulant à une panne totale de la pompe d'alimentation durant 1 minute.

Nous constatons que la commande semble répondre correctement jusqu'à 20 heures. Au-delà, nous enregistrons une instabilité visible sur la concentration en éthanol, figure (13), en glucose, figure (14), et en taux de dilution, figure (16). Cette instabilité s'accompagne d'une augmentation importante du paramètre c , comme le traduit la figure (15). Les bornes imposées à c et au paramètre de commande, u , limitent les fluctuations enregistrées après 20 heures.

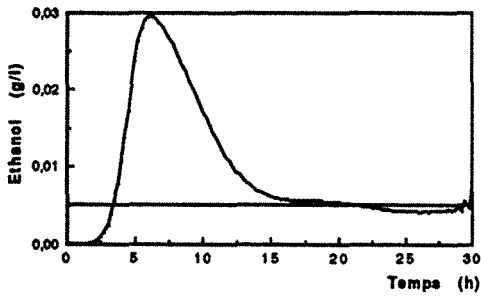


Figure 1 : Evolution de l'éthanol
Cas standard, sans perturbation

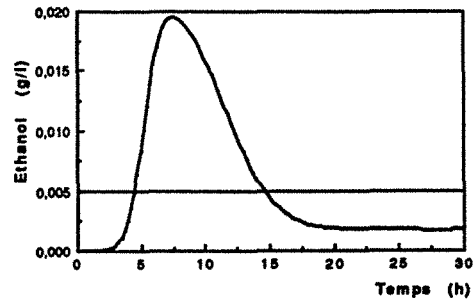


Figure 5 : Evolution de l'éthanol
Cas d'un horizon majoré

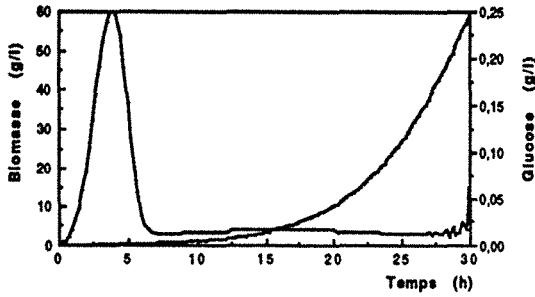


Figure 2 : Evolution de la biomasse et du glucose
Cas standard, sans perturbation

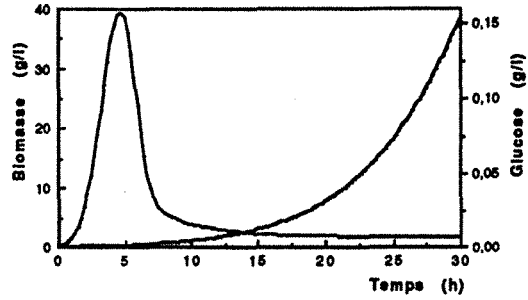


Figure 6 : Evolution de la biomasse et du glucose
Cas d'un horizon majoré

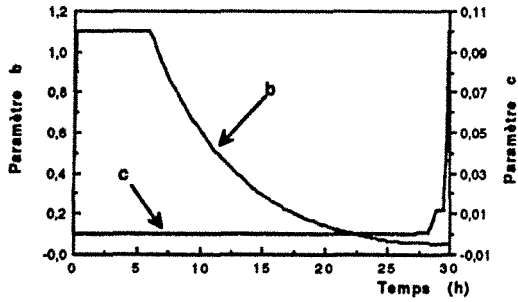


Figure 3 : Evolution des paramètres de la commande
Cas standard, sans perturbation

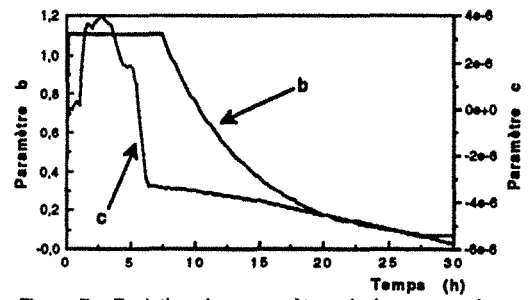


Figure 7 : Evolution des paramètres de la commande
Cas d'un horizon majoré

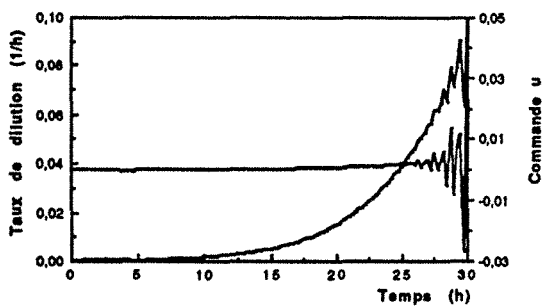


Figure 4 : Evolution du taux de dilution et de la commande
Cas standard, sans perturbation

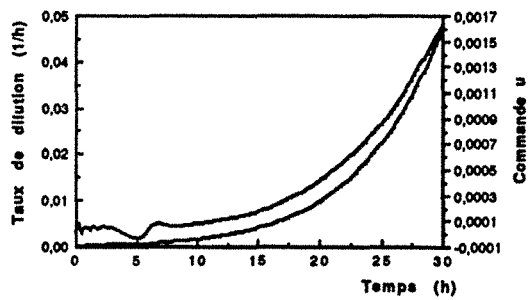


Figure 8 : Evolution du taux de dilution et de la commande u
Cas d'un horizon majoré

III. 5. Comparaison des productivités et des rendements de croissance

Le rendement de croissance est défini comme étant le rapport de la masse sèche de biomasse totale produite à la masse totale de glucose consommé, en g/g. La productivité est définie comme étant le rapport de la masse sèche de biomasse totale produite au volume final, divisé par le temps, en g/l/h. La production par unité de volume initial est identique à la productivité, le volume initial remplaçant le volume final. Toutes ces grandeurs sont calculées après 30 heures de fonctionnement.

La Commande Prédicative Généralisée a permis d'obtenir un rendement de 0,5 g/g, une productivité de 1,96 g/l/h, et une production par unité de volume initial égale à 3,24 g/l/h. Tous ces résultats sont meilleurs que ceux obtenus, dans les mêmes conditions, à l'aide d'une commande PID adaptative (14,15), qui sont respectivement 0,44 g/g, 1,32 g/l/h, et 1,9 g/l/h dans le tableau 1.

	Rendement (g/g)	Productivité (g/l/h)	Production (g/l/h)
GPC sans perturbation	0,50	1,96	3,24
GPC à horizon majoré	0,50	1,28	1,71
Perturbation de concentration	0,50	1,02	1,70
Perturbation de débit	0,54	1,20	1,54
PID adaptatif non perturbé	0,44	1,32	1,90

Tableau 1 : Résumé des grandeurs caractérisant les performances de la fermentation en fonction des propriétés de la commande employée et du type de perturbation.

L'utilisation d'un horizon majoré améliore apparemment la stabilité, mais cela au détriment de la productivité. Les perturbations ont également une influence négative sur la productivité et la production de biomasse.

IV. CONCLUSION

L'intérêt d'une commande GPC a été montré dans le cas d'un procédé fortement non linéaire. Dans notre cas, les résultats obtenus sont très supérieurs à ceux issus d'une commande PID adaptative, aussi bien d'un point de vue du rendement, de la productivité du procédé et de la production de levure. Par ailleurs ce type de commande présente l'avantage d'utiliser une connaissance minimale du procédé, ce qui est intéressant pour les procédés biotechnologiques et alimentaires.

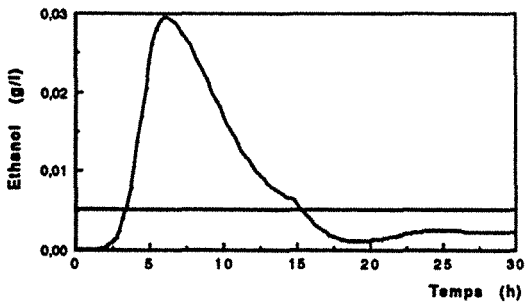


Figure 9 : Evolution de l'éthanol
Cas d'une perturbation de concentration du sucre

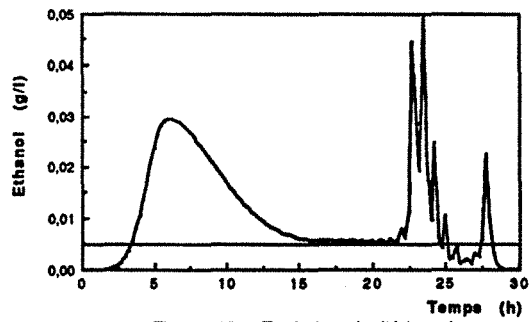


Figure 13 : Evolution de l'éthanol
Cas d'une perturbation du débit d'alimentation

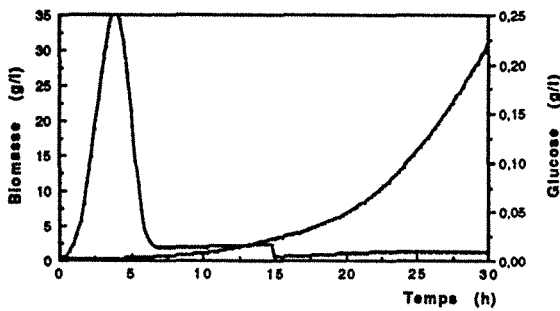


Figure 10 : Evolution de la biomasse et du glucose
Cas d'une perturbation de la concentration en sucre

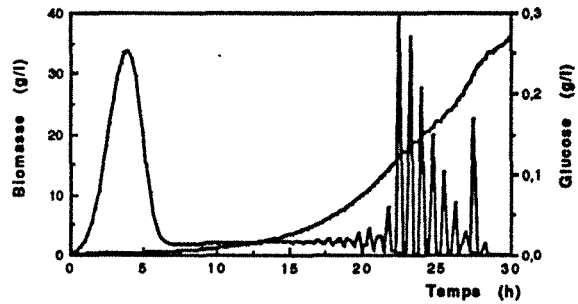


Figure 14 : Evolution de la biomasse et du glucose
Cas d'une perturbation du débit d'alimentation

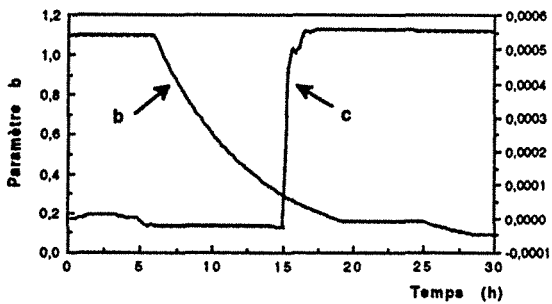


Figure 11 : Evolution des paramètres de la commande
Cas d'une perturbation de la concentration en sucre

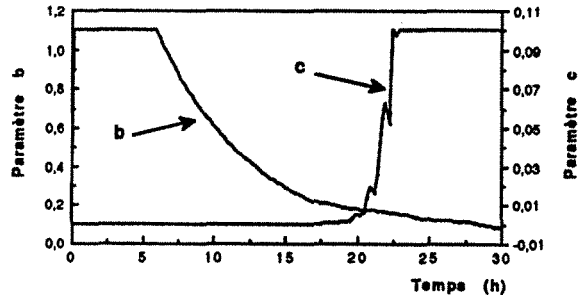


Figure 15 : Evolution des paramètres de commande
Cas d'une perturbation du débit d'alimentation

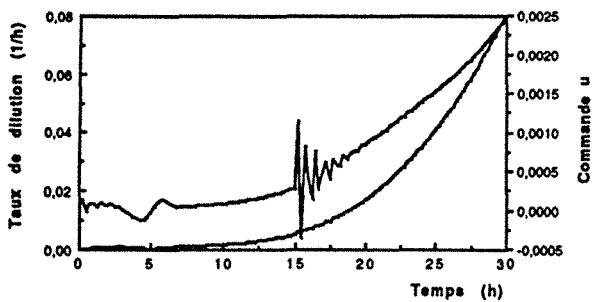


Figure 12 : Evolution du taux de dilution et de la commande u
Cas d'une perturbation de la concentration d'alimentation

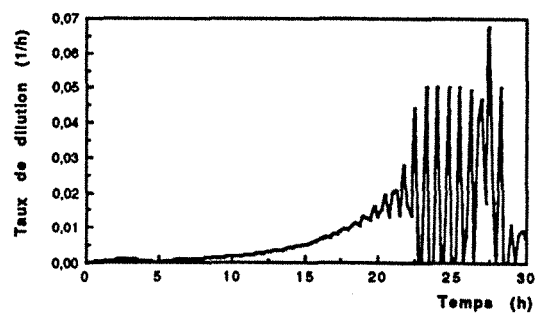


Figure 16 : Evolution du taux de dilution
Cas d'une perturbation du débit d'alimentation

Le choix des horizons de prédiction et de contrôle a une influence non négligeable sur les performances de cette commande. Ainsi, une attention toute particulière doit être apportée à la détermination de leurs valeurs.

La réponse de la commande prédictive à une perturbation échelon de concentration à l'alimentation est intéressante, alors que, dans ces conditions, la commande PID est inopérente, à cause de la structure de son modèle. Par contre une perturbation créneau de débit d'alimentation est mal supportée. Si l'on ne veut pas améliorer ce fait au détriment de la productivité, il convient d'augmenter l'information à la disposition de la commande. Ceci peut être réalisé grâce à la mesure des concentrations de glucose et d'éthanol, associée à l'utilisation de GPC multi-variable.

La variation du paramètre c de la commande, est liée à l'erreur induite par le modèle autorégressif par comparaison aux mesures. Ce paramètre est très sensible au mauvais fonctionnement de la commande et aux perturbations. Il peut en conséquence être utilisé comme détecteur en vue de l'amélioration de la stratégie de commande ou du modèle.

BIBLIOGRAPHIE

1. CHLAMILOTHORIS, G., Techniques adaptatives pour le suivi et la conduite des processus de fermentation, Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 1987.
2. NAHLIK, J. & BURIANEC, Z., On-line parameter and state estimation of continuous cultivation by extended Kalman filter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28 (1988), 128-134.
3. DUMONT, G.A., MARTIN-SANCHEZ, J.M. & ZERVOS, C.C., Comparaison of an Auto-tuned P.I.D. Regulator and an Adaptative Predictive Control System on an Industrial Bleach Plant, *Automatica*, 25 (1989), 33-40.
4. UTAN, A., A Nonlinear PI(D) Controller, *Can. J. Chem. Eng.*, 67 (1989), 485-493.
5. AGRAWAL, P., KOSHY, G. & RAMSEIER, M., An Algorithm for Operating a Fed-Batch Fermentor at Optimum Specific-Growth Rate, *Biotechnol. Bioeng.*, 33 (1989), 115-125.
6. GOLDEN, M.P. & YDSTIE, B.E., *A.I.Ch.E. Journal*, 35 (1989), 1157-1169.
7. DE KEYSER, R.M.C., VAN DE VELDE, PH.G.A. & DUMORTIER, F.A.G., A Comparative Study of Self-adaptative Long-range Predictive Control Methods, *Automatica*, 24 (1988), 149-163.
8. GARCIA, C.E., PRETT, D.M. & MORARI, M., Model Predictive Control : Theory and practice-a Survey, *Automatica*, 25 (1989), 335-348.

9. CLARKE, D.W., MOHTADI, C. & TUFFS, P.S., Generalized Predictive Control-Part I. The Basic Algorithm, *Automatica*, 23 (1987), 137-148.
10. CLARKE, D.W., MOHTADI, C. & TUFFS, P.S., Generalized Predictive Control-Part II. Extensions and Interpretations, *Automatica*, 23 (1987), 149-160.
11. TSANG, T.T.C. & CLARKE, D.W., Generalised Predictive Control with Input Constraints, *IEE Proc.*, 135 (1988), 451-460.
12. WARWICK, K. & CLARKE, D.W., Weighted Input Predictive Controller, *IEE Proc.*, 135 (1988), 16-20.
13. RAJAB, A., Modélisation et conduite automatique de la fermentation de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat d'état, I.N.P.L., Nancy, 1986.
14. MEHDI, D., HUMBERT, C., FONTEIX, C., BOUDRANT, J., MARC, I., Adaptive self-tuning control of a yeast production process, in *Advanced Information Processing in Automatic Control*, pp. 387-392, Nancy, 1989.
15. FONTEIX, C., MEHDI, D., MOSRATI, R., MARC, I., HUMBERT, C., Modélisation et commande prédictive d'une fermentation semi-continue de levure. Comparaison avec une commande PID., *Récents Progrès en Génie des Procédés*, 3 (1989), 507-512.

Fuzzy Control of baker's yeast fed-batch bioprocess : a Robustness Study.

Mohamed MAHJOUB¹, Ridha MOSRATI²,
Michel LAMOTTE¹, Christian FONTEIX², Ivan MARC²

¹ C.R.A.N.- C.N.R.S., B.P. 239. F-54506. VANDŒUVRE-lès-Nancy-CEDEX.

² L.S.G.C - C.N.R.S. - I.N.P.L., B.P.451. F-54001. NANCY-CEDEX.

Accepted for publication, Aug. 2nd 1993, in Food Research International.

ABSTRACT

The purpose of the investigation is to know if, based on the monitoring of the residual substrate concentration, fuzzy control is an effective way of controlling a fermentation process. The fuzzy controller parameters are given by an expert. Various simulations are made using a knowledge model, first to evaluate the performance of the control for the biomass concentration, and then to analyze how it works in the presence of disturbances. Results show high final productivity and biomass concentration. Despite different disturbances, as the feeding glucose concentration change or the temporary substrate feed-rate increasing, fuzzy controller keeps an excellent process stability and robustness near the set-point. Moreover, these properties are kept good in the case of noisy measurements.

KEYWORDS : Fuzzy logic, algorithm robustness, yeast production, fed-batch process.

I. INTRODUCTION

Bioprocess control runs into a number of difficulties resulting from :

- The nonlinear, nonsteady kinetic properties of the process dynamics as the microorganisms multiply, adapt and change their behavior with time and with the environment. Often, this fact needs a fed-batch or continuous bioprocess setting up. A robust regulator is needed to overcome these difficulties.
- The fact that we do not have full knowledge of the industrial process.
- The fact that there is a lack of sensors providing direct measurements of the system state variables, such as biomass, substrates, metabolites, etc. More often than not sensors are not industrially available or used.

Moreover, fed-batch bioprocess involves particular problems. Substrates or metabolites concentrations are staying constant while others, as biomass, are increasing, during the process run. So, in a few cases, the rapid kinetic rates evolution is implying some stability problems.

The yeast metabolism is sensitive to the residual glucose concentration in the bioreactor (Fraleigh *et al.* 1989, Postma *et al.* 1989). A low glucose concentration is leading to a respiratory glucose metabolism and then to a good yeast growth. A fed-batch bioprocess is well adapted to obtaining best of both productivity and biomass production. Nevertheless, several control strategies can be examined (O'Connor *et al.*, 1992). In fact, the control of this kind of process needs either an on-line monitoring of fermentation state variable as ethanol (Axelsson *et al.*, 1988) or other one, or a state variable estimation as biomass or specific growth rate (Agrawal *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1989). Many works were proposed in literature namely concerning a simple on-line adaptive control (Williams *et al.*, 1986; Shi *et al.*, 1989) or a multivariable one (Williams & Montgomery, 1986). On the other hand, the substrate concentration measurement is preferred because it is a real metabolism control variable opposite to metabolites or RQ. New glucose sensors (Filippini *et al.*, 1991) or filtered liquid autosamplers (Marc *et al.*, 1990) can be used in industrial operating conditions and they are allowing the on-line carbon substrates monitoring.

Fuzzy control (Mamdani & Assilian, 1975; Konstantinov & Yoshida, 1992; Mahjoub *et al.*, 1991) is a simple and efficient way of dealing with these types of difficulties, because it operates through linguistic rules that can cope with nonlinear variations and operate on imprecise or uncertain data. Fuzzy control also has robust qualities and is relatively easy to use.

The objectives are applying fuzzy control to a baker's yeast fed-batch bioprocess concerning the best both productivity and yield of biomass production. The controller has to keep one state variable, residual glucose concentration in the bioreactor, constant to the optimal set-point value and when different perturbations are occurring. More precisely, the aim of this work is to verify the effectiveness and the robustness of the fuzzy control theory in the case of a process simulation. Simulations are realized with the aid of a good physiological model used when no oxygen limitation is observed (Dantigny, 1989). Really, this model has a good potentiality if the biomass concentration is under 70 g/L.

II. EXPERT KNOWLEDGE

II. 1. Knowledge of the glucose metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*.

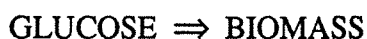
Saccharomyces cerevisiae is a facultative anaerobic yeast, sensitive to a glucose catabolic repression. The nature of the carbon substrate leads the yeast cell using one or another metabolic pathway. Generally, in presence of molecular oxygen, the glucose consumption by the yeast is realized either by a respiratory metabolism in the case of very low glucose concentration or by a fermentative way with ethanol production. The ethanol uptake is always a respiratory phenomenon.

Respiratory metabolism of glucose

Theoretically, the glucose is entirely oxidized and gives high level of energy as ATP synthesis.



In this case,



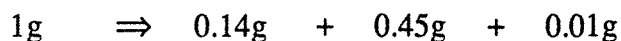
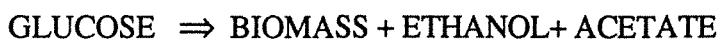
The yeast production yield is maximum; 0.5 g of dry matter is produced per g of consumed glucose.

Fermentative metabolism of glucose

When glucose concentration is sufficiently high, then yeasts are fermenting the glucose and ethanol is produced.



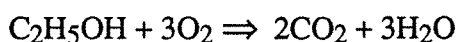
The low level of produced energy is correlative to a low yeast growth.



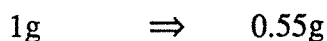
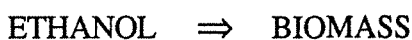
Respiratory metabolism of ethanol

Without glucose, the ethanol produced during a fermentative phase is reconsumed in presence of molecular oxygen.

Theoretically,



And then,



II. 2. Knowledge of the process

A fed-batch process, fig.1, is a well adapted procedure limiting the bioreactor glucose concentration and allowing the best yeast growth. The substrate feed rate can be controlled either from the glucose measurement with the aid of an autosampler or a specific glucose sensor, or from another molecule as, for example, ethanol by membrane sensors.

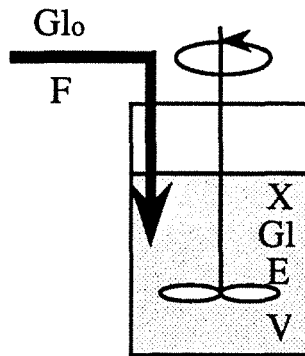


Figure 1 : Schematic representation of a fedbatch process. F ; substrate feed rate, Glo ; feed glucose concentration, Gl ; glucose concentration, X ; total biomass concentration, E ; ethanol concentration, V ; volume of liquid medium.

III. SIMULATION OF THE YEAST PRODUCTION FED-BATCH PROCESS

According to Dantigny (1990), the *Saccharomyces cerevisiae* growth model includes three physiological states, illustrated in fig. 2 :

- in physiological state X_1 , the yeast ferments the glucose,
- in the X_2 , the yeast respire the glucose,
- in X_3 , the yeast respire the ethanol.

The model architecture is triangular, so that the yeast can go from any one state to any other, in accordance with the culture conditions.

We assume that the kinetics of each physiological state and of the transition between the states are known, as are the balance equations of the substances.

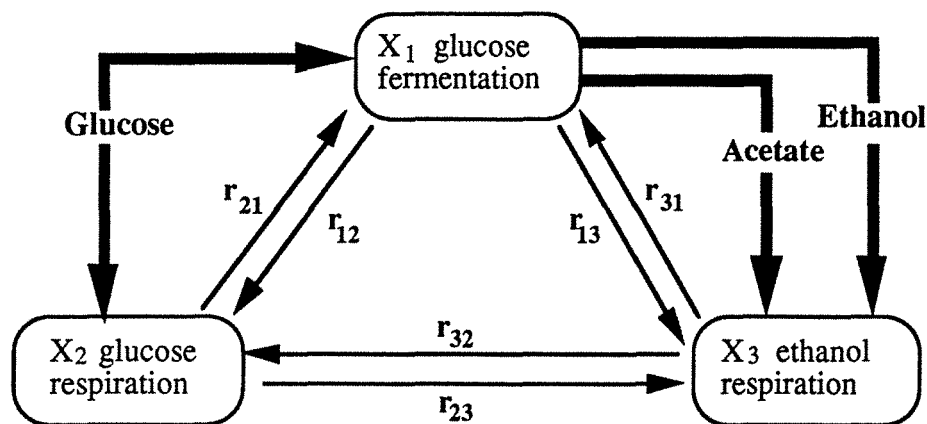


Figure 2 : Model of the yeast metabolism, r_{ij} : transition rate from state X_i to X_j .

Mass balance equations

The variations of concentration of the different state variables are obtained from the mass balance :

- biomass :

$$\begin{aligned}\frac{dX_1}{dt} &= r_X^1 + r_{21} + r_{31} - r_{12} - r_{13} - D X_1 \\ \frac{dX_2}{dt} &= r_X^2 + r_{12} + r_{32} - r_{21} - r_{23} - D X_2 \\ \frac{dX_3}{dt} &= r_X^3 + r_{13} + r_{23} - r_{31} - r_{32} - D X_3\end{aligned}$$

with, r_X^i : biomass growth rate of the state X_i (g/L/h),
D : dilution rate (h^{-1}).

- glucose :

$$\frac{dGl}{dt} = -r_{Gl}^1 - r_{Gl}^2 + D (Glo - Gl)$$

with, r_{Gl}^i : glucose uptake rate by X_i (g/L/h),
Glo = 300 g/L : feed glucose concentration.

- ethanol :

$$\frac{dE}{dt} = r_E^1 - r_E^3 - D E$$

with, r_E^i : ethanol production rate (i=1) or ethanol uptake rate (i=3) (g/L/h),

- acetate :

$$\frac{dAC}{dt} = r_{AC}^1 - r_{AC}^3 - D AC.$$

with, r_{AC}^i : acetate production rate (i=1) or acetate uptake rate (i=3) (g/L/h),
AC : acetate concentration (g/L).

The productivity, PR, and the volume variation are defined as :

$$PR = \frac{X(t) V(t) - X(o) V(o)}{t V(t)}$$

where, $X(t)$ and $V(t)$ are respectively the biomass concentration and the volume at time t .

$$\frac{dV}{dt} = D V$$

IV. OPTIMAL PROCESS CONTROL FOR BIOMASS PRODUCTION

The glucose concentration is the key factor in the regulation of the yeast metabolism during the fermentation processes; so it is quite naturally the one we chose as the control variable.

The optimal process control must maximize both cell yield and productivity; yet there is no way of obtaining both the highest growth rate and the highest yield simultaneously. The best compromise consists of working with a glucose concentration that offers the best specific growth rate without any notable decrease in efficiency. The specific growth rate is considered to be optimal if it is not accompanied by a production of ethanol, and when the growth yield is equal to 0.5 g of yeast per g of consumed sugar. This yield is obtained during physiological state X2, but glucose concentration has to remain constantly very low, i.e. below 0.07 g/L, in the culture medium (Mosrati *et al.*, 1991).

V. FUZZY PROCESS CONTROL

Figure 3 shows the plant for the control of fed-batch bioprocess. Glucose can be easily measured with the aid of an autosampler coupled to an analyzer or *in situ* sensor.

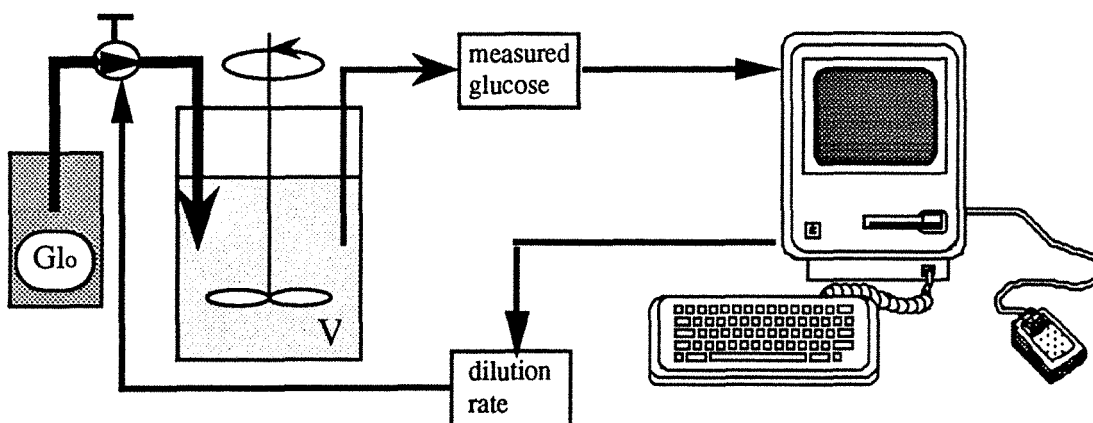


Figure 3 : Scheme of control loops

V. 1. Construction of the Fuzzy Controller

All the fuzzy controller parameters are determined from the experience of biochemists who have expressed a good knowledge of the process.

Fuzzification

The fuzzy controller has two input variables. One of them is the difference between the desired glucose concentration and the concentration actually measured in the bioreactor. This variable, denoted e , expresses the regulation error. The second input variable, denoted c , is the variation of the glucose concentration in the bioreactor. This variable indicates if the controller is regulating in the proper direction or not. The output variable, u , is the variation in the dilution rate.

To apply the fuzzy concept, these real variables are described in linguistic terms. This is the fuzzification phase. For each state variable E and C and each command U , several qualifications or linguistic levels are defined, such as positive small (PS), positive medium (PM), negative big (NB), and so on. ZE (zero) means no variation. For example, the space division of the statement E is illustrated in fig.4.

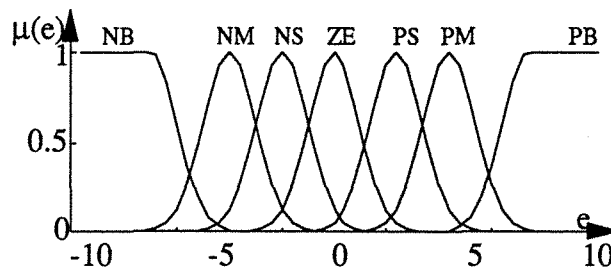


Figure 4 : linguistic attributes for the normalized space E .

Linguistic control rules

In designing the linguistic model, the operator indicates those control decisions he feels to be most appropriate for the specific states of the process. The rules are established according an expert evaluation procedure, and take the form of a conditional proposition :

IF <conditions> **THEN** <control action>.

For example, the operator knows that, if the glucose concentration is very much greater than desired and its variation is small, then the variation of the dilution rate should be decreased slightly to avoid the oscillations, whence the rule :

IF e is very large **AND** c is small **THEN** u is slightly negative.

All the rules can also be represented in the form of a decision table giving the linguistic value of the control variation as a function of each combination of input linguistic terms e and c. These rules are used in the control of the process, which is simulated in a closed loop. Considering the operator experience and the simulation results, a few no correct rules are modified to obtain a good response. Then, a decision table is obtained (table 1).

c	NB	NM	NS	ZE	PS	PM	PB
e							
NB	NB	NM	NM	NS	NM	NS	ZE
NM	NM	NM	NM	NM	PS	PS	PS
NS	NS	NS	NS	NS	PS	PS	PS
ZE	NS	NS	ZE	ZE	PS	PS	PS
PS	ZE	PS	PS	PS	PS	PS	PM
PM	ZE	PS	PM	PM	PM	PB	PB
PB	ZE	PS	PB	PB	PB	PB	PB

TABLE 1 : Linguistic values of decision rules.

V. 2. Process control

The linguistic control is inferred from the state observation and the control rules by using the Mamdani's procedure (Czogala and Rawlik, 1989). The real control value is given by the center of gravity defuzzification method.

Individual commands are computed every 15 min and are applied for 15 min. The simulation lasts a total of 25 h. The initial conditions are the following :

glucose, ethanol, acetate : 0 g/L

biomass : 3 g/L

liquid volume : 10 L

feed glucose concentration : 300 g/L.

Simulations results

In all experiments, the following values are plotted versus time : biomass, substrate, ethanol and acetate concentrations, dilution rate, productivity and volume in the fermentation plant. First, the simulations concern the validation of the linguistic control model. Then, the control action is observed when perturbations occur at different levels.

V. 3. Validation of the linguistic control model

The results are intended to show :

- the ability to represent the process by means of expert decision rules.
- the feasibility and the performance of applying fuzzy controller to a nonlinear fed-batch bioprocess.

Thus, simulations have been carried out and allowed to analyze (1) the controller efficiency through the evolution of concentrations (biomass, residual glucose in the bioreactor, acetate and ethanol) and (2) the process parameters (dilution rate, productivity and volume).

The glucose concentration set-point value is 0.07 g/L, which is, under appropriate conditions, the optimal theoretical feature allowing both high productivity and production of biomass. The curve of biomass concentration evolution versus time (fig 5a) is sigmoïdal, whereas volume one is varying as an exponential curve (fig 5g). After 25 h, 142 g/L of biomass is reached for 180 L as final volume. The productivity, defined as the quantity of yielded biomass per litre of reactional volume per hour, is shown in figure 6d. The final value is 5.8 g/L/h, even if the maximal productivity, 6.2 g/L/h, is reached at the 20th hour of fermentation time. The bioreactor glucose concentration (fig. 5b) get quickly to 0.08 g/L, then oscillate around 0.06 g/L to tend, asymptotically, towards the set-point 0.07 g/L. Glucose concentration never exceeds the critical value of 0.1 g/L, which would have shifted biomass to the metabolic state X_1 producing more ethanol. According to fig. 5e, a few ethanol quantity are produced. During the bioprocess, ethanol concentration increases slowly to converge on 0.035 g/L. Acetate is slightly accumulated in the culture medium (fig. 5f). At the end of the fermentation, its concentration was 0.045 g/L. The productivity plotted versus time has a sigmoïdal look (fig. 5c). Dilution rate increases, gradually in stages, without oscillations, following the cellular growth. After 25 h, it stabilizes at about 0.25 h⁻¹.

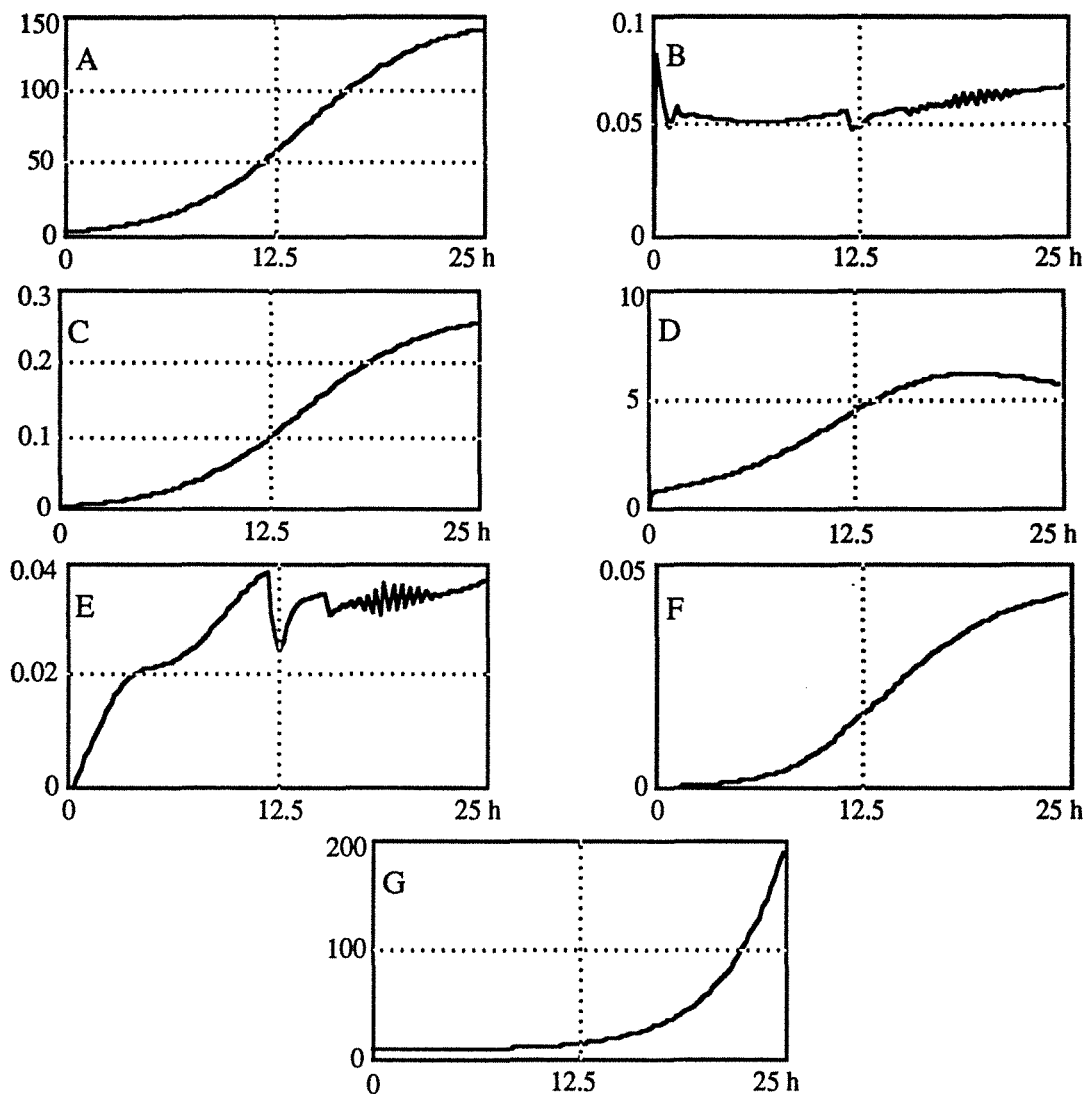


Figure 5 : Glucose concentration regulation without perturbation. Set-point value 0.07 g/L.
 Evolution with time of -a- biomass (g/L), -b- glucose (g/L), -c- dilution rate (h^{-1}), -d-
 productivity (g/L/h), -e- ethanol (g/L), -f- acetate (g/L), -g- volume (L).

Considering and comparing with others simulating results using the same model, this first result leads to express two important remarks :

- Obtaining the same high cell density and identical productivity demonstrates the controller performance. Indeed, several control algorithms, applied to baker's yeast fed-batch process, have been reported but needed to define many abstract parameters. In our work, parameters are more easily characterized.
- The course of the three physiological states (fig. 6) shows their coexistence with a clear predominance of the glucose respiratory state X2.

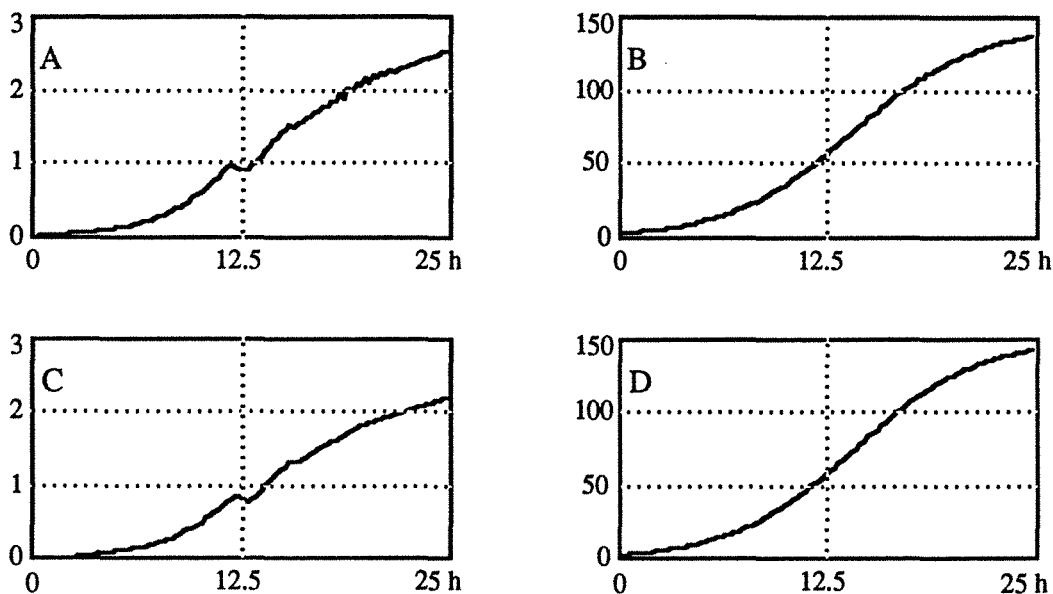


Figure 6 : *Glucose concentration regulation without perturbation. Set-point value 0.07 g/L. Evolution with time of -a- biomass : state X_1 (g/L), -b- biomass : state X_2 (g/L), -c- biomass : state X_3 (g/L), -d- total biomass (g/L).*

V. 4. Fuzzy controller robustness.

A wide study on the fuzzy control action and robustness controller performances, require to experiment various perturbations as glucose concentration, G_{lo} , modification in the feed rate or external perturbation affecting the control value and modifying the controller input. All of these types of perturbations were tested.

Feed glucose concentration, G_{lo} , perturbation.

A perturbation is introduced at the input of the bioreactor. The glucose concentration G_{lo} increases from 300 g/L to 320 g/L during 2 h from the time 12.5 h, fig. 7d.

The perturbation introduces a concentration pulse, but the control action is very fast and the process comes back to a normal state, fig. 7b. Figure 7c shows the control behavior towards the perturbation. The dilution rate is not much affected during the glucose pulse. Afterwards, this dilution rate is slightly decreased making up for the feed G_{lo} increase, and so, going to a good set point value. The plot of biomass concentration versus time, fig. 7a, shows that no perturbation is observed. This is due to a well controlled glucose concentration in the bioreactor. The final biomass concentration, around 140 g/L, is similar to the results without perturbation.

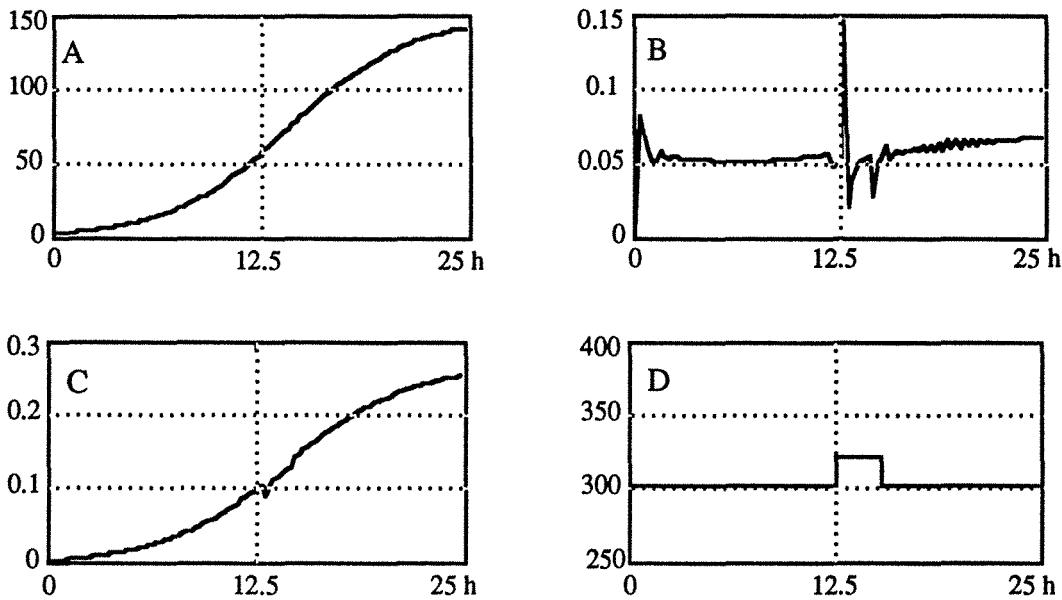


Figure 7: *Glucose concentration regulation. Set-point value 0.07 g/L with feed glucose concentration perturbation. Evolution with time of -a- biomass (g/L), -b- glucose (g/L), -c- dilution rate (h^{-1}), -d- perturbation (h^{-1}).*

In the case of a G_{lo} concentration decreasing from 300 g/L to 280 g/L, only a glucose pulse is observed. However, fast, the glucose concentration comes back to the set-point value. The control and the biomass avulsions are the same that the last simulation.

Control perturbation

A perturbation, 10% up to the maximum control amplitude, was applied to the output controller, at 12.5 h for 15 min, fig. 8d.

A high amplitude glucose concentration pulse is observed during the control perturbation. But, fuzzy control reacts allowing a fast glucose concentration move near the set-point value (fig. 8b). The control plot, fig. 8c, is yet sigmoidal. However, during the perturbation, the dilution rate shows a little change (fig. 8b) that slightly affects the process stabilization, responsible for a low return to the glucose set point (fig. 8b). Of course a longer control perturbation has a strong influence on the process. Figure 8a, shows a normal biomass growth despite the control perturbation. The final value is around 142 g/L, equivalent to the production without perturbation.

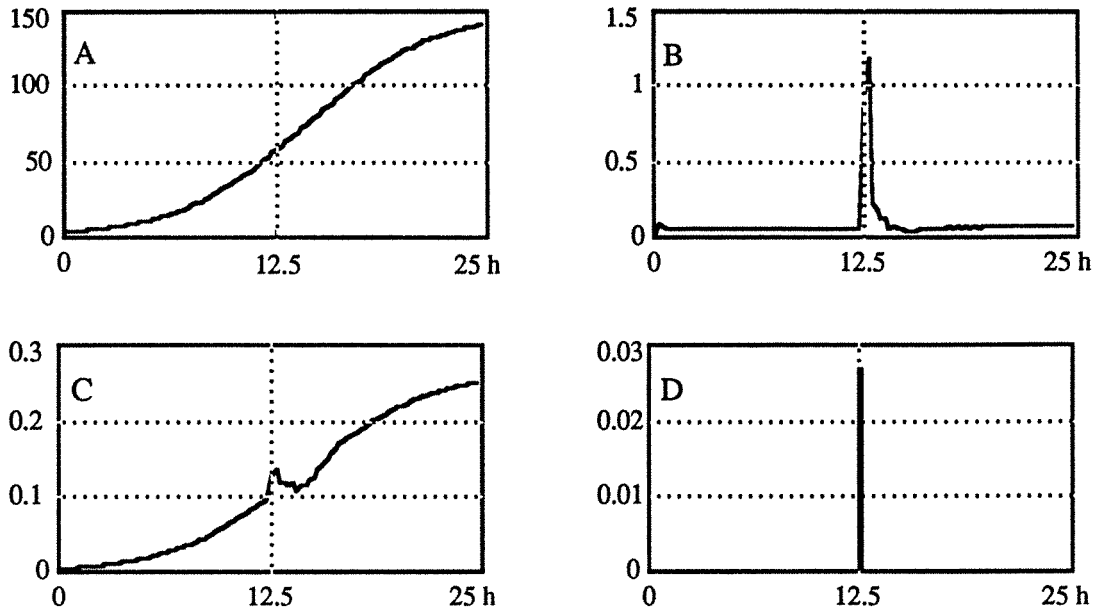


Figure 8 : *Glucose concentration regulation. Set-point value 0.07 g/L with control perturbation. Evolution with time of -a- biomass (g/L), -b- glucose (g/L), -c- dilution rate (h^{-1}), -d- perturbation (h^{-1}).*

Fuzzy controller action in noisy environment

The fuzzy controller behavior was studied when a noise perturbation is observed on glucose measurement. The noise, fig. 9d, is a gaussian white noise, with ± 0.01 g/L amplitude, representing 14 % of the set-point value, 0.07 g/L. No divergence is observed while a large noise was produced, fig. 9b. We can just see relatively little fluctuations around the set-point value. Biomass growth, fig. 9a, has always the same run and the final value is about 142 g/L. The control plot is sigmoïdal, fig. 9c, which shows some oscillations without process divergence.

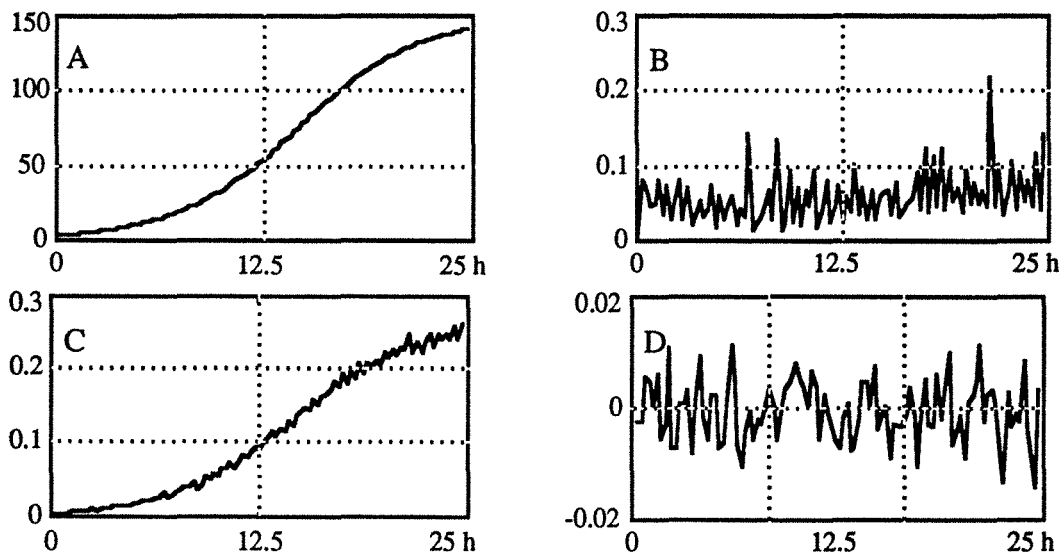


Figure 9 : *Glucose concentration regulation. Set-point value 0.07 g/L. Controller sensitivity to a noisy measurement of glucose concentration Evolution with time of -a- biomass (g/L), -b- glucose (g/L), -c- dilution rate (h^{-1}), -d- noisy measure at the process output (g/L).*

This experimental study shows the good robustness of the fuzzy controller face to different perturbations, although the complex and non linear bioprocess.

VI. CONCLUSION

The control of bioprocesses is very complex and requires sophisticated methodologies. Many parameters act on the metabolic activities of the microorganisms and have to be controlled. Moreover manufacturers objectives are to reach best yields and productivity as possible by using optimal reactional environment. Therefore the bioprocesses require controllers efficient and easy to use.

Although controlling a fed-batch fermentation process is a complex business, the expert knowledge of this process can be used in conjunction with the concepts of fuzzy logic to provide quick and easy implementation of the control. So, we have built up a fuzzy controller to perform fed-batch fermentation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* growth. Simulations using a knowledge model of the bioprocess provide high productivity and biomass concentration. Despite external or internal system disturbances, this controller allowed also to maintain system stability closely to the set-point.

Previous works showed that self-tuning PID (Mehdi *et al.*, 1990) and non-linear L/A controllers led to quiet stability and robustness but low productivity. On the other hand, Generalized Predictive Control provides good productivity but tuning of the control-weighting sequence is difficult, and requires an adaptation of the C.A.R.I.M.A. model parameters (Fonteix *et al.*, 1989; Reyman, 1992).

In this way, in comparison with other controllers, fuzzy control is found to be efficient, stable, robust and leads to both high productivity and biomass production. Moreover, this controller structure is simple enough to quickly and easily building the algorithm.

NOMENCLATURE :

AC : acetate concentration (g/L)
D : dilution rate (h^{-1})
E : ethanol concentration (g/L)
F : substrate feed rate (g/h)
Gl : glucose concentration (g/L)
Glo : feed glucose concentration
PR : process productivity (g/L/h)
 r_{ij} : transition rate from state X_i to X_j
 r_{AC}^i : acetate production rate ($i=1$) or acetate uptake rate ($i=3$) (g/L/h)
 r_E^i : ethanol production rate ($i=1$) or ethanol uptake rate ($i=3$) (g/L/h)
 r_{GI}^i : glucose uptake rate by X_i (g/L/h)
 r_X^i : biomass growth rate of the state X_i (g/L/h)
V, V(t) : volume of liquid medium (L)
X, X(t) : total biomass concentration (g/L)
X1 : yeast fermenting the glucose
X2 : yeast respiring the glucose
X3 : yeast respiring the ethanol

REFERENCES :

- Agrawal, P., Koshy, G. & Ramseier, M. (1989). An algorithm for operating a fed-batch fermentor at optimum specific-growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* **33**. 115-125.
- Axelsson, J.P., Mandenius, C.F., Holst, O., Hagander, P. & Mattiasson, B. (1988). Experience in using an ethanol sensor to control molasses fed-rates in baker's yeast production. *Bioproc. Eng.* **3**. 1-9.
- Czogala, E. & Rawlik, T. (1989). Modelling of a fuzzy controller with application to the control of biological process. *Fuzzy Set S.* **31**. 13-22.
- Dantigny, Ph. (1989). Cinétique, modélisation de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, commandes non-linéaires de type L/A d'un procédé semi-continu. Thesis Doctorat de l'I.N.P.L.. Nancy. France .
- Dekkers, R.M. (1982). Modelling and control of biotechnical processes. Helsinki. Finland. 201.

- Filippini, C., Sonnleitner, B., Fiechter, A., Bradley, J. & Schmid, R. (1991). On-line determination of glucose in biotechnological processes: comparison between FIA and an *in situ* enzyme electrode. *J. Biotechnol.* **18**. 153-160.
- Fonteix, C., Mehdi, D., Mosrati, R., Marc, I. & Humbert, C. (1989). Modélisation et commande prédictive d'une fermentation semi-continue de levure - Comparaison avec une commande P.I.D.. In *Récents Progrès en Génie des Procédés. "Analyse de procédés classiques ou nouveaux"*. 3. Lavoisier.Paris. pp. 507-512.
- Fraleigh, S., Bungay, H. & Fiechter, A. (1989). Regulation of oxidoreductive yeast metabolism by extracellular factors. *J. Biotechnol.* **12**. 185-198.
- Konstantinov, K.B. & Yoshida, T (1992). Knowledge-based control of fermentation processes. *Biotechnol. Bioeng.* **39**. 479-486.
- Mahjoub, M., Rachid, A. & Lamotte, M. (1991). On fuzzy controller robustness. In *IMACS-MCTS Symposium*. Villeneuve. France.
- Mamdani, E.H. & Assilian, S. (1975). A fuzzy logic controller for a dynamic plant. *Internat. J. Man-Machine Stud.* **7**. 1-13.
- Marc, I., Blanchard, F., Engasser, J.M. & Taha, S (1990). New type of *in situ* sterile autosampler for fermentor an cell culture. *Proc. 5th Eur. Cong. Biotechnol.* **2**. 1194-1197.
- Mehdi, D., Humbert, C., Fonteix, C., Boudrant, J. & Marc, I. (1990). Numerical filter and P.I.D. self tuning controller using estimation constraints - Yeast production process. In *Advanced Information Processing in Automatic Control. IFAC symp. series. 5*. Int. Fed. of Aut. Control. Pergamon Press. Oxford. pp. 501-506.
- Mosrati, R., Fonteix, C. & Marc, I. (1991). Recherche analytique des conditions de conduite optimale d'une fermentation semi-continue de levure. In *Récents Progrès en Génie des Procédés. "Mesures-Capteurs-Simulation-Commande"*. 5. Lavoisier. Paris. pp. 275-280.
- O'Connor, G, Sanchez-Riera, F. & Cooney, C.L. (1992). Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **39**. 293-304.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W.A. & Van Dijken, J.P. (1989). Enzymatic analysis of Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Envir. Microbiol.* **55**. 468-471.
- Reyman, G (1992). Modelling and control of fed-batch fermentation of baker's yeast. *Food Control*. **3**. 33-44.
- Shi, Z., Shimizu, K., Watanabe, N. & Kobayashi, T. (1989). Adaptive on-line optimizing control of bioreactor systems. *Biotechnol. Bioeng.* **33**. 999-1009.
- Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K. & Takamatsu, T. (1989). Profile control of the specific growth rate in fed-batch experiments. *Appl. Microbiol. Biothechnol.* **30**. 276-283.
- Williams, D. & Montgomery, P.A. (1986). Mutivariable adaptive control of baker's yeast fermentation. *Proc. IEE*. **133**. 247-253.
- Williams, D., Yousefpour, P. & Wellington, E.M.H. (1986). On-line adaptive control of fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **28**. 631-645.

CONCLUSION

GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les objectifs de ce travail étaient multiples et complémentaires :

⇒ étudier la cinétique et la physiologie de la levure en croissance, en réacteur discontinu,

⇒ analyser et préciser le rôle des molécules énergétiques (ATP, NADH) dans la régulation du métabolisme cellulaire,

⇒ contribuer à la modélisation de la croissance de la levure en tenant compte des aspects macroscopiques et intracellulaires à partir d'observations extracellulaires,

⇒ étudier la commande du procédé de production de levure en réacteur semi-continu en comparant différentes techniques.

Traitement et validation des mesures expérimentales :

La nécessité du traitement des mesures issues des cultures réalisées et l'absence de techniques adaptées à ce problème nous ont conduit à étudier et à concevoir une procédure de traitement originale. Elle consiste à combiner un filtre passe-bas à un lissage polynomial local glissant. Cette technique présente l'avantage d'être simple et facile à ajuster. Testée sur de nombreux résultats expérimentaux de fermentations diverses, nous avons pu démontrer l'intérêt et l'efficacité de la méthode. Grâce à cette procédure, des cinétiques complexes, rencontrées dans ce travail, ont pu être quantifiées correctement.

Entraînement de l'acétaldéhyde :

Dans le cas des cultures de levure, plusieurs molécules volatiles, dont l'éthanol et l'acétaldéhyde, sont produites. L'aération du milieu réactionnel conduit à leur entraînement dans les gaz de sortie du réacteur. La cinétique de ces pertes a été étudiée. Les résultats obtenus montrent que, dans les conditions de culture rencontrées dans ce travail, l'entraînement de l'éthanol est négligeable, contrairement à celui de l'acétaldéhyde. De ce fait, une étude détaillée de la désorption de l'acétaldéhyde a été réalisée. L'utilisation des lois d'équilibre et de transfert de matière ont permis de déterminer avec précision la fraction d'acétaldéhyde entraînée. Dans un premier temps, nous avons étudié l'équilibre gaz-liquide de l'acétaldéhyde en milieu aqueux où nous avons traité particulièrement l'influence de la température et la composition minérale en comparant le système "air-eau pure" au système "air-milieu de culture". Ainsi, la constante d'équilibre a pu être calculée en fonction de la composition minérale du milieu de culture et de sa température. Cette étude a été complétée par une analyse d'erreur détaillée. Dans un deuxième temps, nous avons établi la relation entre le facteur d'entraînement, f , et le coefficient de transfert de matière, K . Ainsi, ce dernier a pu être calculé, puis étudié, systématiquement, en

fonction de la température, T, de la vitesse d'agitation, N, du débit d'air, Q, et du volume de liquide, V_l. Cette étude a porté sur les deux systèmes "air-eau pure" et "air-milieu de culture". Enfin, pour chacun de ces deux systèmes, une corrélation donnant le coefficient de transfert, K, en fonction de T, N, Q et V_l, a été obtenue et validée expérimentalement.

La cinétique des cultures discontinues :

La croissance d'une souche commerciale de *Saccharomyces cerevisiae* en réacteur discontinu et aéré, a été étudiée à différentes concentrations initiales de glucose et d'éthanol. L'évolution des cultures a été suivie par la mesure des concentrations de la biomasse, du glucose, de l'éthanol, du pyruvate, de l'acétaldéhyde et de l'acétate, et des mesures des vitesses de consommation d'oxygène et de production de CO₂.

L'analyse des résultats obtenus a été abordée selon deux aspects : cinétique et physiologique. Premièrement, nous avons effectué des bilans globaux de matière et validé l'ensemble des résultats expérimentaux. Ensuite, un modèle mécanistique a été proposé pour décrire la stœchiométrie des principales voies métaboliques et l'énergie mise en jeu (ATP et NADH). Ainsi, des schémas réactionnels ont été établis pour la croissance, la glycolyse, la gluconéogénèse, la production et la réassimilation de l'éthanol, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire ainsi que l'hydrolyse de l'ATP. Les principaux résultats de cette partie sont :

⇒ l'aptitude de cette approche mécanistique à quantifier les flux de matière et d'énergie ainsi que leur répartition à travers les voies métaboliques essentielles,

⇒ le calcul du coefficient de maintenance et le suivi de son évolution au cours de la croissance,

⇒ la mise en évidence d'une compétition cinétique entre la voie de production de l'éthanol et la respiration. Ce phénomène ne correspond pas à une inhibition, ni à une répression catabolique, ni à une limitation de la capacité respiratoire, comme cela est proposé dans la littérature.

Cette contribution est originale et ouvre de nouvelles perspectives sur la compréhension de la physiologie et la modélisation de la croissance des levures.

Rôle des molécules énergétiques intracellulaires (ATP, NADH) dans la régulation du métabolisme de Saccharomyces cerevisiae :

La détermination des flux et l'observation macroscopique sont, certainement, des étapes importantes dans l'étude des processus microbiologiques. Toutefois, elles ne peuvent prédire ni leur comportement, ni leur évolution. C'est, précisément, là où la connaissance physiologique apporte le complément d'information en interprétant et en établissant des liens

entre la cinétique et les réactions que peut développer le micro-organisme vis-à-vis des conditions physico-chimiques de culture. Il s'agit de décrire les mécanismes de régulation mis en jeu et d'identifier leurs effecteurs (molécules régulateuses).

Motivé par l'importance des résultats précédents, nous avons essayé de les analyser et de les interpréter d'un point de vue physiologique, tout en cherchant à rassembler et à harmoniser l'essentiel des connaissances disponibles.

En effet, nous avons pu montrer que :

⇒ l'évolution des métabolites carbonés excrétés, en faibles quantités au cours de la croissance, fournit des indications sur l'état physiologique des cellules. Par exemple, l'accumulation du pyruvate, au-dessus de 5 mg/l, induit sa décarboxylation en acétaldéhyde.

⇒ les vitesses spécifiques de croissance d'assimilation du glucose, de production ou de reconsommation de l'éthanol ne peuvent pas être des cinétiques simples de type michaelien. Ces vitesses sont soumises à un contrôle intracellulaire assuré, principalement par l'ATP et/ou le NADH.

⇒ le flux de production d'éthanol est linéaire au flux d'assimilation de glucose lorsque ce dernier est supérieur à 0,4 g/gMS/h. Par ailleurs, la maintenance (mole d'ATP/moleMS/h) varie linéairement avec le flux d'oxygène et présente un coefficient de proportionnalité 2,5 fois plus petit sur éthanol que sur glucose. Quant à la vitesse spécifique de croissance, elle présente un comportement complexe vis-à-vis du flux du glucose ou de l'éthanol. Par contre, elle semble suivre une loi de Monod par rapport au pyruvate. Ceci indique clairement le rôle des intermédiaires métaboliques.

⇒ durant la phase de réutilisation de l'éthanol, celui-ci se met en équilibre avec l'acétaldéhyde. Le rapport acétaldéhyde/éthanol varie d'une culture à l'autre. Ce rapport augmente avec la concentration finale d'éthanol produit pendant la croissance sur glucose.

⇒ la durée de latence diauxique, augmente avec la quantité initiale de glucose. Cette latence correspond à des changements au niveau de la constitution enzymatique de la biomasse. Nous avons constaté que sa durée augmente avec le nombre de générations cellulaires sur glucose. Ce phénomène serait donc lié à l'état physiologique de la biomasse. Le fait que la synthèse de ces enzymes associées à la réassimilation de l'éthanol soit réprimée par le glucose conduit à l'hypothèse d'une dilution du contenu enzymatique chez la levure en cours de croissance sur ce sucre. Ceci présente l'avantage d'expliquer, en partie, l'augmentation du temps de latence avec le nombre de dédoublement de la biomasse. En réalité, cette latence est un phénomène plus complexe. En effet, nous observons que la durée de cette phase tend vers une valeur maximale de l'ordre de 12 h. Ceci s'oppose à l'hypothèse de dilution qui ne pourrait

expliquer, à elle seule, la capacité de la levure à réassimiler l'éthanol après une culture prolongée sur glucose. Il apparaît, alors, nécessaire de poser une hypothèse complémentaire pour rendre compte de ce phénomène. Cette question a été abordée dans la partie "modélisation".

Modélisation de la croissance sur glucose et sur éthanol :

Compte tenu des résultats obtenus et de l'acquisition d'une connaissance quantitative assez précise sur la croissance, nous avons pu organiser l'ensemble de ces informations et les formuler dans un modèle original. Celui-ci est basé sur :

- des lois cinétiques qui prennent en compte les effets régulateurs de l'ATP, du NADH ainsi que de l'acétyl-CoA,
- la description mécanistique et la stœchiométrie des voies métaboliques principales,
- l'évolution de l'état physiologique des cellules.

Ainsi, nous avons pu simuler correctement la croissance cellulaire, l'assimilation du glucose, la production et la réutilisation de l'éthanol, l'accumulation du pyruvate et les vitesses de consommation d'oxygène et de production de CO₂. De plus, ce modèle permet de calculer, à partir des bilans de matière et de l'énergie cellulaire, les concentrations théoriques intracellulaires de l'ATP, du NADH et de l'acétyl-CoA.

Ce modèle représente également les phénomènes de latence d'une manière très satisfaisante. Ceci est rendu possible grâce à une hypothèse originale concernant le mécanisme du remaniement enzymatique chez la levure. Cette hypothèse repose sur la dégradation non-spécifique des protéines cellulaires et leur redistribution en enzymes actives selon l'état d'expression des gènes correspondant. Par exemple, en présence de glucose les gènes *adh-II*, *icl*, *malate-syn* et *PEPck* sont dans un état réprimé. Ainsi, pendant cette phase, leurs activités (enzymes) résiduelles subissent une protéolyse et disparaissent progressivement au profit des enzymes de la glycolyse et de la respiration (mitochondrie). Alors qu'en absence de glucose, ces gènes sont dérprimés. Le processus de protéolyse fournit les acides aminés nécessaires à la traduction de leurs ARNm respectifs. D'où une phase de latence et une reprise progressive de la croissance sur éthanol.

Ainsi, ce modèle est capable de simuler des conditions de cultures très variées et de prédire correctement la durée de latence et l'évolution de l'état physiologique de la levure.

A notre connaissance, ce modèle est le premier qui, à la fois, :

- ⇒ intègre le métabolisme, l'énergétique cellulaire et la physiologie de la levure,
- ⇒ et respecte strictement les bilans de matière en tant que contrainte macroscopique.

Par ailleurs, en raison de sa complexité (32 paramètres), ce modèle pose un sérieux problème de détermination de paramètres. En effet, sur 13 variables d'états, seules 6 sont observables

expérimentalement : la biomasse totale, le glucose, l'éthanol, le pyruvate, l'oxygène et le CO₂. Par contre, l'ATP, le NADH, l'Acétyl-CoA et l'état physiologique de la biomasse (4 composantes) ne sont pas accessibles. Il est évident que des méthodes d'identification globale, suffisamment élaborées, seront d'un réel intérêt pour une meilleure estimation de ces paramètres. Ceci permettrait d'améliorer le pouvoir de simulation et les performances de ce modèle. D'autres améliorations peuvent être apportées à la structure du modèle, notamment au niveau des cinétiques du remaniement enzymatique et de la production et réassimilation de l'éthanol.

Commande du procédé de production de levure en réacteur semi-continu :

La conduite optimale de ce procédé est une opération délicate. En effet, sa stratégie consiste à maintenir, dans le réacteur, la concentration du glucose à une valeur de consigne très faible, tout en alimentant par une solution concentrée en ce sucre. Dans ce cadre, nous avons étudié, par simulation, l'action de trois types de commande à modèle interne. Ces commandes sont : la commande Proportionnelle, Intégrale et Dérivée (PID), la Commande Prédicative Généralisée (GPC) et la Commande Floue (FC).

Tout d'abord, nous avons commencé par une analyse mathématique du modèle de simulation. Cette étude a permis de définir deux critères de référence afin de comparer les trois algorithmes de commande dans les mêmes conditions. Ces critères sont :

- la consigne sur le glucose, constante et égale à 0,07 g/l.
- le profil optimal du débit d'alimentation.

Ensuite, nous avons réalisé les simulations nécessaires et comparé les différentes commandes.

Cette étude nous a conduit aux conclusions suivantes :

⇒ Avec un modèle interne de type régressif (ARMA ou CARIMA), la commande GPC apparaît plus performante que la commande PID. Cette dernière manifeste des instabilités notables vers les concentrations élevées en biomasse. Ceci engendre la dérive du modèle interne et la divergence de cette commande. Toutefois, la mise en œuvre du GPC nécessite un réglage très judicieux de ses paramètres, notamment, de l'étendue de l'horizon de prédiction et du bloc corrélateur de l'erreur.

⇒ Différente du PID et du GPC, par son "modèle linguistique", la commande floue est la plus performante. En effet, elle a donné les résultats les plus proches des critères de référence. De plus, elle possède des propriétés de stabilité et de robustesse très satisfaisantes. C'est une approche très prometteuse grâce à la puissance des modèles linguistiques.

D'un point de vue pratique, la commande GPC, basée sur un modèle linéaire, bénéficie des développements théoriques de l'algèbre linéaire. L'identification des paramètres de cette commande peut alors être abordée avec des outils mathématiques, même si ces outils occasionnent beaucoup de calcul. Cela n'est pas le cas pour la commande flou qui repose avant tout sur un ensemble de règles linguistiques. Bien qu'un progrès considérable a été réalisé sur la théorie de la logique flou, le modèle linguistique conditionne, en premier lieu, les traitements de l'information, en aval. Le réglage de ces commandes n'est pas aisé et nécessite une bonne expérience de la part du concepteur.

PERSPECTIVES :

Les perspectives de ce travail sont nombreuses et se situent à plusieurs niveaux. Nous n'en citerons que les plus importantes :

☐ Sur le plan physiologique, il serait nécessaire d' :

- étudier les mécanismes et la cinétique des remaniements enzymatiques. De ce fait, des dosages enzymatiques d'activités protéolytique et de traduction d'ARNm seront utiles pour la quantification de ces phénomènes.

- étudier la consommation des différents composants de l'extrait de levure, notamment dans le cas des cultures réalisées à faible concentration initiale en glucose ou en éthanol.

Ce composé complexe est riche en vitamines et en acides aminés. Il est donc important de tenir compte de ce composé dans les bilans de matières.

☐ Concernant la modélisation, deux voies peuvent être explorées :

- prendre en compte l'acétaldéhyde et l'acétate de manière à mieux représenter la production et la réassimilation de l'éthanol.

- identifier de manière plus affinée les paramètres du modèle et le valider sur d'autres types de conduites, notamment, en semi-continu et en continu.

☐ Au niveau contrôle, il est envisagé de :

- appliquer les commandes étudiées au modèle proposé en vue d'une meilleure analyse des procédés de cultures en réacteur alimenté.

- mettre en œuvre ces commandes sur des cultures réelles et comparer leurs performances.

Enfin, il serait intéressant d'étendre notre approche d'analyse et de modélisation à d'autres types de bioprocédés.



ELSEVIER
SCIENCE PUBLISHERS LTD

Dr I. Marc
Lab. des Sciences du Genie
Chim, INPL - CNRS/UPR 6811,
1 rue Grandville,
B.P. 451
Nancy-Cedex
F054001
France

02-AUG-93

DEADLINE: 23-AUG-93
ARN NO: FRIN006S

Dear Dr Marc

Fuzzy Control of Baker's Yeast Fed-Batch Bioprocess : A Robustness Study

I am pleased to inform you that your paper, which has been accepted for publication in Food Research International, has now been sub-edited.

We have certain queries which are detailed on the attached sheet.
~~We have no queries.~~

Any queries should be answered, quoting the above Ref No, by the deadline indicated above when we shall proceed with the typesetting.

A set of proofs will be sent to you in due course but please note that, because of the cost and the delay involved, corrections to these proofs should be restricted to those arising out of typesetting errors.

I also enclose a Copyright Transfer form. Please would you sign and return this with all speed, or, alternatively, indicate to whom we should allocate copyright of your paper. In addition, please could you supply your fax/telephone/telex number(s) in case these are needed subsequently for urgent correspondence.

Yours sincerely

Nick Bonny
Editorial Office

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o o o

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur GROS Jean-Bernard, Professeur, C.U.S.T. Aubière,

Monsieur LAMOTTE Michel, Professeur, Université de Nancy I.



Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur MOSRATI Ridha Jamel Eddine

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Nouvelle approche de la cinétique fermentaire de Saccharomyces
cerevisiae et de la conduite d'un procédé semi-continu : modélisation
de la croissance basée sur le bilan énergétique de la levure,
commande prédictive et floue"**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

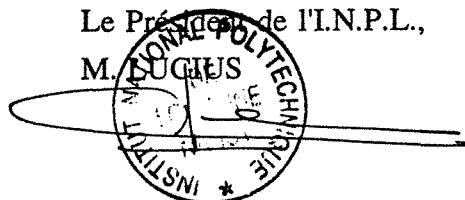
Spécialité : "BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDOEUVRE CEDEX

Fait à Vandoeuvre le, 13 Octobre 1993

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUGIÈS



RESUME :

Saccharomyces cerevisiae est une levure largement utilisée pour la panification et la fermentation alcoolique. Elle suscite, aujourd'hui, de nouveaux champs d'applications tels que la production de molécules à haute valeur ajoutée. Dans le but d'une meilleure connaissance et d'une mise en œuvre optimale, une souche commerciale de cette levure a été étudiée. Dans un premier temps, une méthode de traitement et de validation de données brutes a été mise au point. Ensuite, la cinétique d'entraînement de l'acétaldéhyde, molécule volatile produite au cours de la croissance de la levure, a été quantifiée et modélisée. Grâce à ces deux outils, l'étude des cultures discontinues sur glucose et sur éthanol a été abordée par des bilans de matière et d'énergie cellulaire. Ceci a permis de quantifier, avec précision, l'activité des voies métaboliques impliquées ainsi que les phénomènes de maintenance. Dès lors, une synthèse et une étude de l'aspect "régulation du métabolisme" ont pu être réalisées.

L'ensemble des résultats a servi à concevoir un modèle mathématique basé sur la connaissance du métabolisme, de l'énergétique cellulaire et de la physiologie de la levure. La dernière partie du travail a été consacrée à la mise au point, par simulation, de trois techniques de commande d'un réacteur semi-continu en vue de la production de biomasse (commande PID, commande prédictive généralisée et commande floue).

ABSTRACT :

Saccharomyces cerevisiae is a yeast widely used in baking and alcoholic fermentation. Among its new application fields is the production of high value molecules. With the aim of a better understanding and optimal use of the yeast, we studied a commercially available strain. First, we developed a method of validation and noise reduction of the rough data. Second, we realized the quantification and modelling of the stripping kinetics of the produced acetaldehyde. Third, based on the previous results, the material and energetic balances are applied to the study of batch cultures on glucose and ethanol. In consequence, we were able to quantify precisely and to compare the activities of the metabolic pathways and the maintenance phenomena, thus accomplishing a study of the metabolic regulation. All the results are used for the development of a mathematical model, based on the knowledge of cellular physiology and energetics. Finally, using simulation, the performances of three controlling techniques (PID, fuzzy and generalised predictive), applicable to a biomass - producing fed - batch, are compared.