



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Génie des Procédés et de l'Environnement

---

**Présentée et soutenue par :**

M. PAUL RENÉ BROU

le mercredi 10 octobre 2018

**Titre :**

Modélisation de cultures mixtes de levures pour leur mise en oeuvre optimale dans les bioprocédés

---

**Ecole doctorale :**

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

**Directeur(s) de Thèse :**

M. CEDRIC BRANDAM

MME SANDRA BEAUFORT

**Rapporteurs :**

Mme MARINA BELY, UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

M. NICOLAS ROZES, UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI TARRAGONA

**Membre(s) du jury :**

Mme PATRICIA TAILLANDIER, INP TOULOUSE, Président

M. BEHNAM TAIDI, COMUE UNIVERSITE PARIS-SACLAY, Membre

M. CEDRIC BRANDAM, INP TOULOUSE, Membre

Mme SANDRA BEAUFORT, INP TOULOUSE, Membre

## **Titre:** Modélisation de cultures mixtes de levures pour leur mise en œuvre optimale dans les bioprocédés

---

**Résumé:** Les potentialités liées aux cultures mixtes de micro-organismes sont immenses et ouvrent de vastes possibilités pour l'innovation dans les bioprocédés. Cependant, étant donné la complexité des phénomènes régulant la physiologie d'un seul micro-organisme, leur mise en œuvre en culture mixte est d'autant plus difficile à maîtriser que des interactions entre ces micro-organismes viennent s'ajouter. Le travail présenté dans ce manuscrit est une étude d'un couple de levures œnologiques constitué de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Torulaspora delbrueckii*. Son objectif est d'acquérir des informations expérimentales afin d'analyser et in fine modéliser l'évolution des cultures pures et des cultures mixtes. L'analyse des données expérimentales acquises lors des cultures pures de chaque levure a permis de quantifier l'effet favorable de la concentration initiale d'azote assimilable sur la croissance et la vitesse de fermentation des deux levures. Elle a aussi mis en évidence une prolongation de la phase de latence de *T. delbrueckii* induite par une augmentation des facteurs anaérobies. Les cultures mixtes ont été réalisées en présence et en absence de membrane de séparation permettant ainsi d'observer les effets du contact physique sur l'évolution des cocultures. Le contact physique influence la dynamique des populations. En culture mixte, *S. cerevisiae* domine *T. delbrueckii* dans un milieu synthétique classique. Une augmentation de la concentration initiale de facteurs anaérobies inverse complètement cette domination. L'analyse des résultats expérimentaux nous a orienté vers le développement d'un modèle «stœchio-cinétique» structuré dans lequel l'azote assimilé par la levure se répartit en deux compartiments: le compartiment constitutif et le compartiment de stockage. Ce modèle a permis une représentation fidèle des cinétiques observées en culture pure. La prise en compte des interactions s'est faite en intégrant la compétition pour les substrats, les interactions indirectes et les interactions directes. L'ensemble des hypothèses émises lors de ce travail de modélisation souligne la nécessité d'approfondir les connaissances scientifiques concernant le métabolisme de *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte et l'effet des facteurs anaérobies sur les interactions microbiennes.

**Mots-clés:** modélisation, levures, interactions, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*.

## **Title:** Modeling mixed cultures of yeasts for their optimal implementation in bioprocesses

---

**Abstract:** The potentialities associated with cultures of mixed micro-organisms are tremendous and offer great opportunities for innovation in bioprocesses. The phenomena regulating the physiology of a single micro-organism are complicated. Furthermore, the eventual additional interactions between two micro-organisms make their implementation in mixed culture difficult to control. The work presented in this manuscript is a study of a couple of oenological yeasts composed of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. Its objective is to acquire experimental data in order to analyse and ultimately model the evolution of pure and mixed cultures. The analysis of experimental data acquired during the pure cultures of each yeast enable to quantify the favorable effect of the initial concentration of assimilable nitrogen on the growth and fermentation rate of the two yeasts. It also shows an extended latency phase of *T. delbrueckii* induced by an increase in anaerobic factors. The mixed cultures were carried out in the presence and absence of separation membrane in order to observe the effects of physical contact on the evolution of cocultures. Physical contact influences population dynamics. In mixed culture, *S. cerevisiae* dominates *T. delbrueckii* in a classical synthetic medium. An increase in the initial concentration of anaerobic factors completely reverses this domination. The analysis of the experimental results has directed us towards the development of a structured stoichiometric and kinetic model in which the nitrogen assimilated by the yeast is partitioned into two compartments: the constitutive compartment and the storage compartment. This model faithfully represents the kinetics observed in pure culture. The consideration of interactions was done by integrating competition for substrates, indirect interactions and direct interactions. All the hypotheses emitted during this modelling work underline the need to deepen the scientific knowledge concerning *T. delbrueckii* metabolism under strict anaerobic conditions and the effect of anaerobic factors on microbial interactions.

**Keywords:** modelling yeast, interactions, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*.

# REMERCIEMENTS

---

"Je suis les liens que je tisse avec les autres"

*Albert Jacquart*

Dans cette thèse, je parle beaucoup d'interactions entre micro-organismes. Des interactions, il en existe également énormément entre les êtres humains. Comme le soulignent les paroles d'Albert Jacquard citées ci-dessus, elles sont l'essence même de l'humanité. Elles peuvent prendre des formes multiples, des plus complexes aux plus anodines en apparence. En apparence seulement, car un simple sourire peut parfois avoir plus de conséquences qu'un long cours magistral. Y compris sur un travail de recherche.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse (LGC, UMR 5503) au sein du département BioSyM (Bioprocédés et Systèmes Microbiens). Je tiens à remercier les deux directeurs du LGC que j'ai connu, **Béatrice Biscans** et **Pierre Aimar** pour m'avoir accepté dans ce laboratoire et m'avoir apporté tout le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail. J'exprime également toute ma gratitude au **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche** pour avoir financé ce projet.

Je tiens à formuler mes plus sincères remerciements à mon directeur thèse, **Cédric Brandam**, pour m'avoir fait confiance et confié ce projet de thèse il y a quelques années. Je tiens à remercier chaleureusement ma co-directrice de thèse **Sandra Beaufort** pour le soutien constant qu'elle m'a apporté au cours de ce projet. Je remercie également **Patricia Taillandier** qui a contribué à l'encadrement de cette thèse. Grand merci !!! **Sandra, Patricia & Cédric**. Votre expertise et votre disponibilité m'ont permis de m'épanouir dans un environnement scientifique rigoureux et agréable. Être digne de la confiance, de la qualité de l'encadrement et du temps que vous m'avez accordé a été une source de motivation pour aller au bout de ce travail de thèse.

J'exprime ma gratitude à tous les membres du jury qui ont accepté de juger mes travaux: merci à **Marina Bely** et **Nicolas Rozès** d'avoir été les rapporteurs de ma thèse, merci à **Behnam Taidi** d'avoir été l'examineur de ma thèse. Merci à vous, pour votre considération et vos remarques à la fois positives et constructives qui ont fait progresser ce travail.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ces travaux : **Claire Albasi** pour son expertise sur les bioréacteurs à membrane et les quelques comprimés de paracétamol fournis, **Marie Morère** pour son aide concernant l'HPLC, **Jean-Louis Nadalin** pour son aide dans la prise en charge des problèmes mécaniques, **Agathe Juppeau** et **Paul Scotto** pour leur précieuse assistance technique.

Merci également aux personnels du LGC, **Danny**, **Patricia Uliana**, **Brice Vouillarmet**, **Jean-Luc Labeyrie** et **Bernard Galy** pour leur conseil et leur bonne humeur quotidienne.

Un grand merci à **Alain** pour tous les bons moments passés ensemble dans le laboratoire et avec l'association des doctorants. Si le LGC est aussi fonctionnel et ordonné, c'est grâce à toi.

Ma passion pour la fermentation m'a conduit à travailler souvent les nuits et les week-ends. Je tiens à témoigner une affection particulière à tous ceux qui, pour des raisons de sécurité, se sont retrouvés embarqués dans cette aventure avec moi: **Sandra, Frederico, Maria Beatriz, Sitha, Pierre C., Pedro, Mehran, Esaïe, Leticia, Silvia et Lauren.**

Pour l'ensemble des doctorants, post-doctorants, amis et collègues du LGC, je souhaite vous dire un grand "MERCI", "THANK YOU", "GRACIAS", "CHOUKRAN" et "OBRIGADO". Sans vous, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur et la bonne ambiance du laboratoire a très largement contribué à ce travail, les anciens : **Alex, Benoît, Ségolène, Pierre(s), Léo(s), Guillaume, Freddy, William, Carlos, Elise, Ingrid, Laeticia et Nadège**, ceux de ma génération : **Célestine, Manon, Omar, Fatine, Anastasia, Matthieu, Manu, Marina, Chucho, Sébastien** et les petits nouveaux : **Sid Ahmed, Robbie, Astrid, Hélène, Claire(s), Pierre(s), Emma, Lucas, Poehere, Yosra, Marco, Magno, Han Bin...** J'en oublie certainement, mais sachez que les bons moments passés pendant ces années de thèse sont en partie grâce à vous.

Et puis, parce que je n'ai pas passé tout mon temps dans les locaux du LGC, je remercie du fond du cœur tous mes amis toulousains, une équipe de vrais champions: **Elena, Hajer, So', Shani, Marion, Macey, Marie-Andrée, Kristina H, Adrien(s), Athys, Momo, Thiamy, Ryan, Boris, Teddy, Fabrice, Alpha.** Merci à **Kristina C.** et **Svetlana** de m'avoir hébergé durant la préparation de ma soutenance.

J'ai l'immense chance d'être quelqu'un d'entouré: la famille **Kouakou, mes parents et mes frères.** Merci à tous pour votre soutien, votre joie, vos sourires et bien d'autres choses. La fierté dans vos yeux est ma plus grande joie.

Enfin, je remercie ceux que j'ai oubliés de citer et qui me le feront peut-être savoir un jour. J'espère que j'aurai trouvé une bonne excuse d'ici là !



# **SOMMAIRE**

---

REMERCIEMENTS.....	1
SOMMAIRE .....	5
NOMENCLATURE.....	9
INTRODUCTION.....	11
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	15
I. Généralités.....	16
I.1. Le marché mondial du vin.....	16
I.2. Elaboration du vin.....	16
I.3. Fermentation alcoolique.....	17
II. Levures et fermentation alcoolique .....	18
II.1. Levures .....	18
II.2. Besoins nutritifs .....	19
III. Interactions .....	30
III.1. Classification des interactions.....	30
III.2. Mécanismes.....	31
III.3. Paramètres opératoires du procédé.....	35
III.4. Outils d'études .....	36
IV. Modélisation des cultures pures de levures .....	40
IV.1. Objectifs.....	40
IV.2. Modèles non-structurés.....	41
IV.3. Modèles structurés.....	46
V. Modélisation des cultures mixtes de levures.....	50
V.1. Modèles dérivés du modèle de Lotka et Voltera .....	50
V.2. Modèle décrivant des mécanismes d'interactions.....	51
VI. Conclusion .....	56
MATERIEL ET METHODES .....	57
I. Fermentation .....	58
I.1. Micro-organismes .....	58
I.2. Milieux.....	58
I.3. Conduite des fermentations .....	60
II. Méthodes analytiques .....	64
II.1. Analyse de la biomasse.....	64



II.2.	Analyse du milieu de culture .....	67
II.3.	Bilan carbone.....	69
II.4.	Traitement des données expérimentales .....	70
III.	Méthodes numériques.....	73
III.1.	Terminologie .....	73
III.2.	Fonctionnalités.....	74
III.3.	Algorithme .....	74
CHAPITRE I:	CULTURES PURES DE LEVURES.....	81
I.	Objectifs .....	82
II.	Influence la concentration d'azote assimilable.....	83
III.	Impact de l'anaérobiose stricte .....	88
IV.	Influence des facteurs anaérobies.....	92
V.	Analyse du bilan carbone.....	96
VI.	Conclusion .....	98
CHAPITRE II:	CULTURES MIXTES DE LEVURES .....	99
I.	Objectifs .....	100
II.	Cultures mixtes de levures en anaérobiose stricte .....	101
1.	Results.....	101
1.1.	Effect of anaerobic growth factors (AGF) on single culture fermentation (SCF) 101	
1.2.	Co-cultures with a single dose of anaerobic growth factors .....	102
1.3.	Co-cultures with a double dose of anaerobic growth factors.....	105
1.4.	Carbon balance.....	107
2.	Discussion .....	108
2.1.	<i>T. delbrueckii</i> latency phase extension induced by AGF .....	108
2.2.	<i>T. delbrueckii</i> sugar metabolism in strict anaerobiosis .....	109
2.3.	Effects of lipids on yeasts behaviour .....	109
2.4.	Physical contact and competition .....	110
2.5.	AGF influence on <i>S. cerevisiae</i> amensalism .....	110
3.	References.....	112
CHAPITRE III:	MODELISATION DES CULTURES PURES DE LEVURES .....	117
I.	Introduction .....	118
II.	Conception d'un modèle mathématique en anaérobiose non stricte.....	119
II.1.	Concepts d'azote minimal et d'azote stocké .....	119
II.2.	Autres hypothèses du modèle.....	121

II.3.	Principes .....	122
II.4.	Cinétique et stœchiométrie .....	122
II.5.	Expressions mathématiques .....	123
II.6.	Identification des paramètres .....	129
III.	Modélisation des cultures pures en anaérobiose stricte .....	133
III.1.	Confrontation entre le modèle déterminé en anaérobiose non stricte avec les résultats en anaérobiose stricte.....	133
III.2.	Développement d'un modèle de cultures pures en anaérobiose stricte .....	134
IV.	Conclusion .....	143
<b>CHAPITRE IV: MODELISATION DES CULTURES MIXTES DE LEVURES.....</b>		<b>145</b>
I.	Introduction .....	146
II.	Modélisation d'une compétition pour les substrats.....	147
III.	Modélisation des interactions indirectes.....	151
III.1.	Accélération de la croissance .....	151
III.2.	Compétition pour l'espace.....	151
III.3.	Toxines antimicrobiennes .....	154
III.4.	Confrontation avec les données expérimentales .....	156
IV.	Modélisation des interactions directes .....	159
IV.1.	Ratio de facteurs anaérobies absorbés .....	159
IV.2.	Accélération de la croissance .....	159
IV.3.	Modification de l'absorption d'azote .....	160
IV.4.	Stimulation de l'activité glycolytique .....	160
IV.5.	Confrontation avec les données expérimentales .....	161
V.	Conclusion .....	165
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES.....</b>		<b>167</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>171</b>
<b>ANNEXE .....</b>		<b>197</b>
	Annexe 1 : Description du ralentissement de la croissance .....	198
	Annexe 2 : Modèles décrivant la production de métabolites.....	203
	Annexe 3 : Synthèse des résultats obtenus en culture pure .....	205

## **NOMENCLATURE**

---

**Abréviations**

ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
BRM	Bioréacteur à membrane
DO	Densité optique
FA	Fermentation alcoolique
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GIDH	Glutamate déshydrogénase
MS	Milieu synthétique
NAC	N-acétyl-L-cystéine
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OPA	o-phthalaldéhyde
Pi	Phosphate inorganique
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose

# **INTRODUCTION**

---

Un procédé biologique est une mise en œuvre de systèmes vivants pour réaliser une ou plusieurs transformations biochimiques. Chaque entité vivante possède des caractéristiques et aptitudes inhérentes. En effet, tous les micro-organismes ne font pas nécessairement les mêmes réactions biochimiques et chaque réaction biochimique est réalisée avec une vitesse et un rendement qui dépend du micro-organisme concerné.

Les potentialités liées aux cultures mixtes de micro-organismes sont immenses et ouvrent de vastes possibilités pour l'innovation dans les bioprocédés. Cependant, étant donné la complexité des phénomènes régulant la physiologie d'un seul micro-organisme, leur mise en œuvre en culture mixte est d'autant plus difficile à maîtriser que des interactions entre ces micro-organismes viennent s'ajouter.

Les interactions microbiennes peuvent se regrouper en deux catégories: les interactions directes impliquant un contact physique entre les micro-organismes et les interactions indirectes médiées par un ou plusieurs composés présents dans le milieu. Un outil spécifique permettant l'étude de culture de plusieurs micro-organismes a été développé au sein du Laboratoire de Génie Chimique. Ce dispositif permet d'acquérir des données expérimentales de micro-organismes évoluant en présence ou en absence de contact physique.

Les systèmes utilisant de multiples micro-organismes sont très utilisés notamment dans le domaine agroalimentaire, le traitement des eaux et la chimie fine. Cependant, contrairement aux cultures pures, les cultures mixtes de micro-organismes font rarement l'objet de modélisation.

L'objectif de cette thèse est de développer la modélisation des interactions entre micro-organismes pour mieux comprendre ces mécanismes et aider à la conception des bioprocédés. Parmi les différents types de modèles existants, nous nous orienterons vers les modèles dits «stœchio-cinétiques» c'est-à-dire des modèles décrivant le comportement macroscopique des micro-organismes au cours du temps au travers de schémas réactionnels apparents associés à des lois cinétiques.

Le travail présenté dans ce manuscrit est une étude d'un couple de levures œnologiques constitué de *Saccharomyces cerevisiae* et *Torulaspota delbrueckii*. *S. cerevisiae* est la levure de référence en œnologie. Elle est très tolérante à l'éthanol et peut produire des vins à forte teneur en alcool allant de 12 à 16% (v/v). *T. delbrueckii* est moins tolérante à l'éthanol. Elle produit des vins avec une teneur en alcool allant de 7 à 12% (v/v) cependant son utilisation en culture pure conduit à des fermentations languissantes. Les vins issus d'une fermentation de *T. delbrueckii* se caractérisent par une acidité volatile et une concentration en composés indésirables plus faibles que ceux produits par une fermentation de *S. cerevisiae*. Ainsi, l'association de ces deux levures a été proposée, aux niveaux industriel et académique, afin de réaliser une fermentation complète et de moduler les propriétés organoleptiques des vins.

Le contrôle de la dynamique de populations est une difficulté qui se pose lorsque ces deux micro-organismes cohabitent dans le même milieu. *S. cerevisiae* a un taux de croissance plus grand et une tolérance à l'éthanol plus importante que *T. delbrueckii*. De plus, en conditions œnologiques, *S. cerevisiae* exerce généralement un amensalisme qui entraîne la

mort de *T. delbrueckii*. *S. cerevisiae* a tendance s'implanter dans le milieu au détriment de *T. delbrueckii*. Plusieurs solutions ont été proposées pour permettre à *T. delbrueckii* de s'implanter et faire une partie de la fermentation avant d'être dominée par *S. cerevisiae*. Il s'agit notamment de l'augmentation du ratio de *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* lors de l'inoculation et d'une inoculation séquentielle dans laquelle *S. cerevisiae* est inoculée quelques jours après *T. delbrueckii*.

Le travail présenté dans ce manuscrit contribue à la compréhension, au contrôle et à l'optimisation de la dynamique de populations du couple de levure en culture mixte. Son objectif est d'acquérir des informations expérimentales afin d'analyser et in fine modéliser les cinétiques de croissance, de consommation de substrats et de production de métabolites des souches en culture pure, puis en interaction.

La première partie est une **Etude bibliographique** qui rappelle les besoins nutritifs et le métabolisme des levures en culture pure. Puis, elle présente les différents types d'interaction et leur mécanisme. Enfin, une large part de cette étude bibliographique est consacrée à la modélisation de l'évolution des milieux microbiens d'abord en culture pure, puis en culture mixte.

La partie **Matériels et Méthodes** décrit l'ensemble des techniques expérimentales qui ont été utilisées dans ce travail.

Les résultats de cette étude se divisent en quatre chapitres.

Le **Chapitre I** présente l'influence de plusieurs facteurs sur les fermentations de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en culture pure. Les effets des nutriments et des conditions de culture sur l'évolution des cinétiques de chaque levure en culture pure sont quantifiés.

Le **Chapitre II** concerne l'étude expérimentale des cultures mixtes. L'évolution des cinétiques de croissance, de consommation de substrats et de production de métabolites est analysée pour des cultures mixtes avec et sans contact physique. Le rôle des facteurs anaérobies sur les interactions microbiennes est aussi étudié.

Le **Chapitre III** est dédié à la modélisation des cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Il présente les concepts et principes utilisés pour la conception d'un modèle stœchio-cinétique décrivant l'évolution du milieu.

Le **Chapitre IV** se consacre à la modélisation des cultures mixtes de levure. Il présente un modèle décrivant l'évolution des cocultures en tenant compte des interactions directes et indirectes.

Les **Conclusions et Perspectives** sur le travail présenté clôturent ce manuscrit.





# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

"Que chacun raisonne en son âme et conscience,  
qu'il se fasse une idée fondée sur ses propres  
lectures et non d'après les racontars des autres"

*Albert Einstein*

## I. Généralités

### I.1. Le marché mondial du vin

La consommation mondiale de vin (hors jus & moûts) en 2016 s'élevait à 242 millions d'hectolitres (hl) (OIV, 2017). En 2016 le marché mondial, correspondant à la somme des exportations de tous les pays, atteignait en volume 104,1 millions hl et en valeur 28,9 milliards d'euros. L'Espagne demeure le premier exportateur en volume avec 22,9 millions hl et une part de marché mondial de 22,0%. Certains pays tels que la Nouvelle-Zélande, le Chili, l'Italie, ainsi que l'Afrique du Sud ont enregistré une hausse de leurs exportations par rapport à 2015. La France est le premier exportateur mondial en valeur avec 8,2 milliards d'euros exportés en 2016, soit 28,5% de la valeur mondiale (OIV, 2017). Le marché mondial du vin est considérable en termes de volume et de valeurs. C'est aussi un marché très concurrentiel dans lequel les acteurs ne cessent d'innover dans l'élaboration du produit.

### I.2. Elaboration du vin

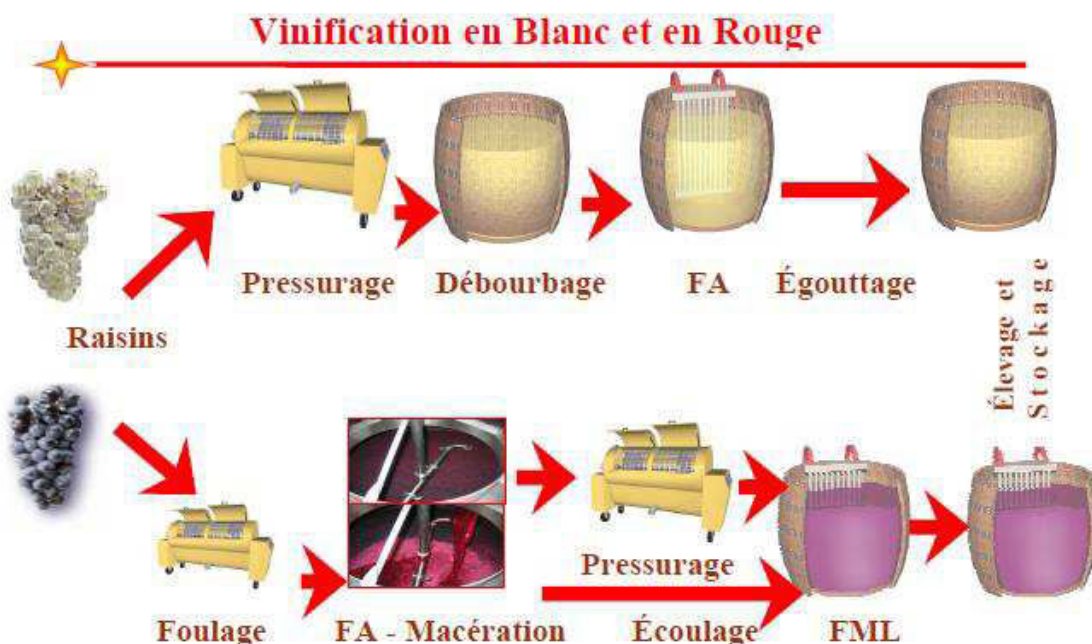


Figure 1 Vinification en rouge et en blanc.

L'élaboration du vin est l'ensemble des opérations nécessaires à la transformation du raisin en vin. Selon le type de vin (blanc, rosé ou rouge), les techniques et les étapes de vinifications ne sont pas toujours les mêmes (Figure 1). Les caractéristiques souhaitées pour le produit final déterminent le choix de certaines étapes opératoires du procédé. Pourtant, il existe des étapes élémentaires communes à toutes les vinifications. Ces étapes communes sont la réception de la vendange, l'égrappage, le sulfitage, la cuvaision, la fermentation alcoolique, la fermentation malolactique, l'écoulage, le pressurage, la clarification et la mise en bouteilles. Le vin est un produit obtenu exclusivement par la fermentation alcoolique (FA),

totale ou partielle de raisins frais, foulés ou non, ou de moûts de raisins (Ribéreau-Gayon, 1991). La FA est par conséquent l'étape essentielle de la vinification.

### **I.3.Fermentation alcoolique**

La FA consiste en une transformation biologique des sucres du raisin en éthanol et dioxyde de carbone. La FA du vin est assurée soit par des levures présentes naturellement sur la baie du raisin ou dans le chai de vinification, soit par des levures d'origine exogène. La multiplication des levures dans le vin doit être suffisante pour assurer une FA efficace et rapide pour limiter le développement des autres micro-organismes, notamment celui des levures indésirables ou des bactéries lactiques et acétiques. La FA peut durer de quelques jours (dans la majorité des cas en vinification en rouge) à plusieurs semaines (notamment en blanc) en fonction de la région et du type de vin recherché. L'utilisation de levains commerciaux n'est pas toujours satisfaisante pour assurer un bon déroulement de la FA. Il est possible de rencontrer des échecs d'inoculation et des fins de FA languissantes. Ces dernières concernent également les fermentations indigènes. La plupart des explications proposées à ces problèmes fermentaires reposent sur les caractéristiques physicochimiques du moût, concentration en sucres fermentescibles, teneur en azote assimilable, carence en vitamines, et les conditions de mise en œuvre comme la limitation en oxygène ou la mauvaise gestion de la température... La mise en œuvre de la FA utilise souvent des levains de souches de *S. cerevisiae* sélectionnées pour leur aptitude fermentaire et leur contribution aromatique. Néanmoins, on observe une recrudescence de l'utilisation de souches non-*Saccharomyces* (Jolly *et al.*, 2006). En effet, ces dernières sont utilisées afin d'améliorer la qualité organoleptique du vin (Anfang *et al.*, 2009; Izquierdo Cañas *et al.*, 2011; Calabretti *et al.*, 2012; Cordero-Bueso *et al.*, 2013).

## II. Levures et fermentation alcoolique

### II.1. Levures

Au cours de la fermentation alcoolique, des levures transforment le sucre en éthanol. Ces levures sont classifiées en deux groupes: les *Saccharomyces* et les non-*Saccharomyces*. Les espèces du groupe *Saccharomyces* sont communément utilisées en vinification du fait de leur tolérance à de fortes concentrations en éthanol (Pretorius, 2000). Les levures non-*Saccharomyces* connaissent un regain d'intérêt car elles améliorent le profil aromatique et réduisent la teneur en alcool des vins (Romano *et al.*, 1997; Egli *et al.*, 1998; Ciani *et al.*, 2010; Sadoudi *et al.*, 2012; Quirós *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2015). Parmi les non-*Saccharomyces*, un intérêt particulier a été porté sur *T. delbrueckii* car elle contribue à l'amélioration de la qualité du vin en produisant des composés aromatiques appréciés et peu de composés indésirables au cours de la fermentation (Renault *et al.*, 2009).

#### II.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* est la levure de référence d'une part car elle est la plus répandue dans les procédés fermentaires industriels, mais également car c'est un organisme eucaryote facilement manipulable qui sert de modèle simplifié pour les recherches biologiques. Son génome est totalement séquencé depuis 1997 (Cherry *et al.*, 1997). Elle est utilisée dans des procédés industriels et académiques couvrant un large éventail de domaines d'application incluant: l'agroalimentaire, le traitement des eaux, la production de médicaments et la production de bioéthanol à partir de ressources renouvelables (Delgenes *et al.*, 1996; Ejiofor *et al.*, 1996a; Kjeldsen *et al.*, 1996; Stoll et Duncan, 1996; Veglio' e Beolchini, 1997). L'espèce *S. cerevisiae* possède une très grande diversité de souches utilisées en vinification (Sabate *et al.*, 1998). Elle est très tolérante à l'éthanol et peut produire des vins à forte teneur en alcool allant de 12 à 16% (v/v) (Albergaria et Arneborg, 2016). *S. cerevisiae* a un taux de croissance et une vitesse de production d'éthanol plus élevés que ceux des levures non-*Saccharomyces* (Ciani et Maccarelli, 1997; Bely *et al.*, 2008; Taillandier *et al.*, 2014).

#### II.1.2. *Torulasporea delbrueckii*

*T. delbrueckii* est une levure ubiquitaire que l'on retrouve dans les sols, les plantes, les fruits et les insectes (Capriotti, 1957; Tokuoka *et al.*, 1985; Nguyen *et al.*, 2007; Limtong et Koowadjanakul, 2012). Elle est utilisée dans de nombreux bioprocédés tels que la panification, l'ensilage, la fabrication de cacao et de fromages (Welthagen, 1998; Papalexandratou *et al.*, 2011; Pacheco *et al.*, 2012; Lhomme *et al.*, 2016). *T. delbrueckii* est aussi utilisée pour la production de boissons fermentées telles que la bière, le cidre et le kéfir (Loretan *et al.*, 2003; Coton *et al.*, 2006; Tataridis *et al.*, 2013; Canonico *et al.*, 2016, 2017). Elle est connue pour être associée au processus de vinification depuis de nombreuses années (Castelli, 1954). Néanmoins, comme les autres levures non-*Saccharomyces*, elle a longtemps été laissée de côté du fait de l'intérêt longtemps porté à *S. cerevisiae* et au développement de nombreux levains industriels utilisant cette dernière. La production d'éthanol de *T. delbrueckii* varie le plus souvent entre 6 et 10% (v/v) mais certaines souches peuvent aller jusqu'à 12% (Cabrera *et al.*, 1988; Herraiz *et al.*, 1990; Albergaria et Arneborg, 2016). Par ailleurs, en comparaison à *S. cerevisiae*, l'espèce *T. delbrueckii* est caractérisée

par un taux de croissance plus faible et une population maximale plus élevée (Ciani et Maccarelli, 1997; Bely *et al.*, 2008; Taillandier *et al.*, 2014).

*T. delbrueckii* a un impact positif sur la qualité organoleptique des vins. En effet, lors de la fermentation alcoolique, elle produit peu de composés indésirables tels que l'acétone, l'acide acétique, l'acétate d'éthyle et les phénols volatils (Cabreria *et al.*, 1988; Herraiz *et al.*, 1990; Ciani et Picciotti, 1995; Ciani et Maccarelli, 1997; Shinohara *et al.*, 2000; Plata *et al.*, 2003; Loira *et al.*, 2014; Azzolini *et al.*, 2015; Canonico *et al.*, 2016). De plus, *T. delbrueckii* améliore les qualités sensorielles du vin en produisant de nombreux composés aromatiques. En effet, cette levure possède une forte activité  $\beta$ -glucosidase permettant de libérer de nombreux composés aromatiques tels que les nor-isoprenoides, les terpenols et les lactones (Charoenchai *et al.*, 1997; Hernandez-Orte *et al.*, 2008; Comitini *et al.*, 2011; Azzolini *et al.*, 2012). Par ailleurs, comparé à *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* produit des concentrations plus importantes de 2-phenylethanol (Moreno *et al.*, 1991; Renault *et al.*, 2009). Cet alcool supérieur apporte des arômes fleuris et fruités au vin (Amerine et Joslyn, 1970; Nelson *et al.*, 1978). Enfin, *T. delbrueckii* produit des quantités importantes d'esters mineurs tels que le propanoate d'éthyle, l'isobutanoate d'éthyle et le dihydrocinnamate d'éthyle qui contribuent au caractère fruité du vin (Moreno *et al.*, 1991; Renault *et al.*, 2015).

## II.2. Besoins nutritifs

Les levures sont des organismes vivants dont l'activité requiert des apports nutritionnels permettant de fournir d'une part les éléments de base utilisés pour diverses synthèses biochimiques et d'autre part l'énergie nécessaire à ces synthèses.

### II.2.1. Sucre

Les levures utilisent les sucres du moût de raisin comme source de carbone et d'énergie pour assurer leurs fonctions vitales. Le moût de raisin contient en général entre 170 et 220 g/L de sucre constitué à 99% de glucose et de fructose. Les concentrations de ces derniers sont équivalentes. Après incorporation dans la cellule, ces sucres sont métabolisés par la levure par la voie de la glycolyse. Puis, en fonction des conditions d'aérobiose, la dégradation des sucres peut prendre deux voies métaboliques différentes: la respiration et la fermentation alcoolique (Figure 2).

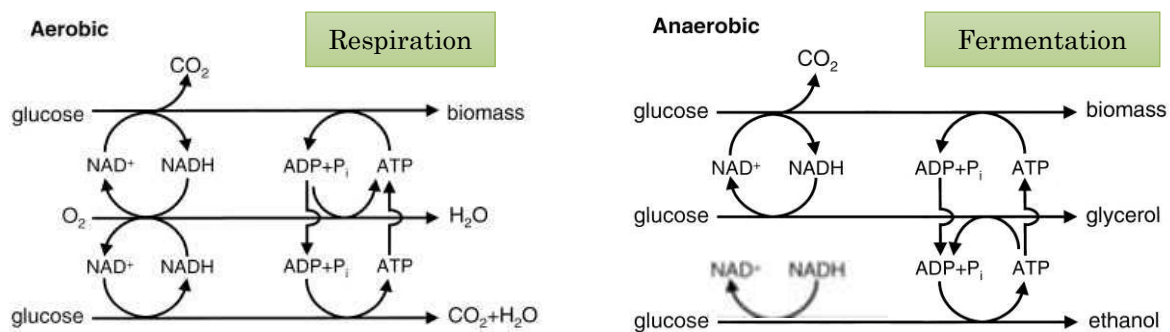


Figure 2 Voies métaboliques de consommation des sucres au sein de la levure (inspiré de Bakker *et al.*, 2001).

La glycolyse conduit à la formation de pyruvate. L'oxydation de ce dernier entraîne la libération d'ATP, fournissant ainsi de l'énergie biologiquement utilisable par la levure. En aérobiose, le pyruvate issu de la glycolyse est complètement oxydé en dioxyde de carbone et en eau: c'est la respiration. En absence d'oxygène, le pyruvate issu de la glycolyse est oxydé en dioxyde de carbone et en éthanol: c'est la fermentation. En anaérobiose, le glycérol est produit afin d'oxyder le NADH et ainsi équilibrer le potentiel d'oxydo-réduction de la levure. (Nordstöm, 1968; Lagunas et Gancedo, 1973; Oura, 1977; van Dijken et Scheffers, 1986). Il permet aussi à la levure de résister au stress osmotique induit par la forte teneur en sucre des moûts de raisin. (Blomberg et Adler, 1989, 1992; Myers *et al.*, 1997).

### *L'effet Pasteur*

En 1857, en comparant la croissance des levures en aérobiose et anaérobiose, Louis Pasteur a constaté une inhibition de la fermentation par la respiration. Lorsque la levure peut utiliser les sucres indifféremment par respiration ou par fermentation, l'aération induit une augmentation de la quantité de biomasse formée et une diminution de la production d'alcool. Pasteur en déduit que la respiration inhibe la fermentation pour de faibles concentrations en sucre (inférieure à 2 g/L).

### *L'effet Crabtree*

Lorsque la concentration en glucose est élevée, comme dans un moût de raisin, *S. cerevisiae* métabolise les sucres par voie fermentaire majoritairement. Ce phénomène découvert par Crabtree (1929) est appelé l'effet Crabtree, ou répression catabolique par le glucose, ou encore contre-effet Pasteur. La répression exercée sur les levures lors de la vinification des moûts de raisin est telle qu'elles sont contraintes à fermenter. Certaines levures, telles que *S. cerevisiae*, sont fortement Crabtree positives et produisent déjà de l'éthanol au-delà de 1 g/L de glucose tandis que celles pour lesquelles la respiration n'est pas réprimée par la présence de glucose sont dites Crabtree négative. *T. delbrueckii* peut être Crabtree positive (Alves-Araújo *et al.*, 2007; Merico *et al.*, 2007) ou Crabtree négative (Rodicio et Heinisch, 2009).

Dans le vin, environ 92% des sucres fermentescibles sont transformés en éthanol et en en dioxyde de carbone et environ 8% en glycérol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). L'impact de la teneur en sucre du moût diffère selon les levures. En effet, Charoenchai *et al.*, (1998) ont montré qu'une augmentation de la teneur en sucre du moût de 200 à 300 g/L n'entraîne pas de modification de la vitesse maximale de croissance et la production de biomasse de *S. cerevisiae*. Contrairement, la vitesse maximale de croissance et la production de biomasse de *T. delbrueckii* sont significativement affectées par l'augmentation de la teneur en sucres. Dans un environnement œnologique, les souches de *S. cerevisiae* consomment le sucre plus vite que celles de *T. delbrueckii* (Nissen *et al.*, 2004; Bely *et al.*, 2008; Lai, 2010; Taillandier *et al.*, 2014).

## II.2.2. Azote

L'azote est un élément essentiel pour la croissance et le métabolisme des levures (Jiranek *et al.*, 1995). Le manque d'azote est une des causes majeures de fermentation lente (Pretorius, 2000; Mendes-Ferreira *et al.*, 2004; Jolly *et al.*, 2014). La teneur en azote peut être un facteur limitant lors de la fermentation alcoolique (Ingledew et Kunkee, 1985). Pour pallier à cette limitation, le métabolisme des composés azotés des levures, particulièrement celui de *S. cerevisiae*, a fait l'objet de nombreuses études (Anderson et Kirsop, 1974; Henschke et Jiranek, 1993; Albers *et al.*, 1996; Arias-Gil *et al.*, 2007; Carrau *et al.*, 2008; Bergdahl *et al.*, 2012; Crepin *et al.*, 2012; Casalta *et al.*, 2013). Les moûts de raisin sont constitués d'un mélange complexe de composés azotés. La composition de ce mélange varie selon les cépages, les conditions climatiques, la maturité des raisins et la gestion de la nutrition de la vigne (Beltran *et al.*, 2004; Bell et Henschke, 2005; Barbosa *et al.*, 2012).

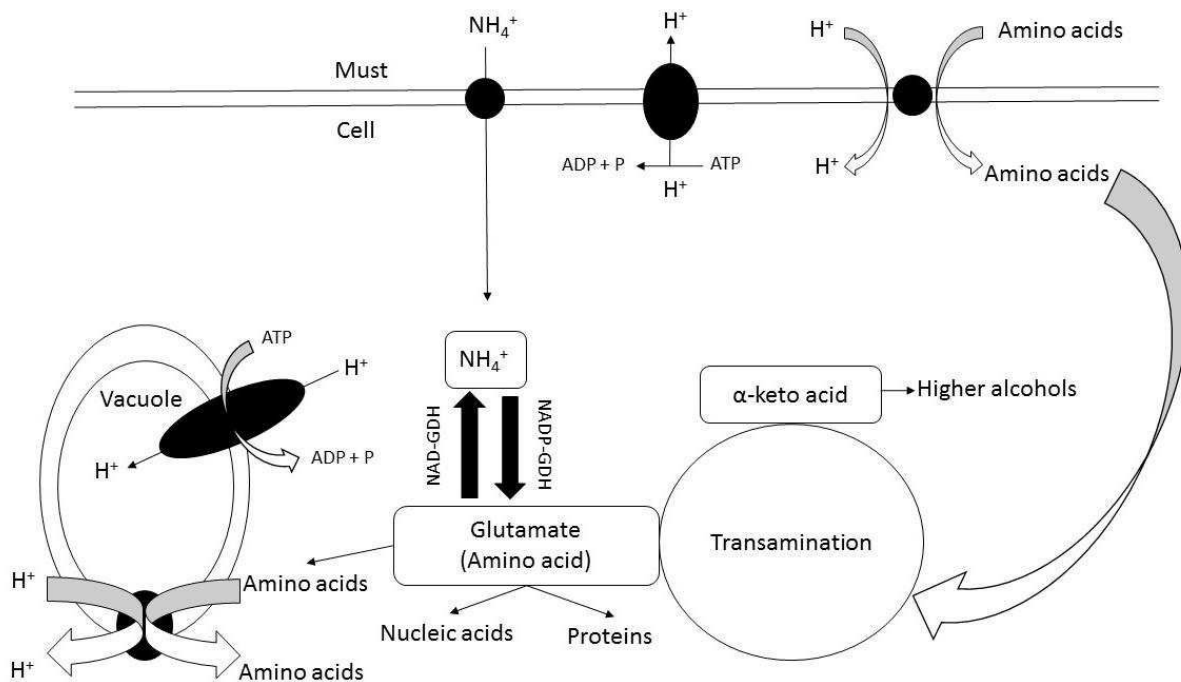


Figure 3 Schéma de l'absorption et du métabolisme des composés azotés par les levures (Aranda *et al.*, 2011).

Les composés azotés que l'on retrouve dans les moûts de raisin sont: des cations ammonium, des acides aminés et des polypeptides. Les acides aminés (à l'exception de la proline) et les ions ammonium constituent les sources d'azote assimilable par la levure (Ingledew *et al.*, 1987). Le transport des éléments azotés du milieu fermentaire vers l'intérieur de la cellule est assuré par des mécanismes de transport actifs (Figure 3). Le transport des acides aminés est couplé à un transfert de protons via un symport. Le transport des ions ammonium est effectué par des perméases en présence de glucose (Henschke et Jiranek, 1993; Aranda *et al.*, 2011). L'azote est assimilé au cours des deux premiers jours de fermentation (Monteiro et Bisson, 1991). Les composés azotés sont dégradés selon un ordre spécifique qui dépend de leur importance dans les processus de biosynthèse et de l'efficacité de leur transport (Cooper, 1982). Pendant la phase de croissance, plus de la moitié des réserves

intracellulaires d'acides aminés des levures se trouve dans les vacuoles (Wiemken et Dürr, 1974). Cette compartimentation contribue à la régulation de l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés (Sumrada et Cooper, 1982).

Les ions ammonium et le glutamate sont au centre du métabolisme azoté des levures (Figure 3). L'azote ammoniacal est rapidement incorporé dans les voies métaboliques de biosynthèse par le biais de la glutamate déshydrogénase NADP<sup>+</sup>-dépendante. De plus, il est le produit final du catabolisme des composés azotés, catalysé par glutamate déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante. Par ailleurs, les acides aminés subissent des processus d'interconversion via le système transaminase, dans lequel le glutamate joue un rôle extrêmement important en tant que donneur et accepteur de groupements aminés. Le métabolisme des composés azotés contribue aussi à la formation de produits impactant les propriétés sensorielles du vin.

La supplémentation d'azote assimilable au moût de raisin améliore les performances de la fermentation (Arias-Gil *et al.*, 2007; Lai, 2010). Le sulfate d'ammonium et le phosphate d'ammonium sont souvent utilisés en Europe à la teneur maximale de 1 g/l (Réglementation européenne, 1999). Une supplémentation excessive entraîne l'apparition de carbamate d'éthyle qui est toxique pour la levure (Adams et van Vuuren, 2010) et l'acidification du moût (Taillandier *et al.*, 2007). La concentration d'azote assimilable du moût influence la production de composés volatils et les caractéristiques sensorielles du vin (Miller *et al.*, 2007; Ugliano *et al.*, 2007; Garde-Cerdán et Ancín-Azpilicueta, 2008) (Figure 4).

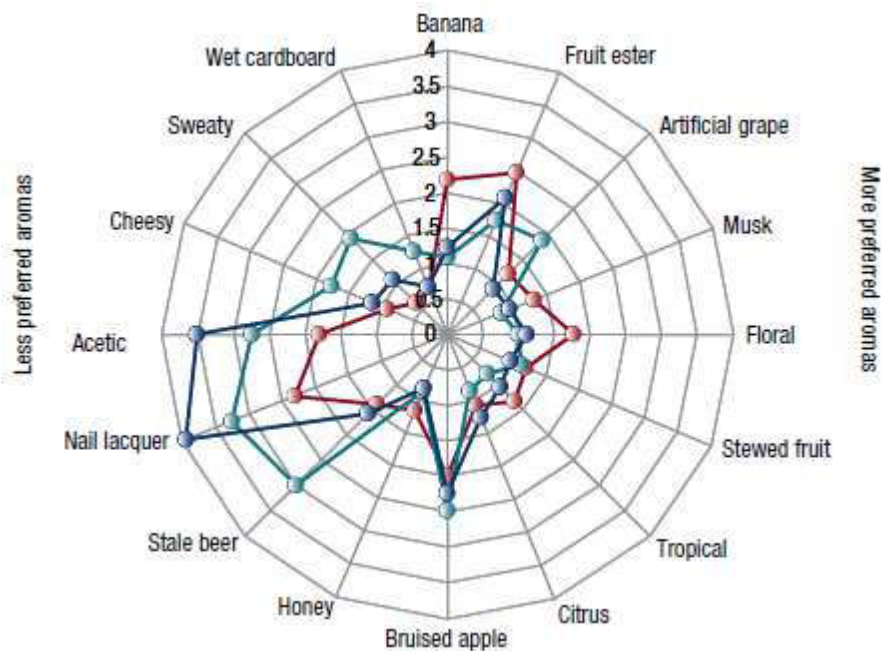


Figure 4 Profil aromatique du vin provenant de la fermentation de jus de Chardonnay contenant 160 (vert), 320 (rouge) et 480 mg N/L (bleu) d'azote assimilable. Les fermentations ont été effectuées à 18°C par *S. cerevisiae* AWRI 796 (Ugliano *et al.*, 2007).

Plusieurs auteurs ont étudié la quantité minimale d'azote nécessaire pour que *S. cerevisiae* réalise une fermentation complète. Certains évoquent une concentration comprise entre 120 et 140 mg N/L pour des concentrations initiales en sucre comprises entre 160 et 240 g/L (Bely *et al.*, 1990; Jiranek *et al.*, 1995). D'autres mentionnent une concentration comprise



entre 0,62 et 0,91 mg N/g de sucre (Taillandier *et al.*, 2007). Ce seuil varie selon les souches utilisées (Crépin *et al.*, 2014). *T. delbrueckii* semble avoir des besoins en azote inférieurs à ceux de *S. cerevisiae* (Ciani *et al.*, 2006; Bely *et al.*, 2008). Taillandier *et al.*, (2014) ont observé que la fermentation du milieu synthétique MS300 par *T. delbrueckii* présentait une quantité résiduelle d'azote assimilable importante (25 mg N/L) tandis que *S. cerevisiae* assimilait complètement l'azote disponible dans les mêmes conditions.

Chaque levure préfère assimiler certaines sources d'azote plutôt que d'autres (De Koker, 2015). La nature de la source d'azote influence la croissance et l'activité fermentaire des levures (Kemsawasd *et al.*, 2015a; Gobert *et al.*, 2017). Lors de cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*, Kemsawasd *et al.*, (2015a) ont comparé l'efficacité de plusieurs sources d'azote selon 3 critères: le taux de croissance spécifique maximal, la population maximale et la vitesse de fermentation. Les sources d'azote étaient constituées soit de sulfate d'ammonium, soit d'un acide aminé, soit d'un mélange de 19 acides aminés, soit d'un mélange de 19 acides aminés et du sulfate d'ammonium. Les sources d'azote ayant un effet positif sur les 3 critères précédemment cités étaient l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la glutamine, l'isoleucine, le sulfate d'ammonium, la serine, la valine, le mélange de 19 acides aminés et le mélange de 19 acides aminés plus le sulfate d'ammonium (pour *S. cerevisiae*), l'arginine, l'asparagine, la glutamine, l'isoleucine et le mélange de 19 acides aminés (pour *T. delbrueckii*).

### II.2.3. Lipides

Les lipides ont un rôle essentiel dans la cellule car ce sont les constituants majoritaires des membranes. Parmi les composants lipidiques majeurs des membranes eucaryotes on retrouve les acides gras, les phospholipides, les stérols et les sphingolipides. Ils sont issus soit de la synthèse *de novo* à partir de précurseurs tels que l'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA), soit de l'incorporation de lipides exogènes.

#### II.2.3.1. Acides gras

La synthèse *de novo* des acides gras a lieu essentiellement dans le cytoplasme et nécessite la présence d'acétyl-CoA. Ce précurseur est issu de la glycolyse et de la voie du pyruvate acétaldéhyde-acétate. La condensation d'un acétyl-CoA et d'un ion bicarbonate entraîne la formation de malonyl-CoA. L'élongation se fait par la condensation successive d'unités de malonyl-CoA sur une molécule d'acétyl-CoA. Chez la levure, l'élongation s'arrête lorsque la chaîne de l'acyl-CoA atteint 14 ou 16 atomes de carbone en fonction de l'espèce. Néanmoins, des acides gras à plus courte chaîne peuvent être issus de cette voie. L'acide gras le plus long détecté chez la levure possède 26 atomes de carbone (Kohlwein *et al.*, 2001; Beopoulos *et al.*, 2011). Chez *S. cerevisiae*, une voie de biosynthèse dans la mitochondrie a été mise en évidence (Brody *et al.*, 1997).

En plus de l'élongation, les acides gras sont modifiés par désaturation. Celle-ci est réalisée par des désaturases et nécessite la présence d'oxygène moléculaire. Chez les levures, 4 désaturases différentes ont été identifiées (Beopoulos *et al.*, 2011):

- $\Delta 9$ : insère une première double liaison sur les acides gras C16:0 et C18:0 afin d'obtenir respectivement les acides palmitoléiques (C16:1) et oléiques (C18:1)

- Δ12: insère une deuxième double liaison sur les acides gras C18:1 pour former l'acide linoléique (C18:2)
- Δ15 : insère une double liaison sur les acides gras C18:2 pour obtenir l'acide α-linolénique (C18:3, ω3)
- Δ6 : insère une double liaison soit sur l'acide α-linolénique soit sur l'acide oléique. Les acides gras formés sont respectivement l'acide stéaridonique (C18 :4) ou l'acide α-linolénique(C18:3, ω3)

Les acides palmitiques (C16), oléiques (C18), palmitoléiques (C16 :1), linoléiques (C18 :1) et linoléiques (C18 :2) sont principalement retrouvés (Daum *et al.*, 1998). Les acides gras peuvent être estérifiés avec du glycérol, des stérols ou des alcools pour former respectivement des acylglycérols, des esters de stérols et des cérides.

### II.2.3.2. Phospholipides

Les phospholipides sont constitués de deux acides gras rattachés à un glycérol, d'un groupement phosphate et d'une tête polaire, variant d'un phospholipide à l'autre. Généralement, l'acide gras en position 1 est saturé, contrairement à celui en position 2 qui est le plus souvent insaturé. Les phospholipides principalement retrouvés chez la levure sont: le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylcholine (PC) et le diphosphatidylglycérol (cardiolipine) (Figure 5).

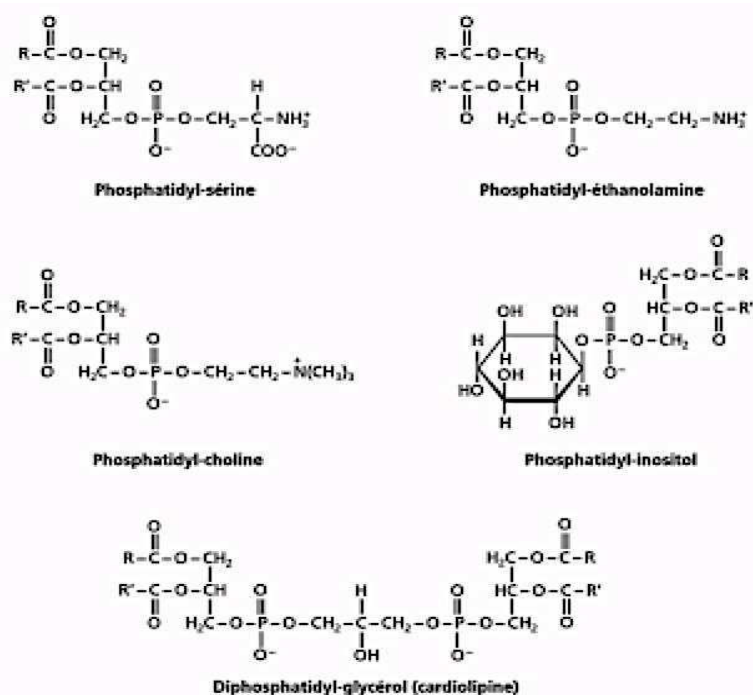


Figure 5 Phospholipides membranaires chez la levure (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012).

L'acide phosphatidique est le précurseur de tous les phospholipides. La synthèse des phospholipides a lieu essentiellement dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique mais peut aussi se dérouler dans l'appareil de Golgi et les gouttelettes lipidiques (Zinser *et al.*, 1991; Leber *et al.*, 1995).

Le PI est impliqué dans la signalisation cellulaire et la réception membranaire. Il est indispensable à la synthèse de certaines protéines et notamment des PI-kinases impliquées dans le fonctionnement du noyau, le transport des macromolécules, l'organisation du cytosquelette d'actine... La PS est un intermédiaire réactionnel impliqué dans la voie de biosynthèse des deux phospholipides majoritaires, la PC et la PE. Les PE et PC sont impliqués dans la division et la signalisation cellulaire, l'autophagie et la phagocytose (Daum *et al.*, 1998). Minoritaire dans la composition en phospholipides des levures (Tableau 1), la cardiolipine est un constituant majeur de la membrane mitochondriale.

Tableau 1 Composition en phospholipides de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Zinser *et al.*, 1991; Murakami *et al.*, 1995)

Lipides	Phospholipides (%)	
<i>Phosphatidylcholine</i>	16,8	29,3
<i>Phosphatidyléthanolamine</i>	17,7	37,4
<i>Phosphatidylinositol</i>	17,7	18,7
<i>Phosphatidylsérine</i>	33,6	4,9
<i>Cardiolipide</i>	0,2	7,3
<i>Acide phosphatidique</i>	3,9	2,4
<i>Autres</i>	6,9	-
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>

### II.2.3.3. Stérols

Les stérols sont des constituants essentiels des membranes biologiques. Ils représentent en général entre 0,1 et 1% du poids sec cellulaire (Ratray *et al.*, 1975). Les stérols agissent comme des régulateurs importants de la fluidité et de la perméabilité membranaire (Gaber *et al.*, 1989). Chez *S. cerevisiae* ils sont synthétisés principalement en fin de phase exponentielle de croissance. Chez les levures, l'ergostérol est majoritaire. Le lanostérol et le zymostérol sont également retrouvés (Figure 6) (Parks et Adams, 1978).

La biosynthèse des stérols se fait à partir de l'acétyl-CoA et nécessite 20 réactions successives impliquant plus de 20 gènes différents (Daum *et al.*, 1998; Parks et Casey, 1995). Elle se déroule dans le réticulum endoplasmique (Dupont *et al.*, 2012). Une succession d'étapes réactionnelles va permettre d'aboutir à la formation de squalène qui est le précurseur des stérols de la levure (Souza et Pichler, 2007). La synthèse des stérols à partir du squalène nécessite la présence d'oxygène moléculaire, pouvant être apporté sous forme de dioxygène dissous ou de lipides exogènes présents dans le milieu de culture. En plus de leur incorporation au sein des membranes, les stérols peuvent être estérifiés avec des acides gras et stockés dans les gouttelettes lipidiques. Le lanostérol et le zymostérol sont estérifiés préférentiellement par rapport à l'ergostérol.

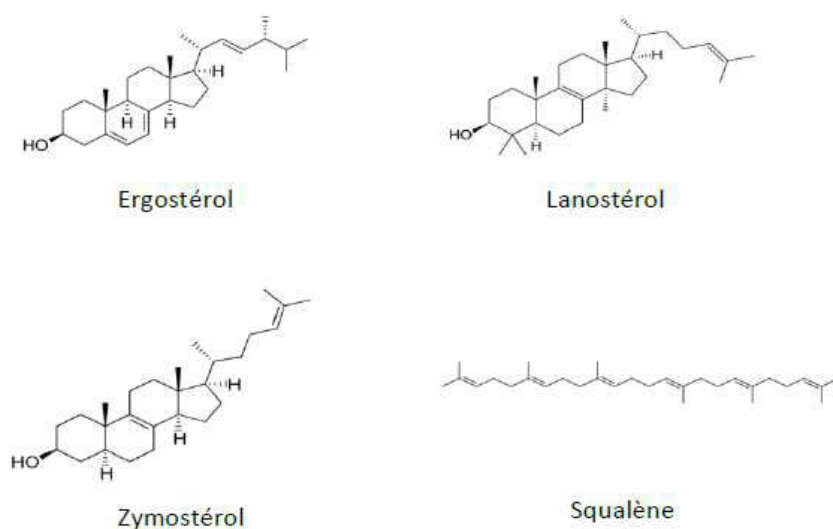


Figure 6 Principaux stérols de la levure et leur précurseur (squalène) (Ribéreau-Gayon et al., 2012).

#### II.2.3.4. Sphingolipides

Les sphingolipides sont des dérivés de la sphingosine (Figure 7). La sphingosine est un alcool gras possédant 18 atomes de carbones, deux groupements alcool (C1 et C3), une insaturation (C4) et un groupement amine (C2). Pour former les sphingolipides, un acide gras va être fixé par une liaison amine au niveau du groupement  $\text{NH}_2$  de la sphingosine. Sur la fonction alcool primaire de cette dernière, différents types de groupements peuvent être ajoutés (choline, éthanolamine, composés glycosylés...). Chez *S. cerevisiae* le mannose-inositol phosphorylcéramide est le sphingolipide majoritaire.



Figure 7 Sphingosine.

La synthèse de sphingolipides commence dans le réticulum endoplasmique et se termine dans l'appareil de Golgi (Riezman, 2006). Les sphingolipides sont situés principalement dans la membrane plasmique (Patton et Lester, 1991). L'utilisation de souches mutantes de levures déficientes pour la synthèse de sphingolipides a montré que ces lipides sont essentiels à la croissance et à la viabilité de la levure *S. cerevisiae* (Wells et Lester, 1983).

#### II.2.3.5. Structure de la membrane plasmique

La membrane plasmique est une barrière sélectivement perméable entre la cellule et son environnement extérieur, d'une épaisseur de 7,5 à 12,5 nm. C'est une structure complexe constituée de lipides, de protéines et de sucres (Figure 8). Parmi les lipides

membranaires, les phospholipides ont une importance particulière puisqu'ils forment une double couche lipidique à l'origine de la compartimentation (Van der Rest *et al.*, 1995). Les lipides constituent 25 à 50% du poids des membranes et ont une concentration avoisinant les  $5 \cdot 10^6$  molécules de lipides par  $\mu\text{m}^2$  de bicouche lipidique (Vo-Van, 2015). Au sein de la membrane, une molécule lipidique change de place avec ses voisines environ  $10^7$  fois par seconde (Lodish *et al.*, 2005). Les lipides contribuent au maintien de l'intégrité de la membrane plasmique (Thomas *et al.*, 1978; Alexandre *et al.*, 1994). En affectant l'activité de nombreuses enzymes et transporteurs membranaires, la composition lipidique des membranes influence fortement leurs fonctions physiologiques (Avery *et al.*, 1995; Vigh *et al.*, 1998). *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* ont la capacité d'incorporer des lipides exogènes (Rodriguez *et al.*, 1985; Certik et Shimizu, 1999; Mauricio *et al.*, 1998; Luparia *et al.*, 2004; Pina *et al.*, 2004; Landolfo *et al.*, 2008). L'incorporation de ces derniers entraîne des changements dans la composition lipidique de la membrane (Beltran *et al.*, 2006).

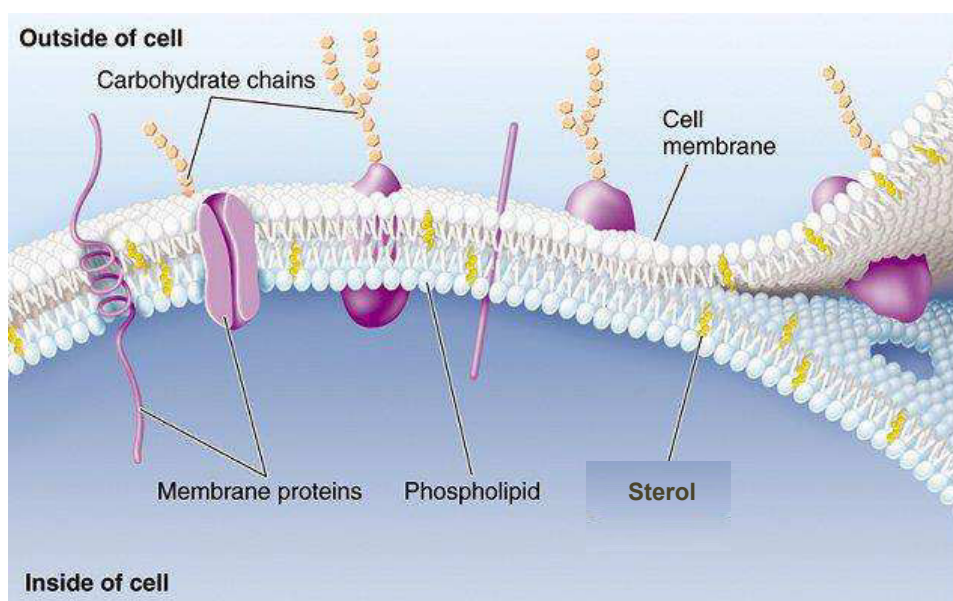


Figure 8 Représentation schématique d'une membrane biologique (Vo-Van, 2015).

### II.2.3.6. Lipides et fermentation alcoolique

Au cours de la fermentation alcoolique, l'augmentation de la concentration en éthanol et la faible quantité d'oxygène dissous constituent deux stress importants auxquels la levure doit s'adapter.

La présence d'oxygène est indispensable à la synthèse *de novo* des lipides insaturés (Pfisterer *et al.*, 1977; Larue *et al.*, 1980). La teneur en oxygène dans les moûts de fermentation est faible, dans ces conditions l'absence de lipides entraîne une mortalité importante (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2002; Landolfo *et al.*, 2008; Mannazzu *et al.*, 2008). Par conséquent, les lipides sont nécessaires pour la croissance (Andreasen et Stier, 1953, 1954). Certes ajouter des lipides au moût de raisin favorise la croissance des levures (Deytieux *et al.*, 2005) mais cela entraîne des modifications de performances fermentaires qui diffèrent selon la levure et la nature des lipides. En effet, Mauricio *et al.*, (1998) ont

observé que compléter un moût de raisin avec 25 mg/L d'ergostérol et 31 mg/L d'acide oléique améliorerait la vitesse de fermentation de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Dans la même étude, la supplémentation du moût avec seulement 25 mg/L d'ergostérol induisait une augmentation de la vitesse de fermentation de *S. cerevisiae* alors que celle de *T. delbrueckii* diminuait significativement.

Lorsque les lipides ne sont pas disponibles dans le milieu de culture, l'anaérobiose induit un stress cellulaire important (Belviso *et al.*, 2004). Dans le moût, les acides gras insaturés sont majoritaires. L'acide linoléique est le plus abondant (Castela *et al.*, 1985). Trois phytostérols sont également retrouvés: le  $\beta$ -sitostérol (majoritaire), le stigmastérol et le campestérol (Le Fur *et al.*, 1994). L'ergostérol et les acides gras présents dans le milieu sont rapidement assimilés par les levures. Les acides gras insaturés et l'ergostérol présents dans le moût peuvent notamment permettre aux levures de pallier au manque d'oxygène lors de cultures en anaérobiose (Pina *et al.*, 2004; Landolfo *et al.*, 2010). *S. cerevisiae* est capable d'incorporer les phytostérols du moût. Néanmoins, cela affecte sa croissance et peut donner lieu à des fermentations languissantes (Rozès, 1992; Luparia *et al.*, 2004).

Au cours de la fermentation alcoolique, la levure doit s'adapter au stress engendré par l'augmentation de la concentration en éthanol. En effet, l'éthanol affecte certains systèmes de transport, le fonctionnement de certaines enzymes, la fluidité membranaire... (Nagodawithana et Steinkraus, 1976; Casey et Ingledew, 1986; Salmon *et al.*, 1993; Alexandre *et al.*, 1994; Ibeas et Jimenez, 1997). Les lipides jouent un rôle dans la résistance au stress induit par l'éthanol et dans le maintien d'une forte vitesse de production d'éthanol (Casey *et al.*, 1984; Chi et Arneborg, 1999). Il existe une corrélation entre l'augmentation du degré d'insaturation des membranes, l'augmentation de la teneur en ergostérol et la tolérance à l'éthanol chez *S. cerevisiae* (Beaven *et al.*, 1982; Ghareib *et al.*, 1988; Mishra et Kaur, 1991; del Castillo Agudo, 1992; Sajbidor et Grego, 1992; You *et al.*, 2003). Très peu de données sont disponibles chez *T. delbrueckii* mais il semblerait que la tolérance à l'éthanol ne soit pas systématiquement liée à l'augmentation de la proportion d'acides gras insaturés et d'ergostérol (Pina *et al.*, 2004).

#### II.2.4. Oxygène

L'oxygène assure le contrôle de l'orientation métabolique et intervient dans la synthèse lipidique. La concentration d'oxygène dissous à la saturation est de 7 à 8 mg/L dans de l'eau à 30°C. Cet oxygène est très rapidement consommé par les levures, principalement par les voies respiratoires, mineurairement (15 %) par les voies métaboliques de production des stérols et des acides gras non-saturés (Salmon *et al.*, 1998). Dans les fermentations œnologiques, l'oxygène est généralement apporté pour augmenter la synthèse de biomasse et en conséquence la vitesse de la FA. Pour ce type d'addition, pendant les vinifications, le besoin d'oxygène est modeste et est estimé à 5 à 10 mg/L. Cependant, les levures peuvent consommer des quantités élevées d'oxygène pendant la FA sans provoquer des effets négatifs dans le cas où l'apport de l'oxygène ne dépasse pas 50 mg/L. Au-delà, cet effet devient très négatif, aussi bien au niveau de la couleur que des arômes (Blateyron *et al.*, 1998). Pour satisfaire sa croissance, *T. delbrueckii* a des besoins en oxygène supérieurs à ceux de *S. cerevisiae* (Visser *et al.*, 1990; Mauricio *et al.*, 1991; Holm Hansen *et al.*, 2001; Hanl *et al.*, 2005; Brandam *et al.*, 2013).

### II.2.5. Autres

En plus du sucre, de l'azote, de l'oxygène et des lipides, la levure a besoin de vitamines et d'éléments minéraux pour éviter toute carence susceptible de limiter l'activité cellulaire (Salmon, 1998).

Les vitamines sont impliquées dans la structure des coenzymes des enzymes métaboliques des levures, elles agissent donc sur la multiplication et l'activité cellulaire (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Les principales vitamines retrouvées dans les moûts de fermentation sont: la biotine, l'acide pantothénique, le myo-inositol, l'acide nicotinique et la thiamine. Leurs concentrations dans le moût de raisin sont comprises entre 1 et 450 µg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012).

Les oligoéléments ou éléments minéraux sont présents en très faibles quantités, voire à l'état de trace dans le moût de raisin mais ils sont importants pour les métabolismes cellulaires. Les éléments minéraux sont des constituants des enzymes métalliques intervenant dans les voies métaboliques. Les éléments minéraux contiennent principalement des métaux comme K, Na, P, Mg, Mn... et plusieurs autres traces minérales, Al, Ag, Br, Cr, Pb, Sn, Zn...(Ough et Amerine, 1988; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

### III. Interactions

Les levures non-*Saccharomyces* sont généralement prédominantes dans les premières étapes de la vinification. Cependant, en raison de la compétition microbienne et de leur faible tolérance à l'éthanol, les levures non-*Saccharomyces* sont habituellement dominées par les levures *Saccharomyces* qui se développent rapidement et terminent la fermentation alcoolique (Henschke et Jiranek, 1993; Martini *et al.*, 1996; Fleet *et al.*, 2002; Pretorius *et al.*, 2003; Combina *et al.*, 2005). Parmi les levures non-*Saccharomyces* isolées des moûts de raisin, *T. delbrueckii* est une espèce qui a attiré l'attention de nombreux chercheurs en œnologie pour son impact positif sur la qualité sensorielle du vin. Ainsi, plusieurs études impliquant des cultures mixtes de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* ont été réalisées afin d'évaluer leurs potentialités à l'amélioration de la qualité du vin (Bely *et al.*, 2008; Sadoudi *et al.*, 2012; Taillandier *et al.*, 2014; Renault *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

#### III.1. Classification des interactions

Dans les environnements œnologiques, plusieurs groupes de micro-organismes cohabitent. Des interactions s'établissent alors entre les populations différentes. Elles ont lieu non seulement entre différents genres ou espèces comme les levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*, mais également entre différentes souches d'une même espèce. La présence ou l'absence de contact physique (interaction directe ou indirecte) entre les populations est un des critères généraux pour classer ces interactions entre micro-organismes (Strehaiano *et al.*, 2008). Ces interactions sont aussi classées selon leurs conséquences inhibitrices, activatrices ou neutres (Siewewerts *et al.*, 2008). La classification des différentes interactions microbiennes possibles est représentée sur la Figure 9.

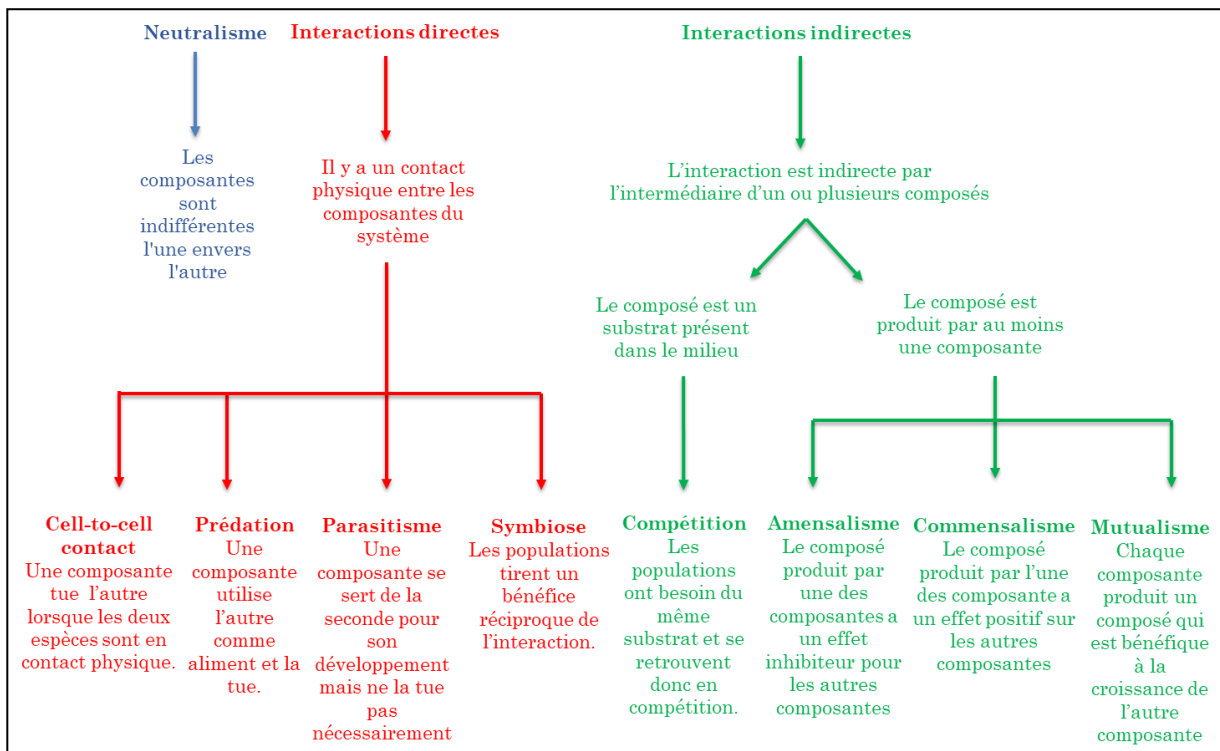


Figure 9 Classification des différentes interactions microbiennes possibles (Renouf, 2006).



## III.2. Mécanismes

### III.2.1. Limitation nutritionnelle et compétition

La limitation nutritionnelle correspond à la diminution de la disponibilité des nutriments qui survient au cours de la FA. Le développement d'une levure dans le moût diminue les sources de nutriments du milieu et le rend moins favorable pour la croissance d'une autre levure. Les limitations nutritionnelles modulent l'écologie des levures dans la mesure où elles sont constamment en compétition pour ingérer les substrats disponibles.

Taillandier *et al.*, (2014) ont étudié l'influence de l'azote assimilable sur les cultures mixtes séquentielles de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Dans ces cultures *S. cerevisiae* a été inoculée 48h après *T. delbrueckii*. Lorsque la concentration initiale d'azote assimilable est réduite de 324 à 176 mg N/L, *S. cerevisiae* ne parvient plus à croître dans le milieu du fait de l'épuisement de l'azote complètement assimilé par *T. delbrueckii*.

*T. delbrueckii* est moins tolérante à la déplétion en oxygène disponible que *S. cerevisiae*. La disparition de l'oxygène résiduel du moût, provoquée par la croissance des levures pourrait contribuer à la domination de *S. cerevisiae*. En effet, une augmentation de l'oxygène favorise la croissance de *T. delbrueckii* en culture mixte avec *S. cerevisiae* (Holm Hansen *et al.*, 2001).

De manière analogue, la déplétion de certaines vitamines influe sur la dynamique des populations (Bisson, 1999). En effet, Bataillon *et al.*, (1996) ont étudié l'évolution de la levure non-*Saccharomyces Kloeckera apicula* en présence de *S. cerevisiae* dans un milieu synthétique. Le développement de *K. apicula* a entraîné une diminution importante de la thiamine, conduisant à une faible croissance de *S. cerevisiae*.

Le sucre représente la source de carbone principale des levures. En milieu œnologique, *S. cerevisiae* consomme le sucre plus vite que les levures non-*Saccharomyces*. Nissen *et al.*, (2004) ont observé que plus la vitesse spécifique de consommation de sucre d'une levure non-*Saccharomyces* en culture pure est élevée, moins sa mortalité précoce sera importante en culture mixte avec *S. cerevisiae*.

Par ailleurs, la croissance des levures peut être favorisée par l'activité protéolytique et pectolytique de certaines espèces qui hydrolysent les protéines et pectines du moût, pouvant alors servir de substrat pour la croissance des levures (Charoenchai *et al.*, 1997; Dizy et Bisson, 2000). Ce commensalisme contribue à réduire les limitations nutritionnelles.

L'étude des interactions au niveau moléculaire montre une stimulation de gènes impliqués dans l'activité glycolytique de *S. cerevisiae* et de *T. delbrueckii* lorsque ces levures sont en contact (Tronchoni *et al.*, 2017). Par ailleurs, une activation du métabolisme azoté de *S. cerevisiae* a été observée (Curiel *et al.*, 2017). Ces modifications influencent la compétition pour les substrats et sont déclenchées après la détection d'une levure compétitrice dans le milieu.

Selon leur concentration initiale dans le moût, d'autres composés comme les lipides et les minéraux sont susceptibles d'induire des limitations nutritionnelles.

### III.2.2. Communication cellulaire

Le quorum sensing est un mécanisme de communication cellulaire impliquant des molécules signal de faible poids moléculaire (Fuqua *et al.*, 1994; Wuster et Babu, 2008). Ces molécules sont produites pendant la croissance et lorsque leur concentration atteint une valeur seuil, cela induit l'activation ou l'inhibition de certains gènes (Zupan *et al.*, 2013; Avbelj *et al.*, 2015). Ces mécanismes de communication régulent de nombreuses fonctions biologiques (croissance, morphologie...). Il y a une absence de consensus quant à la définition des molécules du quorum sensing. Avbelj *et al.*, (2016) ont décrit plusieurs critères pour identifier les molécules impliquées dans le quorum sensing. Ces critères incluent notamment l'absence de toxicité de ces molécules lorsqu'elles sont présentes à des concentrations requises pour leur action. Le bicarbonate, l'acétaldéhyde, les ions ammonium, certains peptides (phéromones), lipides et alcools supérieurs jouent le rôle de molécules signal dans les mécanismes de communications cellulaires (Palková *et al.*, 1997; Hornby *et al.*, 2001; Wang et Dohlman, 2004; Hazelwood *et al.*, 2008; Atkinson et Williams, 2009). Ces molécules agissent sur les cellules d'une même espèce et aussi sur les cellules d'espèces différentes en culture mixte.

Plus récemment, le rôle de la protéine de choc thermique Hsp12 dans la réponse de *S. cerevisiae* au cours des cultures mixtes de levure a été souligné (Rivero *et al.*, 2015). Cette molécule agirait comme un signal de danger qui active la réponse au stress des cellules environnantes. Toutefois, la Hsp12 ne semble pas être exclusive à *S. cerevisiae*, elle impacterait aussi le comportement de *T. delbrueckii* (Tronchoni *et al.*, 2017).

Nissen et Arneborg (2003) ont observé qu'en culture mixte, chaque espèce arrête de croître en réponse à la densité cellulaire de l'autre espèce. Ce phénomène, observé au cours de la co-inoculation de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, est assimilé à une compétition des deux levures pour un espace disponible limité (Arneborg *et al.*, 2005). La croissance de *T. delbrueckii*, aussi bien que celle de *S. cerevisiae*, est entravée par ce phénomène dont les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus.

### III.2.3. Toxines antimicrobiennes

Certaines levures peuvent sécréter des toxines antimicrobiennes nocives pour les levures compétitrices, il s'agit d'un cas particulier d'amensalisme.

Les protéines killer sont des toxines secrétées par des levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* (Lowe *et al.*, 2000; Philliskirk et Young, 1975; Woods et Bevan, 1968). L'importance des protéines killer (K1, K2, K28) de *S. cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique a fait l'objet de nombreuses publications (Heard et Fleet, 1987; Jacobs et Vuuren, 1991; Carrau *et al.*, 1993; Ramon-Portugal *et al.*, 1997; Gutiérrez *et al.*, 2001; Vadasz *et al.*, 2002). Ces toxines ont généralement un spectre d'action étroit qui est limité aux autres souches de *S. cerevisiae* (Heard et Fleet, 1987; Gutiérrez *et al.*, 2001). Néanmoins, certaines toxines ont une activité killer contre *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans* (Rodriguez-Cousino *et al.*, 2011) et *Candida glabrata* (Soares et Sato, 1999).

Les toxines killer des levures non-*Saccharomyces* ont été moins étudiées. Elles ont généralement un spectre d'action plus large que celles de *S. cerevisiae*. (Ciani et Comitini, 2011; Mehlomakulu *et al.*, 2014). Les toxines killer sécrétées par *Kluyveromyces wickerhamii* et *Wickerhamomyces anomala* inhibent la croissance de *Brettanomyces bruxellensis* (Comitini *et al.*, 2004). Celles sécrétées par *Pichia membranifaciens* inhibent la croissance de *Brettanomyces bruxellensis* (Santos *et al.*, 2009) et de *Botrytis cinerea* (Santos et Marquina, 2004), L'effet killer des toxines de *Tetrapisispora phaffii* à l'encontre de *Hanseniaspora uvarum* a aussi été observé (Comitini et Ciani, 2010).

De rares souches de *T. delbrueckii* produisent des toxines killer. La souche Kbarr produit des toxines killer actives contre *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *SchizoSaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *C.tropicalis*, *C.dublinsiensis*, *C. kefir*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. krusei*, *Yarrowia lipolytica* et *Hansenula mrakii* (Ramírez *et al.*, 2015; Velázquez *et al.*, 2015). La souche NPCC 1033 produit des toxines killer actives contre *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichiamanshurica* et *Pichia membranifaciens* (Villalba *et al.*, 2016).

Par ailleurs, *S. cerevisiae* produit des peptides anti-microbiens dénommés saccharomycines. Ils dérivent de l'enzyme glycolytique GAPDH (Albergaria *et al.*, 2010; Branco *et al.*, 2014, 2015; Rizk *et al.*, 2016; Branco *et al.*, 2017a, 2017b). Contrairement aux protéines killer, les saccharomycines ont un spectre d'action large. Elles inhibent notamment la croissance des levures non-*Saccharomyces* (*K. marxianus*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* et *H. guilliermondii*) (Albergaria et Arneborg, 2016) et des bactéries (*O. oeni*) (Branco *et al.*, 2014; Rizk *et al.*, 2016). Le rôle de l'enzyme glycolytique GAPDH dans l'amensalisme exercé par *S. cerevisiae* sur les levures compétitrices peut paraître insolite. Néanmoins, outre son activité glycolytique, la GAPDH est impliquée dans l'apoptose (processus d'autodestruction cellulaire) (Sirover, 2005; Silva *et al.*, 2011). Aussi, des peptides antimicrobiens dérivés de la GAPDH ont été isolés de tissus humains (Wagener *et al.*, 2013) et ichtyens (Seo *et al.*, 2012), démontrant ainsi l'importance de la GAPDH dans les différents systèmes de défense des organismes. Plusieurs fractions peptidiques antimicrobiennes produites par *S. cerevisiae* ont été mentionnées dans la littérature, cependant des études supplémentaires sont nécessaires pour savoir si elles proviennent de la GAPDH (Nehme *et al.*, 2010).

L'interaction entre les peptides antimicrobiens et la membrane des cellules sensibles constitue la première étape de l'activité toxique (Harris *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2011). La composition lipidique de la membrane joue un rôle primordial dans cette interaction (Kagan *et al.*, 1994). En effet, les cellules résistantes à la lyse induite par des peptides antimicrobiens ont une composition lipidique différente de celle des cellules sensibles (Izadpanah et Gallo, 2005).

### III.2.4. Contact cellulaire

L'interaction par contact cellulaire ou "cell-to-cell contact" a été décrite pour la première fois par Nissen *et al.*, (2003). Elle est définie par le fait qu'une levure entraîne la mort d'une autre levure par le biais d'un contact physique. Ce phénomène a été décrit uniquement pour des levures *Saccharomyces* entraînant la mort de levures compétitrices *Saccharomyces* ou non-*Saccharomyces* (Ciani et Comitini, 2015; Kemsawasd *et al.*, 2015; Nissen et Arneborg,

2003; Pérez-Torrado *et al.*, 2017; Renault *et al.*, 2013). La mort induite par contact cellulaire survient lorsque *S. cerevisiae* atteint une certaine densité cellulaire. Récemment, Branco *et al.*, (2017b) ont démontré que l'accumulation de peptides antimicrobiens dérivés de la GAPDH sur la membrane de *S. cerevisiae* était impliquée dans le cell-to-cell contact.

### III.3. Paramètres opératoires du procédé

#### III.3.1. Inoculation

Lors de la coculture, *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* peuvent être inoculées de façon simultanée ou séquentielle. Lors de la fermentation séquentielle, *S. cerevisiae* est inoculée 2 à 5 jours après *T. delbrueckii* (Ciani *et al.*, 2006; Bely *et al.*, 2008; Taillandier *et al.*, 2014). La co-inoculation simultanée est plus efficace que la co-inoculation séquentielle en termes de réduction d'acidité volatile (Ciani *et al.*, 2006; Bely *et al.*, 2008). Comparé à la co-inoculation séquentielle, la co-inoculation simultanée présente une vitesse de fermentation plus importante associée à des concentrations plus grandes de *S. cerevisiae* et des concentrations plus faibles de *T. delbrueckii* (Taillandier *et al.*, 2014; Renault *et al.*, 2015).

Pommier (2003) a étudié l'effet killer entre une souche killer et une souche sensible de *S. cerevisiae*. Cette étude a été réalisée dans un bioréacteur à membrane en l'absence de contact entre les deux levures. Il en ressort que le ratio d'inoculation entre les levures killer et sensibles impacte la dynamique de population des cultures mixtes (Figure 10). Plus la fraction de levures killer est importante à l'instant initial, plus vite les levures killer domineront la fermentation (> 50% des cellules totales). L'auteur a aussi observé que plus le ratio initial de levures killer est important, plus le temps d'apparition de l'effet killer est court. Cette observation est cohérente avec les travaux de Taillandier *et al.*, (2014) qui ont observé qu'une diminution du ratio d'inoculation *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* entraîne une diminution de la viabilité maximale de *T. delbrueckii* et une apparition plus précoce de la mortalité de *T. delbrueckii*. Néanmoins les mécanismes d'interactions indirectes entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* n'ont pas été identifiés au cours de ces travaux.

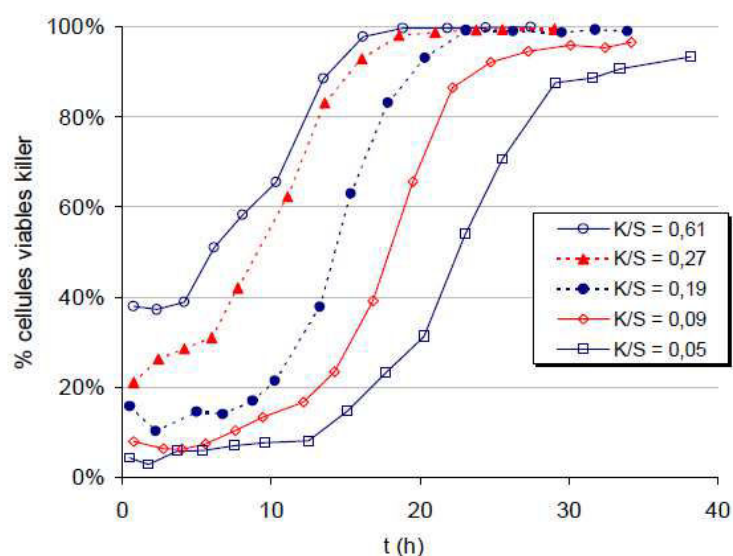


Figure 10 Influence du ratio d'inoculation sur l'évolution du pourcentage de levure killer dans la culture mixte:  $K/S$  représente le quotient des concentrations des levures killer sur les levures sensibles à l'instant initial (Pommier, 2003).

D'autre part, le ratio d'inoculation a un impact sur les caractéristiques sensorielles des breuvages issus des cultures mixtes de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. En effet, passer d'un ratio *S. cerevisiae*/*T. delbrueckii* de 1/2 à 1/20 entraîne une modification du profil aromatique et une augmentation significative d'octanoate d'éthyle (Toh *et al.*, 2018).

### III.3.2. Paramètres physico-chimiques

Des paramètres physicochimiques tels que le pH et la température jouent un rôle dans la compétition entre les levures. Le pH et la température influent sur l'efficacité des toxines antimicrobiennes (Pfeiffer et Radler, 1984; Rodriguez-Cousino *et al.*, 2011). Salvadó *et al.*, (2011) ont observé que le taux de croissance maximal de *S. cerevisiae* est significativement plus grand que celui de levures non-*Saccharomyces* (incluant *T. delbrueckii*) lorsque la température est supérieure à 15°C. De telles températures favorisent donc l'implantation de *S. cerevisiae*. L'expression de l'amensalisme est lui aussi dépendant de la température de fermentation. Au cours d'une culture mixte avec *Lachancea thermotolerans*, l'amensalisme de *S. cerevisiae* n'a pas été observé à 20°C alors qu'il était clairement présent à 25 et 30°C (Gobbi *et al.*, 2013). Récemment, Chasseriaud *et al.*, (2018) ont observé que la saturation du moût de fermentation en CO<sub>2</sub> favorise l'implantation de *T. delbrueckii* en culture mixte avec *S. cerevisiae*.

### III.4. Outils d'études

Des outils technologiques permettant de séparer physiquement les micro-organismes tout en maintenant un milieu homogène, ont été développés afin d'étudier l'influence du contact physique sur les interactions microbiennes. Il s'agit de supports perméables, de tubes de dialyse et de bioréacteurs à membrane. Pour observer les effets des interactions indirectes, chaque micro-organisme sera inoculé dans un seul compartiment du système.

#### III.4.1. Support perméable

Les supports perméables sont disponibles avec un diamètre de pore allant de 0,4 à 8 µm, ils permettent d'étudier les interactions microbiennes à très petite échelle dans une microplaque (Figure 11).

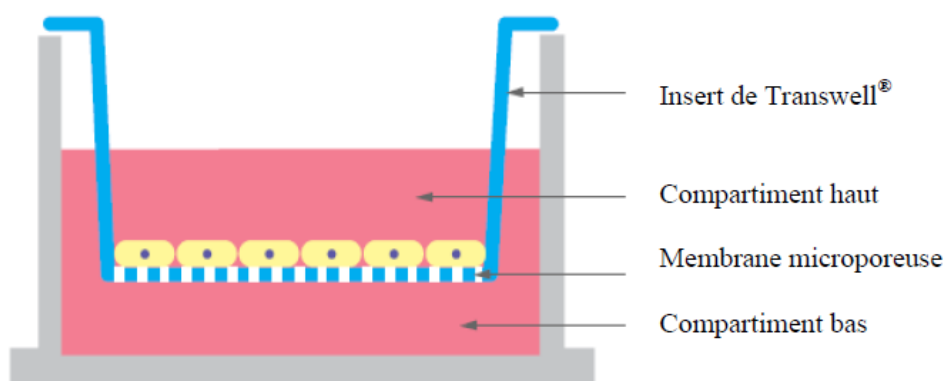


Figure 11 Support perméable Transwell®.

### III.4.2. Tubes de dialyse

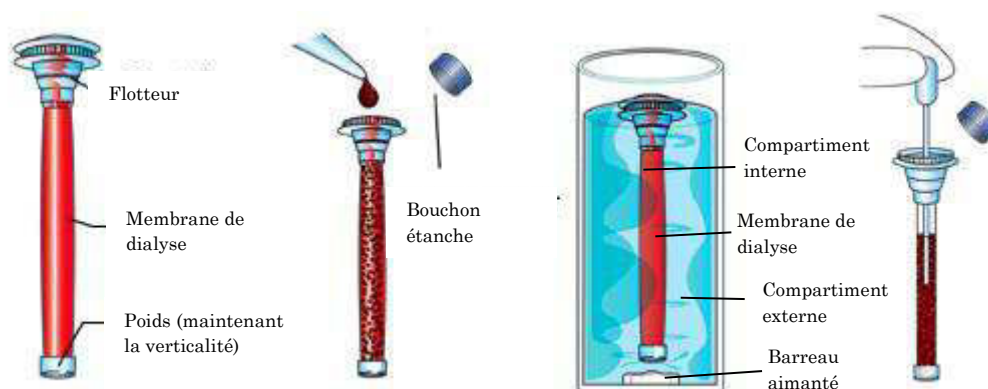


Figure 12 Tube de dialyse Float-A-Lyzer®.

Les tubes de dialyse ont des volumes allant de 1 à 10 mL et des seuils de coupure allant de 0,1 à 1000 kDa (Figure 12). Le seuil de coupure de la membrane détermine la taille des peptides microbiens susceptibles de la traverser. Kemsawasd *et al.*, (2015) ont étudié les effets du seuil de coupure de la membrane sur les interactions entre *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans*. Ils ont observé une disparité dans la répartition de peptides antimicrobiens (8 kDa) produit par *S. cerevisiae* entre l'extérieur et l'intérieur de la membrane avec un seuil de 3,5 à 5 kDa. Cette disparité n'a pas été observée avec un seuil de coupure de 1000 kDa. La mortalité de *L. thermotolerans* induite par ces peptides était moins rapide avec un seuil de coupure de 3,5 à 5 kDa car ils traversaient moins la membrane.

### III.4.3. Bioréacteurs à membrane

#### III.4.3.1. Bioréacteur à membrane plane (ISVV)

Un réacteur a été développé au sein de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin de l'Université de Bordeaux afin d'étudier l'évolution de deux micro-organismes vivant dans un milieu sans contact physique. Le fermenteur est composé de 2 compartiments pouvant contenir chacun un volume de milieu maximal de 1,1 L, soit un volume total de 2,2 L (Figure 13). Les 2 compartiments sont séparés par une membrane centrale permettant le passage du milieu mais pas des micro-organismes. Cette membrane a une porosité de 0,45  $\mu\text{m}$ . L'homogénéisation du milieu entre les deux compartiments via la diffusion à travers la membrane nécessite 12h. Afin d'avoir une homogénéisation plus rapide, un système de pompe péristaltique permet le passage du milieu d'un compartiment à l'autre. Deux capsules de filtration contenant une membrane de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosité se trouvent au-dessus de chaque compartiment afin d'empêcher le passage des levures d'un compartiment à l'autre. Le fermenteur est placé sur une balance de précision et contient deux agitateurs magnétiques.

La régulation de la température et le suivi de la cinétique de fermentation se font de manière automatisée. Une sonde placée à l'intérieur du fermenteur permet de contrôler la température qui est ajustée grâce à deux ampoules à infrarouge placées derrière chaque

compartiment. L'acquisition de la masse du fermenteur se fait toutes les vingt minutes, permettant ainsi de mesurer le dégagement de CO<sub>2</sub> ainsi que sa vitesse.

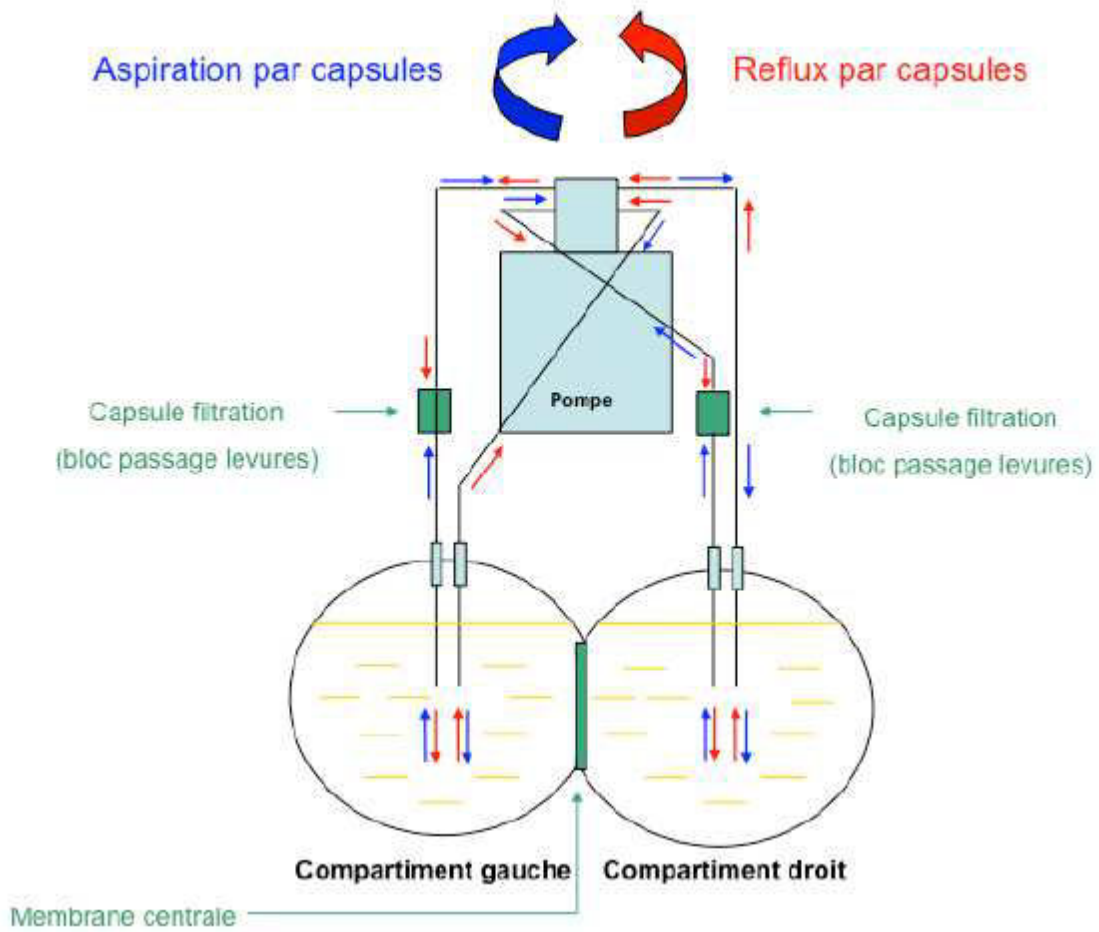


Figure 13 Présentation du fermenteur double compartiment (Renault et al., 2013).



### III.4.3.2. Bioréacteur à membrane fibres creuses (LGC)

Depuis près de 20 ans, pour étudier les interactions indirectes lors de cocultures de micro-organismes, un bioréacteur à membrane a été conçu et développé au Laboratoire de Génie Chimique (Albasi *et al.*, 1998; Salgado *et al.*, 2000; Pommier *et al.*, 2005) (Figure 14). Son fonctionnement est détaillé dans la partie I.3.3 de Matériel et méthodes.

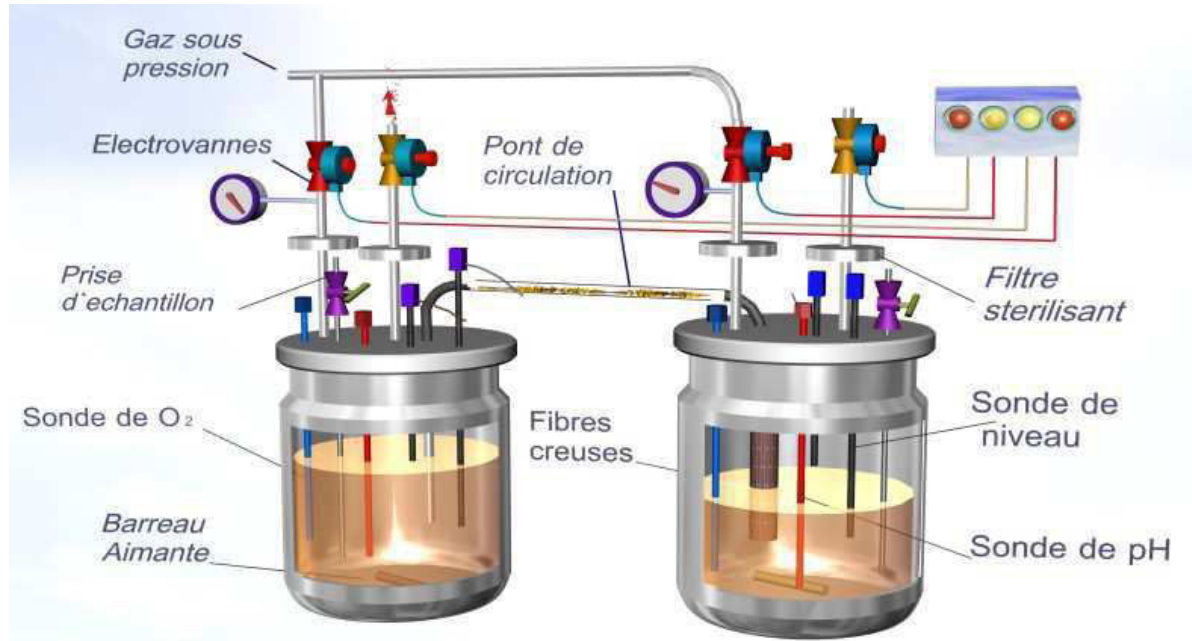


Figure 14 Bioréacteur à membrane.

L'effet du contact est inhérent au couple de levures inoculées dans un milieu de culture donné. Dans certains cas, le contact cellulaire peut accroître la mortalité induite par contact indirect (Kemsawasd *et al.*, 2015b). Dans d'autres cas, on observe aucune différence entre les profils de croissance des levures séparées et mélangées (Taillandier *et al.*, 2014).

## IV. Modélisation des cultures pures de levures

### IV.1. Objectifs

Un modèle est une forme de représentation de la réalité. Cette représentation est limitée par notre degré actuel de connaissance, notamment dans les sciences qui traitent de la vie telle que la biologie. Cette représentation est synthétique, codifiée et souvent partielle. En effet, le modèle ne reflète qu'une partie de la réalité car certains angles du prisme d'analyse sont privilégiés lors de sa conception. Néanmoins, en réduisant la complexité de cette réalité, le modèle permet de mieux l'appréhender.

On modélise toujours en fonction d'un objectif. Plusieurs modèles peuvent décrire une même réalité. C'est pourquoi, il est important de définir le cadre et le niveau de modélisation souhaités dès le début d'un projet. Les objectifs de la modélisation sont synthétisés dans la Figure 15. Les objectifs majeurs de la modélisation sont: la compréhension, le contrôle et l'optimisation. Le choix du modèle est fortement lié à la définition initiale des objectifs et des contraintes.

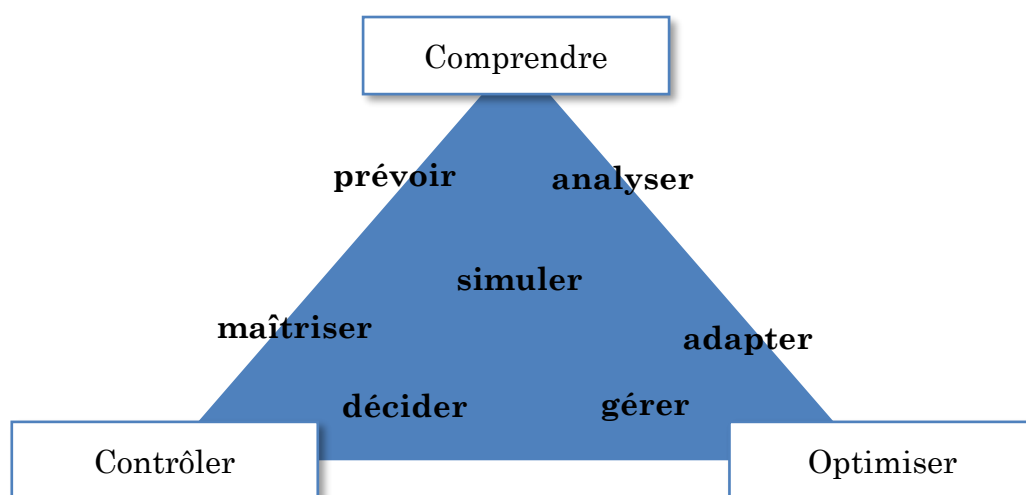


Figure 15 Principaux objectifs de la modélisation (Pommier, 2003).

Le travail de modélisation repose de plus en plus sur une approche pluridisciplinaire. Ce constat a été finement exprimé lors d'un colloque canadien sur la modélisation des systèmes biologiques (Pattey et de Jong, 1998): "Comme la modélisation englobe différents domaines d'expertise, elle offre l'occasion d'entreprendre des études scientifiques interdisciplinaires qui synthétisent nos connaissances dans ces différents domaines de recherche. Plus important encore, elle amène les scientifiques à étudier les limites de leur domaine de connaissance spécifique et les contraignent ainsi à élargir leur champ de compétence."

Il existe deux grands groupes de modèles dans le domaine du génie microbiologique: les modèles non-structurés et les modèles structurés. D'une manière transversale, on peut distinguer les modèles primaires des modèles secondaires. Les modèles secondaires décrivent l'influence des facteurs environnementaux (principalement pH et température) sur les paramètres des modèles primaires. Ils ne sont pas abordés dans ce document.

## IV.2. Modèles non-structurés

Les modèles non-structurés sont basés sur l'observations des cinétiques macroscopiques au sein d'un bioréacteur. Ils introduisent des paramètres qui ne représentent pas des entités chimiques, physiques ou biologiques. Néanmoins, ces paramètres sont généralement significatifs, de sorte que les modèles soient biologiquement compréhensibles. Le caractère prédictif de ces modèles est limité aux conditions opératoires testées.

### IV.2.1. Décomposition de la croissance microbienne en réacteur batch

La croissance d'une population microbienne en milieu non renouvelé se fait selon un schéma classique proposé par Buchanan (1918) (Figure 16).

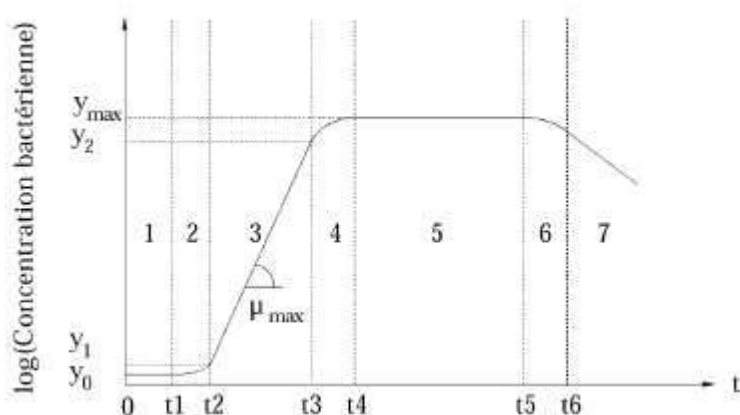


Figure 16 Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu non renouvelé décrites par Buchanan (1918).

Les sept phases distinctes qui apparaissent dans la décomposition sont les suivantes:

1. *La phase de latence.* Elle correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à proprement parler. Il s'agit d'une phase d'adaptation au nouvel environnement.
2. *La phase d'accélération.*
3. *La phase de croissance exponentielle* ou *phase de croissance maximale.* Lorsque les concentrations microbiennes sont exprimées en coordonnées semi-logarithmiques, la pente de la droite correspond au taux de croissance maximal:  $\mu_{max}$ .
4. *La phase de décélération* ou *phase de freinage.* Elle survient au fur et à mesure que les substrats s'épuisent et que les produits toxiques s'accumulent.
5. *La phase stationnaire.* Au cours de cette phase, la population microbienne n'évolue plus.
6. *La phase de début de décroissance.* Elle correspond au début de la disparition des cellules.
7. *La phase de décroissance exponentielle.* Cette phase apparaît lorsque le milieu devient extrêmement défavorable aux micro-organismes et entraîne leur mort rapide.

## IV.2.2. Description de la latence

Il existe plusieurs façons d'introduire la latence dans les modèles. La plus répandue consiste à introduire un décalage temporel en remplaçant la variable de temps  $t$  par  $t - \lambda$ ,  $\lambda$  étant le temps de latence. Le modèle décrit la croissance une fois la latence révolue. Cette formulation rend compte de la latence stricte en occultant la phase d'accélération. Afin de tenir compte de cette dernière, des modèles ont été proposés. Le modèle développé par Wang et Stephanopoulos (1984) traduit une adaptation des cellules dont le taux spécifique de croissance réel,  $\mu^r$ , suit l'évolution suivante:

$$\begin{cases} \frac{d\mu^r}{dt} = a(\mu^E - \mu^r) & \text{si } \mu^E > \mu^r \\ \mu^r = \mu^E & \text{si } \mu^E < \mu^r \end{cases}$$

avec  $\mu^E$  le taux spécifique de croissance dicté par l'environnement et  $a$  un paramètre évaluant la vitesse d'adaptation des micro-organismes à leur environnement.

Le modèle de Baranyi et Roberts (1994) introduit une fonction d'adaptation:

$$\begin{cases} \mu = \mu_{max} \cdot \frac{q(t)}{1 + q(t)} \\ \frac{dq}{dt} = \mu_{max} \cdot q(t) \end{cases}$$

La fonction  $\alpha(t) = \frac{q(t)}{1+q(t)}$  est une fonction croissante à valeur dans  $[0,1]$  qui tend vers 1 quand  $t$  tend vers l'infini. La fonction  $q(t)$  exprime l'état physiologique de la cellule. La valeur de  $q(0)$  détermine la durée de la phase de latence, en fonction de l'état physiologique de l'inoculum.

## IV.2.3. Description de la croissance des micro-organismes

### IV.2.3.1. Modèle exponentiel

La première théorie sur la croissance de populations remonte au XVIIIème siècle avec l'essai de Malthus intitulé « An essay on the principle of population » (Malthus, 1798). Sa théorie suggérait une représentation de la population ( $X$ ) sous la forme:

$$\frac{dX}{dt} = \beta X \quad (\text{Equation 1})$$

Le paramètre  $\beta$  est le taux spécifique de croissance Malthusien. Ce modèle reproduit un accroissement exponentiel de population, mais il ne permet pas de représenter l'évolution d'une population qui tend vers un nombre fini.

### IV.2.3.2. Modèle logistique

Afin de modéliser la croissance d'une population animale qui se stabilise au cours du temps, Verhulst (1838) propose une équation différentielle plus connue sous le nom de loi logistique:

$$\frac{dy}{dt} = a \cdot y \left(1 - \frac{y}{K}\right) \quad (\text{Equation 2})$$

Par la suite, cette expression a été confrontée à divers résultats expérimentaux (Pearl, 1927). Dans le cas de la description d'une cinétique de croissance microbienne, elle prend souvent la forme suivante, dans laquelle  $X$  représente la population microbienne et  $\mu$  son taux de croissance:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (\text{Equation 3})$$

Le taux de croissance maximal  $\mu_{max}$  est supposé atteint dès le début de la culture. La population maximale  $X_{max}$  est obtenue en fin de croissance, lors de la phase stationnaire.

#### IV.2.3.3. *Modèle de Monod*

Le modèle de Monod (1941) est la référence de base en matière de modélisation de croissance microbienne. Il donne une relation entre le taux spécifique de croissance  $\mu$  et la concentration en substrat limitant  $S$ .

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \quad (\text{Equation 4})$$

Le paramètre  $\mu_{max}$  est le taux spécifique de croissance maximal. La constante de saturation  $K_S$  représente la concentration en substrat pour laquelle  $\mu$  est égal à la moitié de  $\mu_{max}$ . On distingue trois cas en fonction de la concentration en substrat et de la valeur de la constante de saturation  $K_S$ :

- Pour de faibles valeurs de  $K_S$  ( $K_S \ll S$ ), le taux de croissance est proche de sa valeur maximale ( $\mu \approx \mu_{max}$ ). La perte de vitesse de croissance est très brutale et n'intervient que lors de l'épuisement complet du substrat. Avant l'épuisement du substrat, l'équation de Monod est équivalente à une cinétique d'ordre zéro.
- Pour des valeurs élevées de  $K_S$  ( $K_S \gg S$ ), on se rapproche d'une loi de type logistique, avec un point d'inflexion au centre de symétrie de la courbe. L'équation correspond à une cinétique du premier ordre.
- Lorsque la valeur de  $K_S$  est proche de la concentration en substrat dans le milieu ( $K_S \approx S$ ), l'équation de Monod décrit une cinétique réactionnelle d'ordre complexe.

#### IV.2.4. **Prise en compte du ralentissement de la croissance**

Il existe de nombreux modèles non structurés. Ces modèles sont, en grande majorité, des adaptations des trois modèles historiques: le modèle exponentiel, le modèle de Monod et le modèle logistique. Les modèles de base précédemment cités sont constamment adaptés afin d'améliorer l'ajustement aux données expérimentales. Des aménagements de la loi logistique permettent de mieux prendre en compte la phase de ralentissement. L'introduction de variables d'état, telles que les concentrations en sucre et en éthanol,

susceptibles d'affecter la croissance est souvent envisagée lors de la modélisation. Trois phénomènes sont pris en compte: une limitation par le substrat, une inhibition par le substrat et une inhibition par les produits métaboliques. Certains modèles s'appuient sur une limitation par le substrat. D'autres modèles tiennent compte d'une limitation et d'une inhibition par le substrat. Il existe des modèles basés sur une action inhibitrice d'un ou plusieurs métabolites. Enfin certains modèles tiennent compte de multiples inhibitions et limitations. L'intervention d'un substrat ou d'un produit dans l'équation de la description de la croissance de la biomasse nécessite l'expression de la dynamique propre de ces constituants. L'ensemble des modèles répertoriés (Annexes 1 et 2) aux cours de ce travail bibliographique s'appuie sur les synthèses de Ramon-Portugal (1995), de Marín (1999) et de Loustaunau, (2015).

#### IV.2.5. Description de la consommation de substrat

La vitesse de consommation du substrat dépend des trois activités principales de la cellule: la croissance, la production de métabolites et la formation de réserves énergétiques. Il en résulte l'équation bilan (Equation 5).

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} + mX \quad (\text{Equation 5})$$

Les variables  $Y_{X/S}$  et  $Y_{P/S}$  représentent respectivement les rendements en biomasse et en produit par rapport au substrat,  $m$  est la constante de maintenance.

#### IV.2.6. Description de la production des métabolites

La cinétique de production de métabolites au cours de la croissance est liée au taux de croissance de la biomasse et à la quantité de biomasse présente à l'instant  $t$ . En général, la production de métabolites est représentée par le modèle de Luedeking-Piret (1959) présenté par l'équation suivante:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (\text{Equation 6})$$

En posant, la vitesse spécifique de production du métabolite:  $v_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$

et le taux spécifique de croissance:  $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$

on obtient la relation suivante:

$$v_p = \alpha \mu + \beta \quad (\text{Equation 7})$$

Cette expression traduit le couplage partiel entre la production de métabolites et la croissance. Dans le cas où  $\beta$  est nul, le couplage est total et les métabolites sont produits au fur et à mesure de la croissance. Lorsque  $\alpha$  est nul, la production est découplée de la croissance, c'est le cas de nombreux métabolites secondaires. Certains modèles utilisés pour décrire la production de métabolites sont inspirés du modèle de Luedeking-Piret, d'autres ne le sont pas (Annexe 2).

#### **IV.2.7. Description du déclin**

Lorsqu'une population microbienne est soumise à un environnement hostile, il arrive qu'elle décline. Les formulations mathématiques permettant de prendre en compte le déclin sont semblables à celles traduisant la croissance, mais prennent un signe opposé comme dans l'exemple suivant:

$$\frac{dX}{dt} = -\mu_d X$$

Dans la majorité des modèles proposant une expression du déclin, les cellules biologiquement actives sont différenciées des cellules mortes.

### IV.3. Modèles structurés

Au cours de l'élaboration des modèles structurés, la biomasse n'est pas considérée comme homogène et n'est par conséquent pas représentée par une variable unique. Il existe deux types de structures: la structure en classe et la structure intracellulaire. La structure en classe différencie les individus d'une population. La structure intracellulaire décompose chaque individu d'une population en entités complexes. Les principaux types de modèles structurés sont présentés de façon non exhaustive et illustrés par quelques exemples dans les paragraphes suivants.

#### IV.3.1. Structures en classe

Les modèles présentant une structure de classe rangent les individus d'une population en différents groupes appelés classes. Chaque classe rassemble des individus ayant des caractéristiques communes et dont l'évolution a une dynamique propre à la classe considérée. Ces modèles sont constitués d'une part de réactions propres à chaque classes et d'autre part de réactions de transfert de classe traduisant le passage d'individus d'une classe à une autre.

Distinguer les cellules viables des cellules mortes ou différencier des souches qui cohabitent dans le cas de cultures mixtes ne constituent pas de véritables structurations de la biomasse. En effet, de telles décompositions ne sont pas introduites dans l'optique d'estimer la population globale, mais bien d'estimer chacune des composantes comme étant des variables d'état à part entière.

##### IV.3.1.1. Exemple: Ségrégation selon le cycle cellulaire (Deckwer et al., 1991)

Le modèle développé par Deckwer *et al.*, est basé sur le cycle de bourgeonnement des levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* décrit par Hartwell et Unger (Figure 17).

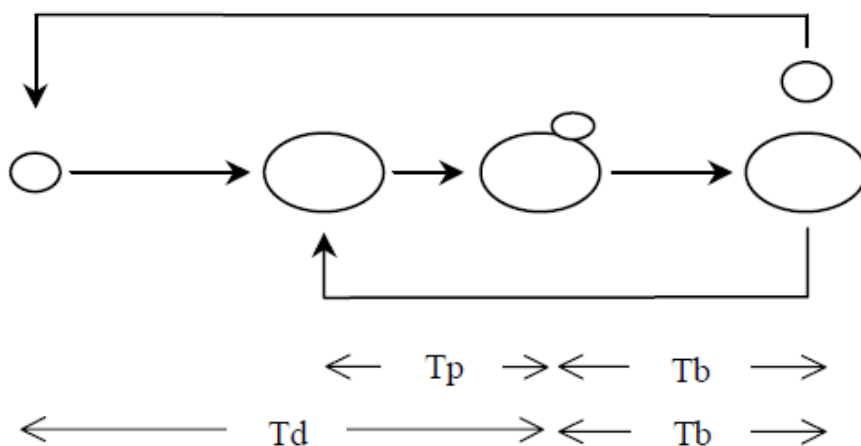


Figure 17 Schéma du cycle de bourgeonnement chez *Saccharomyces cerevisiae* (Hartwell et Unger, 1977).

Le cycle se compose de trois phases: une phase **D** de développement des cellules filles non bourgeonnantes qui a une durée  $T_d$ , une phase **P** de développement de cellules mères non bourgeonnantes de durée  $T_p$  et une phase de bourgeonnement **B** qui a une durée  $T_b$ . La



durée de chacune de ces phases peut être reliée au temps de doublement de la population  $T$  par une relation linéaire (Lord et Wheals, 1980; Takamatsu *et al.*, 1985; Wheals, 1981).

On obtient les relations suivantes:

$$Td = \alpha_d T + \beta_d \quad ; \quad Tp = \alpha_p T + \beta_p \quad ; \quad Tb = \alpha_b T + \beta_b$$

Les auteurs proposent de diviser chaque phase en un nombre fini d'intervalles de temps suffisamment petit  $\Delta\tau$ . Le nombre d'intervalles dans chaque phase est alors respectivement:

$$nd = \frac{Td}{\Delta\tau} \quad ; \quad np = \frac{Tp}{\Delta\tau} \quad ; \quad nb = \frac{Tb}{\Delta\tau}$$

La biomasse est par conséquent structurée en  $nd + np + nb$  classes. Les quantités de cellules dans le  $i^{\text{ème}}$  intervalle des phases **D**, **P** et **B** sont notés respectivement  $d(i)$ ,  $p(i)$  et  $b(i)$ . La quantité totale de cellules  $N_T$  vérifie alors:

$$N_T = \sum_{i=1}^{nd} d(i) + \sum_{j=1}^{np} p(j) + \sum_{k=1}^{nb} b(k)$$

Les proportions relatives des cellules appartenant à chacune des trois phases sont:

$$Fd = \frac{1}{N_T} * \sum_{i=1}^{nd} d(i) \quad ; \quad Fp = \frac{1}{N_T} * \sum_{j=1}^{np} p(j) \quad ; \quad Fb = \frac{1}{N_T} * \sum_{k=1}^{nb} b(k)$$

L'évolution de la quantité de cellules de chaque classe se fait par passage d'une classe à l'autre à chaque intervalle de temps de la manière suivante:

$$d(i+1) \leftarrow d(i) \quad i = 1, 2, \dots, nd - 1$$

$$p(j+1) \leftarrow d(j) \quad j = 1, 2, \dots, np - 1$$

$$b(k+1) \leftarrow d(k) \quad k = 1, 2, \dots, nb - 1$$

$$d(1) \leftarrow b(nb)$$

$$p(1) \leftarrow b(nb)$$

$$b(1) \leftarrow d(nd) + p(np)$$

Une telle modélisation trouve ses principales applications dans les cultures continues ou semi-continues. En effet, elle permet de relier les proportions  $Fd$ ,  $Fp$  et  $Fb$  de cellules dans les phases respectives **D**, **P** et **B** au taux de croissance spécifique  $\mu = \frac{\ln(2)}{T}$ . Il est possible de faire varier  $\mu$  en jouant sur les débits d'alimentation en substrat et donc de maîtriser la "qualité" de la biomasse produite. Généralement, on recherche une augmentation de l'activité fermentaire qui est inversement proportionnelle à la fraction  $Fb$ . Cette stratégie revient à privilégier l'utilisation du substrat pour la production de métabolites plutôt que pour la multiplication cellulaire. Les cinétiques de consommation de substrats et de production de métabolites sont inhérentes à chaque classe et diffèrent selon les milieux de culture considérés (Ejiofor *et al.*, 1996b; Wang *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 1993).

### IV.3.2. Structures cellulaires

Ces modèles reposent sur une identification des voies métaboliques principales et sur la recherche des flux limitants. La cellule est alors décomposée en différents compartiments métaboliques dont la synergie conduit à la croissance et la production de métabolites. Les vitesses de croissance et de conversion sont alors déterminées par les vitesses de chacune des réactions biochimiques considérées et par les vitesses de transferts entre les différents compartiments.

Etant basés sur des connaissances théoriques des micro-organismes et sur des décompositions fines de chaînes réactionnelles, ces modèles sont intellectuellement plus satisfaisants que les modèles empiriques. Cependant, le volume d'informations requis rend leur intégration numérique très laborieuse, mais surtout leurs paramètres sont difficilement identifiables voir inaccessibles expérimentalement.

#### IV.3.2.1. Exemple: Modèle compartimentation intracellulaire artificielle de Williams (1967)

Le modèle de Williams est un modèle simple qui décompose la biomasse  $X$  en deux compartiments distincts K et G. K est une sous-unité de synthèse des macromolécules cellulaires et G une sous-unité structurale contenant les macromolécules nécessaires au fonctionnement de la cellule.

On note:

- $\rho_K$ : la masse du compartiment K par unité de volume de cellules ( $g/ml_c$ )
- $\rho_G$ : la masse du compartiment G par unité de volume de cellules ( $g/ml_c$ )
- $\rho = \rho_K + \rho_G$ : la masse volumique des cellules, supposée constante ( $g/ml_c$ )
- $X$ : la concentration en biomasse en grammes par unité de volume du réacteur ( $g/ml_r$ )
- $Y$ : le rendement de formation du compartiment K à partir de substrat (g/g)
- $S$ : la concentration en substrat en grammes par unité de volume du réacteur ( $g/ml_r$ )

La croissance cellulaire est décomposée en deux étapes réactionnelles (Figure 18).

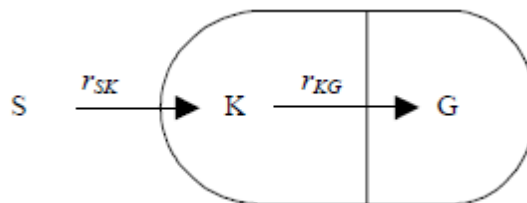


Figure 18 Principe du modèle de Williams.

Le modèle de Williams repose sur trois hypothèses:

- 1) La vitesse de formation du compartiment K est d'ordre 1 par rapport au substrat, avec un rendement Y constant. On en déduit donc:

$$r_{sk} = k_1 * S$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_{sk} * \frac{1}{Y} * \frac{X}{\rho} = -k_1 * S * \frac{1}{Y} * \frac{X}{\rho}$$

- 2) Le taux de croissance du compartiment G est proportionnel à la masse du compartiment K, d'où:

$$\frac{1}{\rho_G} r_{KG} = k_2 * \rho_K$$

- 3) Lorsque la masse du comportement G double, la cellule se divise en deux cellules. On peut donc déterminer le nombre de cellules par unité de volume de réacteur, qui est proportionnel à la masse totale des compartiments G, et par conséquent proportionnel à  $\frac{\rho_G}{\rho} X$ .

En considérant que le réacteur évolue en continu, avec un taux de dilution D, on peut décrire l'évolution dynamique de la masse de chaque compartiment:

$$\frac{d\rho_K}{dt} = k_1 S - k_2 \rho_K \rho_G - D \rho_K$$

$$\frac{d\rho_G}{dt} = k_2 \rho_K \rho_G - D \rho_G$$

Les modèles qui s'inspirent du modèle de Williams permettent de rendre compte de deux phénomènes souvent décrits: l'existence d'une phase de latence durant laquelle les cellules grossissent mais ne se divisent pas et l'observation de cellules de petite taille en phase stationnaire.

## V. Modélisation des cultures mixtes de levures

Les systèmes utilisant de multiples micro-organismes sont très utilisés notamment dans le domaine agroalimentaire, le traitement des eaux et la chimie fine. Cependant, contrairement aux cultures pures, les cultures mixtes de micro-organismes font rarement l'objet de modélisation. Néanmoins, la nécessité d'une amélioration de la maîtrise des procédés en cultures mixtes a entraîné le développement de modèles mathématiques. Ces derniers prennent en compte la diversité des micro-organismes impliqués et leurs interactions. Nous présentons dans ce paragraphe quelques exemples de modèles de culture mixtes. Ces modèles sont généralement limités à des systèmes binaires qui ne font pas la distinction entre les interactions directes et indirectes.

### V.1. Modèles dérivés du modèle de Lotka et Voltera

#### V.1.1. Modèle de Lotka et Voltera

Lotka et Voltera (1920) ont proposé le premier modèle de croissance décrivant une interaction entre deux populations. Il est basé sur l'hypothèse que la croissance de chaque population dépend linéairement des effectifs des deux populations  $N_1$  et  $N_2$ . Il s'agit d'un couplage de deux modèles logistiques, qui est traduit formellement par les relations suivantes:

$$\begin{cases} \frac{dN_1}{dt} = N_1(a_1 - b_1N_1 + c_1N_2) \\ \frac{dN_2}{dt} = N_2(a_2 - b_2N_2 + c_2N_1) \end{cases}$$

Le signe de  $c_1$  et  $c_2$ , déterminent la nature de la relation entre les levures:

- lorsque  $c_1$  et  $c_2$  sont positifs: les levures favorisent réciproquement leur croissance
- lorsque le produit  $c_1 \cdot c_2$  est négatif: une levure inhibe la croissance de l'autre
- lorsque  $c_1$  et  $c_2$  sont négatifs: les levures inhibent réciproquement leur croissance.

#### V.1.2. Modèle de Vereecken

Vereecken a proposé pour sa part un modèle inspiré à la fois de Baranyi pour traduire la latence de chaque micro-organisme et de Lotka et Voltera pour traduire l'interaction au cours de la croissance en culture mixte (Vereecken *et al.*, 2000). L'évolution des populations  $N_1$  et  $N_2$  suit dans ce cas la dynamique suivante, pour laquelle  $q_1$  et  $q_2$  représentent l'état physiologique des souches 1 et 2 respectivement :

$$\begin{cases} \frac{dN_1}{dt} = \frac{q_1}{1+q_1} \frac{r_1 N_1}{K_1} (K_1 - N_1 - \alpha_{1,2}N_2) \\ \frac{dN_2}{dt} = \frac{q_2}{1+q_2} \frac{r_2 N_2}{K_2} (K_2 - N_2 - \alpha_{2,1}N_1) \\ \frac{dq_1}{dt} = r_1 q_1 \\ \frac{dq_2}{dt} = r_2 q_2 \end{cases}$$

## V.2. Modèle décrivant des mécanismes d'interactions

Les modèles de type Lotka et Voltera considèrent les interactions entre micro-organismes d'une manière globale, en faisant apparaître la population qui cohabite dans l'expression de la dynamique d'évolution de chaque population. D'autres modèles entrent plus dans les détails des mécanismes en jeu et introduisent les variables associées aux composés intervenant dans ces mécanismes. Ces mécanismes reflètent généralement une limitation des substrats qui peut être accompagnée d'une inhibition de la croissance d'un micro-organisme. Une sélection d'exemples jugés significatifs fait l'objet de cette dernière partie de notre étude bibliographique. Cette sélection couvre de façon non exhaustive les représentations mathématiques des différents mécanismes d'interactions présentés précédemment.

### V.2.1. Modèle de prédation de Tsuchiya *et al.*, (1972)

Tsuchiya *et al.*, ont développé un modèle pour décrire la culture mixte de *Dictyostelium discoideum* et *Escherichia coli* en milieu continu. Il s'agit d'un modèle de prédation dans lequel *E. coli* ( $X_1$ ) utilise le glucose ( $S$ ) comme substrat alors que le protozoaire *D. discoideum* ( $X_2$ ) consomme *E. coli*. La dynamique du système est la suivante:

$$\begin{cases} \frac{dX_1}{dt} = -DX_1 + \mu_1 X_1 - \frac{1}{Y_{X_2/X_1}} X_1 X_2 \mu_2 \\ \frac{dX_2}{dt} = -DX_2 + \mu_2 X_2 \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_{X_1/S}} \mu_1 X_1 \end{cases} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \mu_1 = \mu_{1max} \frac{S}{K_S + S} \\ \mu_2 = \mu_{2max} \frac{X_1}{K_{X_1} + X_1} \end{cases}$$

L'expression des taux de croissance est issue du modèle de Monod.  $D$  et  $S_0$  représentent le taux de dilution et la concentration de glucose dans l'alimentation.

### V.2.2. Modèle de compétition de Lenas et Pavlou (1994)

Lenas et Pavlou ont proposé un modèle générique de compétition de deux micro-organismes  $X_1$  et  $X_2$  pour un substrat limitant  $S$ . L'expression des taux de croissance est issue du modèle d'Andrews (1968). La dynamique du système est la suivante:

$$\begin{cases} \frac{dX_1}{dt} = -DX_1 + \mu_1 X_1 \\ \frac{dX_2}{dt} = -DX_2 + \mu_2 X_2 \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_{X_1/S}} \mu_1 X_1 - \frac{1}{Y_{X_2/S}} \mu_2 X_2 \end{cases} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \mu_1 = \mu_{1max} \frac{1}{K_{S_1} + S + \frac{S^2}{K_{I_1}}} \\ \mu_2 = \mu_{2max} \frac{1}{K_{S_2} + S + \frac{S^2}{K_{I_2}}} \end{cases}$$

### V.2.3. Modèle de mutualisme de Tohyama *et al.*, (2002)

Ce modèle a été développé pour décrire une production industrielle de poly-β-hydroxybutyrate (PHB) par l'intermédiaire d'une culture bactérienne mixte impliquant une souche de *Lactobacillus delbrueckii* et une souche de *Ralstonia eutropha*. Dans le procédé considéré, *L. delbrueckii* ( $X_1$ ) produit du lactate ( $L$ ) à partir de glucose, *R. eutropha* ( $X_2$ ) consomme de l'ammoniaque ( $N$ ) et convertit le lactate en PHB ( $P$ ). La dynamique du système en fermentation continue alimentée par un courant de glucose ( $G$ ) est la suivante:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX_1}{dt} = -DX_1 + \mu_1 X_1 \\ \frac{dX_2}{dt} = -DX_2 + \mu_2 X_2 \\ \frac{dG}{dt} = D(G_0 - G) - \nu_1 X_1 \\ \frac{dN}{dt} = -DN + \nu_3 X_2 \\ \frac{dL}{dt} = -DL + \sigma_1 X_1 - \nu_2 X_2 \\ \frac{dP}{dt} = -DP + \sigma_2 X_2 \end{array} \right. \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} \mu_1 = \mu_{1max} \frac{G}{K_G + G} \left(1 - \frac{L}{L_m}\right)^n \\ \mu_2 = \mu_{2max} \frac{L}{K_L + L + \frac{L^2}{K_i}} \frac{N}{K_N + N} \\ \nu_1 = \frac{\mu_1}{Y_{X_1/G}} + \frac{\sigma_1}{Y_{L/G}} \\ \nu_2 = \frac{\mu_2}{Y_{X_2/L}} \\ \nu_3 = \frac{\mu_2}{Y_{X_2/N}} \\ \sigma_1 = \alpha \mu_1 + \beta_m \frac{G}{K_G + G} \\ \sigma_2 = q_m \frac{k_N}{k_N + N} \end{array}$$

$\nu_1$ ,  $\nu_2$  et  $\nu_3$  correspondent respectivement aux vitesses spécifiques de consommation de glucose, de lactate et d'ammoniaque.  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$  sont respectivement les vitesses spécifiques de production de lactate et de PHB.

Plusieurs phénomènes sont pris en compte par ce modèle. Tout d'abord la croissance du lactobacille est supposée limitée par le glucose et inhibée par la formation d'acide lactique. La croissance de *R. eutropha* présente pour sa part une double dépendance au lactate et à l'ammoniaque. Elle est limitée pour de faibles concentrations en lactate mais inhibée si ce substrat est présent en trop grande quantité. Enfin, on peut noter que l'orientation du métabolisme de *R. eutropha* dépend de la quantité d'ammoniaque disponible: pour de fortes concentrations, la croissance est favorisée ( $\mu_2$  augmente et  $\sigma_2$  diminue) alors que pour de faibles concentrations, la production de PHB est favorisée ( $\sigma_2$  augmente et  $\mu_2$  diminue). Ce dernier phénomène fait de l'ammoniaque un paramètre clé pour l'optimisation de la productivité du procédé, qui consiste à trouver un bon équilibre entre quantité de biomasse productrice et taux de conversion.

#### V.2.4. Modèle de limitation de Hanly *et al.*, (2012)

Ce modèle a été développé pour décrire la production d'éthanol lors de la culture mixte de *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli*. Dans le procédé considéré, *S. cerevisiae* ( $X_1$ ) consomme exclusivement du glucose ( $G$ ) et *E. coli* ( $X_2$ ) consomme exclusivement du xylose ( $Z$ ). Les deux micro-organismes produisent de l'éthanol ( $E$ ), ce dernier limitant l'absorption des sucres. La dynamique du système en réacteur fermé est la suivante:

$$\begin{cases} \frac{dX_1}{dt} = \mu_1 X_1 \\ \frac{dX_2}{dt} = \mu_2 X_2 \\ \frac{dG}{dt} = -v_g X_1 \\ \frac{dZ}{dt} = -v_z X_2 \\ \frac{dE}{dt} = v_{e_1} X_1 + v_{e_2} X_2 \end{cases} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} v_g = v_{g,max} \frac{G}{K_G + G} \frac{1}{1 + \frac{E}{K_{iX_1}}} \\ v_z = v_{z,max} \frac{Z}{K_Z + Z} \frac{1}{1 + \frac{E}{K_{iX_2}}} \end{cases}$$

Les taux de croissance ( $\mu_1$  et  $\mu_2$ ) et les vitesses spécifiques de production d'éthanol ( $v_{e_1}$  et  $v_{e_2}$ ) sont obtenus par le biais de modèles métaboliques compartimentés à l'échelle du génome. Les deux espèces ne sont pas en compétition pour un substrat, cependant la production commune d'éthanol limite leur capacité à absorber les sucres. *S. cerevisiae* consomme le glucose plus vite que *E. coli* ne consomme le xylose. Comparativement, l'absorption de sucre de *E. coli* est plus sensible à la présence d'éthanol. L'enjeu de la modélisation est de déterminer la concentration initiale de chaque micro-organisme permettant d'avoir le temps de fermentation le plus court.

### V.2.5. Modèle d'amensalisme de Pommier (2003)

Ce modèle, inspiré des travaux de Ramon-Portugal (1995) et de Ravaz (1992), a été développé pour décrire l'évolution des populations de levures au cours de l'effet killer entre deux souches de *S. cerevisiae*. L'évolution du milieu fermentaire contenant une souche killer et une souche sensible est caractérisée par 8 variables d'état (Tableau 2) évoluant en fonction de 15 paramètres (Tableau 3), selon le système différentiel suivant:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX_{v,k}}{dt} = r_{v,k} - r_{d,k} \\ \frac{dX_{v,s}}{dt} = r_{v,s} - r_{d,s} \\ \frac{dX_{d,k}}{dt} = r_{d,k} \\ \frac{dX_{d,s}}{dt} = \begin{cases} r_{d,s} & \text{si } T_s < T_s^* \\ r'_{d,s} & \text{si } T_s \geq T_s^* \end{cases} \\ \frac{dT_p}{dt} = r_{T_p} \\ \frac{dT_s}{dt} = r_{T_s} \\ \frac{dT_k}{dt} = r_{T_k} \\ \frac{dpH}{dt} = r_{pH} \end{array} \right. \quad \text{avec} \quad \left\{ \begin{array}{l} r_{v,k} = \mu_{max,k} \cdot X_{v,k} \left( 1 - \frac{X_{v,k} + X_{d,k}}{X_{max,k}} \right) [1 - A_{s \rightarrow k}(X_{v,s} + X_{d,s})] \\ r_{v,s} = \mu_{max,s} \cdot X_{v,s} \left( 1 - \frac{X_{v,s} + X_{d,s}}{X_{max,s}} \right) [1 - A_{k \rightarrow s}(X_{v,k} + X_{d,k})] \\ r_{d,k} = \mu_{d,k} \cdot X_{v,k} \\ r_{d,s} = \mu_{d,s} \cdot X_{v,s} \\ r'_{d,s} = \mu_{d,s} \cdot X_{v,s} + K_0 \cdot E_T \cdot X_{v,s} \cdot [T_s - T_s^*] \\ r_{T_p} = \alpha \cdot r_{v,k} \\ r_{T_s} = \beta_s \cdot (T_p - T_s - T_k) \cdot [N_s(X_{v,s} + X_{d,s}) - T_s] \\ r_{T_k} = \beta_k \cdot (T_p - T_s - T_k) \cdot [N_k(X_{v,k} + X_{d,k}) - T_k] \\ r_{pH} = [2 \cdot (5,25 \cdot 10^{-5} X_{tot}) - 2,16 \cdot 10^{-2}] \frac{dX_{tot}}{dt} \\ E_T = -0,36 pH^2 + 3,14 pH - 5,85 \\ X_{tot} = X_{v,k} + X_{d,k} + X_{v,s} + X_{d,s} \\ T_s^* = N_s^*(X_{v,s} + X_{d,s}) \end{array} \right.$$

Les deux levures limitent réciproquement leur croissance représentée par un modèle logistique. Les taux spécifiques de mortalité naturelle ( $\mu_{d,k}$ ,  $\mu_{d,s}$ ) permettent de rendre compte de la mortalité qui n'est pas due à l'interaction de type killer. La souche killer produit des toxines ( $T_p$ ) proportionnellement à sa croissance. Ces toxines se fixent de façon irréversible sur des récepteurs situés sur la paroi des cellules killer et sensibles. Les récepteurs de chaque souche ont une affinité ( $\beta_k$  et  $\beta_s$ ) différente avec la toxine. La liaison des toxines aux récepteurs des cellules killer n'induit pas de mortalité mais réduit la disponibilité des toxines. La liaison des toxines aux récepteurs des cellules sensibles induit la mortalité de celles-ci lorsque le nombre de récepteur liés à la paroi devient supérieur à un seuil ( $N_s^*$ ). L'efficacité ( $E_T$ ) de ces toxines dépend du pH.



Tableau 2 Variables du modèle de Pommier

Variable	Signification
$X_{v,k}$	Population vivante de la souche killer
$X_{v,s}$	Population vivante de la souche sensible
$X_{d,k}$	Population morte de la souche killer
$X_{d,s}$	Population morte de la souche sensible
$T_p$	Toxine killer libre
$T_k$	Toxine killer liées à la paroi des levures killer
$T_s$	Toxine killer à la paroi des levures sensible
$pH$	pH

Tableau 3 Paramètre du modèle basé sur le nombre de sites récepteurs

Paramètre	Signification
$\mu_{max,k}$	Taux spécifique de croissance maximal de la souche killer
$\mu_{max,s}$	Taux spécifique de croissance maximal de la souche sensible
$\mu_{d,k}$	Taux spécifique de mortalité naturelle de la souche killer
$\mu_{d,s}$	Taux spécifique de mortalité naturelle de la souche sensible
$X_{max,k}$	Population maximale totale en levures killer
$\mu_{max,s}$	Population maximale totale en levures sensibles
$A_{k \rightarrow s}$	Paramètre de freinage de la croissance de la souche sensible sous l'influence de la souche killer
$A_{s \rightarrow k}$	Paramètre de freinage de la croissance de la souche killer sous l'influence de la souche sensible
$\alpha$	Constante de couplage entre production de toxine et croissance de la souche killer
$K_0$	Constante cinétique de mortalité des cellules sensibles sous l'effet de la protéine killer, à pH optimal.
$\beta_s$	Constante cinétique de fixation de la toxine sur les cellules sensibles
$\beta_k$	Constante cinétique de fixation de la toxine sur les cellules killer
$N_k$	Nombre de sites récepteurs de toxine par cellule killer
$N_s$	Nombre de sites récepteurs de toxine par cellule sensible
$N_s^*$	Nombre de sites récepteurs par cellule sensible qui doivent être occupés par la toxine pour induire leur mort

## VI. Conclusion

---

En œnologie, *S. cerevisiae* et dans une moindre mesure *T. delbrueckii* sont utilisées pour réaliser la fermentation alcoolique. Ces deux levures ont des besoins nutritifs différents notamment en azote assimilable et en lipides. L'impact des lipides et de l'azote assimilable sur les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* a fait l'objet de nombreuses publications. Ces nutriments influent non seulement sur la vitesse de croissance mais aussi sur les capacités fermentaires des levures. Il est donc important d'en tenir compte lors de l'élaboration d'un modèle mathématique de culture pure.

Les cultures mixtes de micro-organismes sont au cœur de nombreux procédés fermentaires. Mais vu la complexité des phénomènes, les avancées concernant la compréhension et la maîtrise des interactions qui entrent en jeu dans de tels systèmes sont assez récentes et restent limitées.

Les effets de l'azote assimilable notamment ont été peu étudiés en culture mixte. De faibles concentrations initiales en azote assimilable induisent une limitation nutritionnelle. En ce qui concerne les lipides, nous n'avons pas trouvé de travaux mentionnant leur influence sur les cultures mixtes de levures. Le rôle des lipides au cours de culture mixte constitue donc un point critique qui doit être étudié afin de modéliser les cultures mixtes de levures.

Différents types d'interactions peuvent avoir lieu lors des cultures mixtes impliquant des levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*. Ces interactions sont inhérentes à chaque souche et dépendent des paramètres opératoires du procédé fermentaire. Le développement d'outils d'étude d'interactions microbiennes, tels que le bioréacteur à membrane, permet d'une part de différencier l'influence des interactions directes et indirectes et d'autre part d'acquérir des données expérimentales nécessaires à la modélisation des couples de levures. Dans la revue bibliographique effectuée, la distinction entre les interactions directes et indirectes n'a jamais été prise en compte dans les modèles.

# MATERIEL ET METHODES

---

"Le microbe n'a pas le temps d'examiner le biologiste"

*Henri Michaux*

## I. Fermentation

### I.1. Micro-organismes

#### I.1.1. Souches

Deux souches de levures œnologiques ont été utilisées au cours de ce travail. Il s'agit de *Torulaspora delbrueckii* Zymaflore alpha et de *Saccharomyces cerevisiae* QA23 commercialisées respectivement par les sociétés Laffort (Bordeaux, France) et Lallemand (Blagnac, France).

#### I.1.2. Conservation des souches

Les souches étaient fournies sous forme de levures sèches actives. Environ 10 mg de chaque souche ont été réhydratés séparément dans de l'eau salée (NaCl 0,9% m/v) pendant 30 minutes. Ensuite chaque levure a été étalée sur une pente (YPD-agar) et conservée à 4°C.

### I.2. Milieux

#### I.2.1. Milieux de pré-cultures

Les compositions des milieux YPD et YPD-agar, utilisés pour la pré-culture et la conservation des souches, sont détaillées dans le tableau suivant.

Tableau 4 Composition des milieux de pré-cultures

	YPD	YPD-agar
<b>Extrait de levure (g/L)</b>	10	10
<b>Peptone de soja (g/L)</b>	10	10
<b>Glucose (g/L)</b>	20	20
<b>Agar (g/L)</b>	0	20

#### I.2.2. Milieux de culture

Trois milieux de culture MS170, MS300 et MS300M ont été utilisés durant les fermentations. Le MS300 défini par Salmon et Barre (1998) est un milieu de référence communément utilisé pour représenter la composition des moûts de raisin (Bely *et al.*, 1990; Berthels *et al.*, 2004; Jiménez-Martí *et al.*, 2007; Brandam *et al.*, 2013; Taillandier *et al.*, 2014). Les milieux MS300 et MS300M ont une concentration d'azote assimilable de 429 mg N/L (309 mg N/L mg provenant des acides aminés et 120 mg N/L provenant du chlorure d'ammonium). Le MS170 contient 243 mg N/L (175 mg N/L mg provenant des acides aminés et 68 mg N/L provenant du chlorure d'ammonium). Le MS300M contient 2 fois plus de facteurs anaérobies que les milieux MS170 et MS300. Ces trois milieux sont constitués de sucres, de minéraux, d'acides organiques (Tableau 5), d'oligoéléments (Tableau 6), de vitamines (Tableau 7), d'acides aminés, de chlorure d'ammonium (Tableau 8) et de facteurs anaérobies (Tableau 9). Pour éviter la réaction de Maillard au cours de la stérilisation, chaque milieu est séparé en 2 fractions. La première fraction est composée des sucres, des minéraux et d'acides organiques. La deuxième fraction est composée des oligoéléments, d'acides aminés, de chlorure d'ammonium et de facteurs anaérobies. Avant la stérilisation,

la première et la seconde fraction sont mis à pH 3,3 respectivement à l'aide de soude (10 mol/L) et d'acide sulfurique (10 mol/L). La stérilisation se fait par autoclavage (15 minutes à 121 °C). Les vitamines sont ajoutées après la stérilisation.

Tableau 5 Composition en sucres, minéraux et acides organiques des milieux de culture MS170, MS300 et MS300M

Eléments	Concentration (g/L)
Glucose	110
Fructose	110
Acide L-malique	6
Acide citrique	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,25
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,155
NaCl	0,2

Tableau 6 Composition en oligoéléments des milieux de culture MS170, MS300 et MS300M

Eléments	Concentration (mg/L)
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	4
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	4
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	1
KI	1
CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,4
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	1

Tableau 7 Composition en vitamines des milieux de culture MS170, MS300 et MS300M

Eléments	Concentration (mg/L)
Myo-Inositol	20
Pantothénate de calcium	1,5
Thiamine hydrochloryde	0,25
Acide nicotinique	2
Pyridoxine	0,25
Biotine	0,003

Tableau 8 Composition en éléments azotés des milieux de culture MS170, MS300 et MS300M

Milieux	MS170	MS300	MS300M
Eléments	Concentration (mg/L)		
Alanine	82,1	145,3	145,3
Arginine	211,6	374,4	374,4
Asparagine	0,0	0,0	0,0
Aspartate	25,2	44,5	44,5
Cystéine	7,4	13,1	13,1
Glutamate	68,1	120,4	120,4
Glutamine	285,6	505,3	505,3
Glycine	10,4	18,3	18,3
Histidine	18,5	32,7	32,7
Isoleucine	18,5	32,7	32,7
Leucine	27,4	48,4	48,4
Lysine	9,6	17,0	17,0
Méthionine	17,8	31,4	31,4
Phénylalanine	21,5	38,0	38,0
Proline	346,3	612,6	612,6
Serine	44,4	78,5	78,5
Thréonine	42,9	75,9	75,9
Tryptophane	101,4	179,3	179,3
Tyrosine	10,4	18,3	18,3
Valine	25,2	44,5	44,5
Chlorure d'ammonium	260	460	460

Tableau 9 Composition en facteurs anaérobies des milieux de culture MS170, MS300 et MS300M

Eléments	MS170	MS300	MS300M
Ergostérol (mg/L)	15	15	30
Acide oléique (µg/L)	443	443	886
Tween 80 (ml/L)	0,5	0,5	1
Ethanol (ml/L)	0,5	0,5	1

### I.3. Conduite des fermentations

Les fermentations sont réalisées dans un réacteur ou dans un BRM (bioréacteur à membrane) et sont précédées d'une étape de pré-culture. Lors des fermentations, les concentrations initiales de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* sont respectivement de  $5.10^5$  et  $1.10^7$  cellules/mL en culture pure et en culture mixte. En culture mixte *T. delbrueckii* a donc une concentration cellulaire initiale 20 fois plus élevée que celle de *S. cerevisiae*. Deux répétitions sont réalisées pour chaque fermentation.

### **I.3.1. Pré-cultures**

Le pré-levain et le levain sont réalisés dans un milieu YPD préalablement stérilisé à l'autoclave. Le pré-levain contient 20 mL de YPD, il est ensemencé à partir de levures conservées sur pente et incubées à 25°C et 130 rpm pendant 11h. Le levain contient 300 mL de YPD. Il est ensemencé à partir d'un volume de pré-levain calculé pour avoir une concentration initiale dans le levain de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Le levain est incubé à 25°C et 130 rpm pendant 16h. Le levain sert d'inoculum pour la fermentation en réacteur, sa concentration finale est de l'ordre de  $1 \cdot 10^8$  cellules/mL.

### **I.3.2. Fermentations en anaérobiose non stricte**

Les milieux MS170 et MS300 ont été utilisés pour réaliser des fermentations en réacteur. Il n'y a eu aucun apport d'oxygène au cours des expériences. Ces fermentations sont qualifiées d'anaérobiose non stricte dans la mesure où de l'oxygène dissous est présent en début de fermentation. Le réacteur est un récipient de 2,5 litres contenant 1,5 litre de milieu de culture. Il est muni d'un système d'échantillonnage et d'une ouverture en tête de réacteur munie d'un filtre (0,45  $\mu\text{m}$ ) permettant d'éviter la surpression. Le réacteur est plongé dans un bain marie à 20°C et une agitation magnétique fixée à 250 rpm assure le mélange. Seules les cultures pures ont été réalisées dans ce type de réacteur. Le réacteur utilisé en anaérobiose non stricte correspond à un compartiment du bioréacteur à membrane décrit dans le prochain paragraphe.

### **I.3.3. Fermentations en anaérobiose stricte**

#### *I.3.3.1. Dispositif expérimental*

Le bioréacteur à membrane (Figure 19) est un outil communément utilisé pour étudier les interactions microbiennes (Albasi *et al.*, 2001; Pommier *et al.*, 2005; Nehme, 2008; Lopez *et al.*, 2014; Taillandier *et al.*, 2014; Brandam *et al.*, 2016). Cet outil repose sur le principe suivant: deux micro-organismes différents sont confinés dans des compartiments séparés par une membrane à fibres creuses mais évoluent dans le même milieu de culture grâce à une circulation alternative de ce milieu d'un compartiment à l'autre. La surpression alternative d'azote est appliquée 16h avant l'inoculation pour chasser complètement l'oxygène dissous dans le milieu et garantir une anaérobiose stricte.

La circulation du milieu au travers de la membrane est assurée par une surpression de 0,5 bar et contrôlée par des sondes de niveau. De l'azote comprimé est introduit alternativement dans l'espace de tête d'un compartiment, l'autre compartiment restant ouvert à l'atmosphère. Ceci permet de réaliser les surpressions nécessaires à la circulation du liquide d'un compartiment vers l'autre. L'entrée et la sortie du gaz sont contrôlées par un couple d'électrovannes. La stérilité du gaz entrant est assurée par filtration sur des membranes hydrophobes en Téflon, de seuil de coupure de 0,2  $\mu\text{m}$ . Chaque compartiment contient 2 sondes de niveau en acier inoxydable. Lorsque les 2 sondes de niveau sont en contact avec le milieu de culture, le système de contrôle fait basculer la mise sous tension des électrovannes. Les électrovannes qui étaient ouvertes se ferment et celles qui étaient fermées s'ouvrent. Ainsi, le compartiment qui était à pression atmosphérique passe en surpression et celui qui était en surpression passe à pression atmosphérique.

Le module de filtration à fibres creuses est fourni par la société Polymem (Fourquevaux, France). Les fibres en polysulfone sont en forme de U et maintenues ensemble à la base par une résine Epoxy. Les caractéristiques du module de filtration sont présentées dans le tableau Tableau 10.

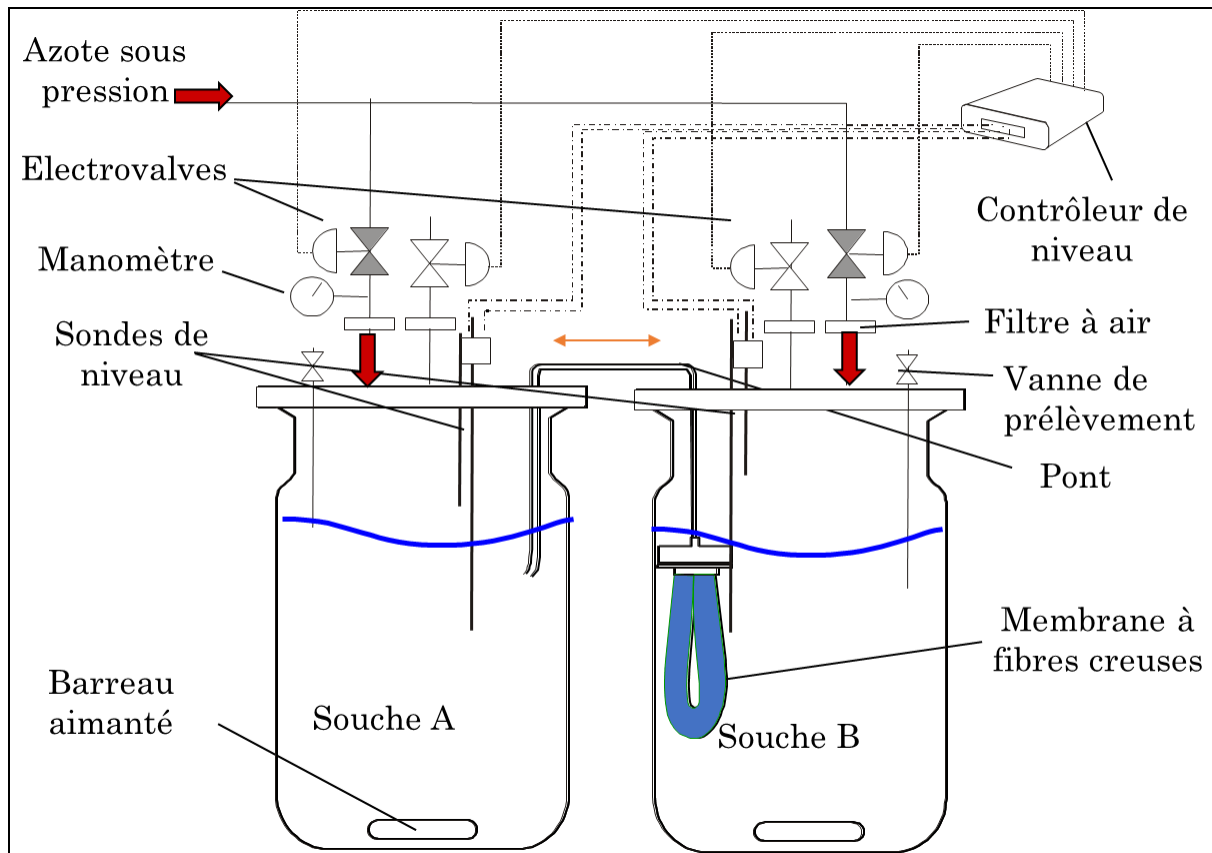


Figure 19 Bioréacteur à membrane.

Tableau 10 Caractéristiques du module de filtration (Tataridis, 2001)

Diamètre nominal des pores	0,1 $\mu\text{m}$
Diamètre interne des fibres	0,25 mm
Diamètre externe des fibres	0,43 mm
Nombre de fibres	1314
Longueur utile des fibres	0,09 m
Surface interne	0,107 $\text{m}^2$
Surface externe	0,156 $\text{m}^2$
Perméabilité à l'eau (mesuré dans le réacteur à 30 °C)	3,7 $10^{-12}$ m

Chaque compartiment du BRM contient 1,5 L de milieu de culture. L'homogénéité du milieu à l'intérieur de chaque compartiment est assurée par une agitation magnétique (250 rpm) à l'aide de barreaux aimantés. Les compartiments du BRM sont immergés dans un bain marie thermostaté à 20°C. Au cours de la fermentation, le système perd du volume principalement à cause des prélèvements. La hauteur des sondes de niveau est ajustée après chaque prélèvement pour assurer un volume échangé compris entre 100 et 200 mL. Ainsi, le temps de mélange du système est inférieur à 10 minutes (Salgado Manjarrez,



1999). Le temps de mélange est défini comme le temps nécessaire pour obtenir une différence de concentration entre les deux compartiments inférieure à 5%.

Les prélèvements dans chacun des compartiments s'effectuent après avoir arrêté la circulation de liquide. On équilibre les niveaux afin d'obtenir des volumes identiques dans chacun des deux compartiments. Ainsi, la concentration en biomasse ramenée au volume total de fermentation se déduit de la concentration mesurée dans un compartiment en la divisant par 2.

Les milieux MS300 et MS300M ont été utilisés pour les fermentations en BRM. Trois types de fermentation ont été réalisées: la culture pure, la culture mixte directe et la culture mixte indirecte. En cultures pure et mixte directe, la membrane était remplacée par un tuyau permettant le passage des micro-organismes dans chaque compartiment du BRM. En cultures pure et mixte directe, le volume de levain à inoculer a été équitablement réparti entre les 2 compartiments du BRM. En culture mixte indirecte, la membrane est présente et chaque micro-organisme est inoculé dans un compartiment distinct.

## II. Méthodes analytiques

Au cours des fermentations, des échantillons de 25 mL sont prélevés aseptiquement avec une fréquence d'un point toutes les 5 heures durant les 25 premières heures, puis d'un point toutes les 12 heures. Une partie de l'échantillon prélevé est utilisée directement pour la mesure de densité optique, l'énumération au microscope, le comptage sur milieu gélosé, la détermination du poids sec et la mesure de l'azote total. Toute dilution d'un échantillon contenant de la biomasse sera réalisée avec de l'eau salée (0,9% m/v) qui a une osmolarité similaire à celle des levures. L'autre partie de l'échantillon est centrifugé. Le surnageant est réparti dans plusieurs Eppendorfs puis stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour des analyses ultérieures. Le culot est rincé à l'eau ultrapure puis séché pour une analyse élémentaire ultérieure.

### II.1. Analyse de la biomasse

#### II.1.1. Spectrophotométrie

Après une dilution au  $10^{\text{ème}}$ , la densité optique (DO) des échantillons est mesurée à 620nm par un spectrophotomètre (JENWAY™ 7315) en utilisant une cuvette en quartz de 2 mm d'épaisseur. La dilution au  $10^{\text{ème}}$  permet d'avoir des  $\text{DO}_{620}$  inférieures à 0,8 durant toute la fermentation et ainsi de rester dans la gamme de linéarité entre la  $\text{DO}_{620}$  et la concentration cellulaire. La mesure de la  $\text{DO}_{620}$  est un moyen rapide de déterminer la dilution adéquate pour l'énumération des cellules.

#### II.1.2. Enumération au microscope

L'hématocymètre de Thomas a été utilisé pour l'énumération des cellules au microscope avec un grossissement 40 x 10. L'échantillon dilué est mélangé volume à volume avec le bleu de méthylène (0,1 g de bleu de méthylène dans un litre de solution de citrate de sodium à 2 %) pendant 5 minutes avant d'être compté au microscope. Les cellules viables apparaissent incolores alors que les mortes sont colorées en bleu. La viabilité correspond au rapport des cellules vivantes sur la population totale. L'hématocymètre de Thomas est constitué de 16 grands carreaux. La dilution adéquate permet d'avoir entre 30 et 50 cellules par grand carreaux au moment de l'énumération. Chaque comptage est réalisé à partir de 5 grands carreaux de la cellule de Thomas. S'il y a un nombre de cellules inférieur à 150 sur 5 grands carreaux, on compte alors les 16 grands carreaux. Si au contraire il y a un très grand nombre de cellules sur 5 grands carreaux, on dilue l'échantillon (Lange *et al.*, 1993). La concentration cellulaire, X est déterminée à l'aide de la formule suivante:

$$X \text{ (cellules/mL)} = \text{Facteur de dilution} * \frac{\text{Nombre de cellules comptées}}{\text{Nombre de carreaux comptés}} * 0,25 * 10^6$$

#### II.1.3. Poids sec

Un filtre d'acétate de cellulose de taille de pores de 0,45  $\mu\text{m}$ , préalablement séché à  $105^{\circ}\text{C}$  dans une étuve sous vide pendant 24h, est pesé. Puis 10 mL de l'échantillon prélevé sont filtrés sous vide à travers ce filtre. La biomasse est retenue sur ce filtre qui est ensuite séché à l'étuve jusqu'à ce que la masse reste constante. Le poids sec exprimé en g/L correspond à la différence entre la masse finale et la masse initiale du filtre divisée par le volume filtré. La corrélation entre le comptage et le poids sec est de 37,6 et 71,6  $10^9$  cellules par gramme respectivement pour *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*.

### II.1.4. Comptage sur milieu solide

Le milieu solide WLN permet de dénombrer les colonies de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Les boîtes de pétri ont été incubées 2 jours à 28 °C. Afin de différencier *T. delbrueckii* de *S. cerevisiae* lors des suivis de population, le milieu WLN additionné de cycloheximide à 2 mg/L a été utilisé. A cette concentration en antifongique, une croissance de *T. delbrueckii* a été observée après 4 jours d'incubation à 28 °C contre 2 jours sur le milieu WLN classique. La croissance de *S. cerevisiae* a été totalement inhibée. Le nombre de colonies de *S. cerevisiae* correspond à la différence de comptage entre les deux milieux solides.

L'énumération des cellules est la méthode de suivi des populations utilisée au cours de la modélisation. En culture mixte directe, on ne peut dissocier les cellules de *S. cerevisiae* de celles de *T. delbrueckii*. Des corrélations sont réalisées entre les colonies sur milieu solide et les cellules énumérées au microscope en culture pure et en culture mixte indirecte (Figure 20).

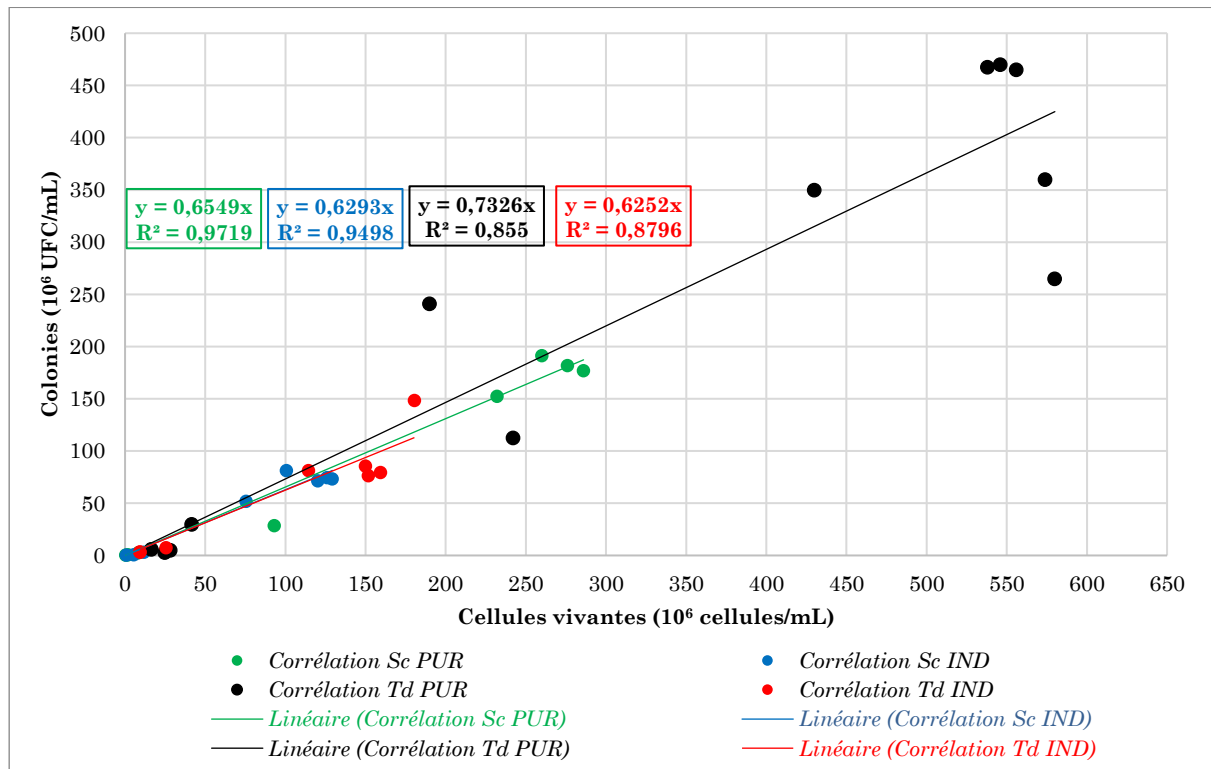


Figure 20 Corrélation obtenue en milieu MS300M. PUR et IND désignent respectivement la culture pure et la culture mixte indirecte.

Les corrélations de *S. cerevisiae* ont un coefficient supérieur à 0,94 alors que celui des corrélations de *T. delbrueckii* inférieurs à 0,88. On peut donc déterminer avec une plus grande fiabilité la concentration cellulaire de *S. cerevisiae*. La pente de la corrélation entre les cellules vivantes énumérées et les colonies comptées sur milieu solide de *S. cerevisiae* n'est pas significativement impactée par la présence de *T. delbrueckii*. Contrairement, celle de *T. delbrueckii* baisse de 15 % en présence de *S. cerevisiae*.

L'analyse des corrélations nous amène à exclure les corrélations de *T. delbrueckii* et à n'utiliser que celle de *S. cerevisiae* pour discerner les cellules vivantes des deux levures en absence de membrane. En culture mixte directe, la concentration en cellules vivantes de *S.*

*cerevisiae* est déterminée à partir d'une corrélation en connaissant la concentration des colonies. La concentration en cellules vivantes de *T. delbrueckii* est déterminée par la soustraction des cellules de *S. cerevisiae* des cellules vivantes totales.

### II.1.5. Analyse élémentaire

L'échantillon est centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 rpm. Le surnageant est retiré et de l'eau ultrapure est ajouté au culot. Ensuite le mélange est agité et centrifugé. Cette étape de lavage est répétée trois fois. Le précipité obtenu est placé à 105°C dans une étuve sous vide. Les fractions massiques de carbone, d'hydrogène et d'azote sont déterminées par combustion sèche en utilisant un microanalyseur PERKIN ELMER 2400 (Jimenez and Ladha, 1993). Cette analyse est réalisée au service d'analyse du Laboratoire de Chimie de Coordination (UPR 8241 Toulouse, France).

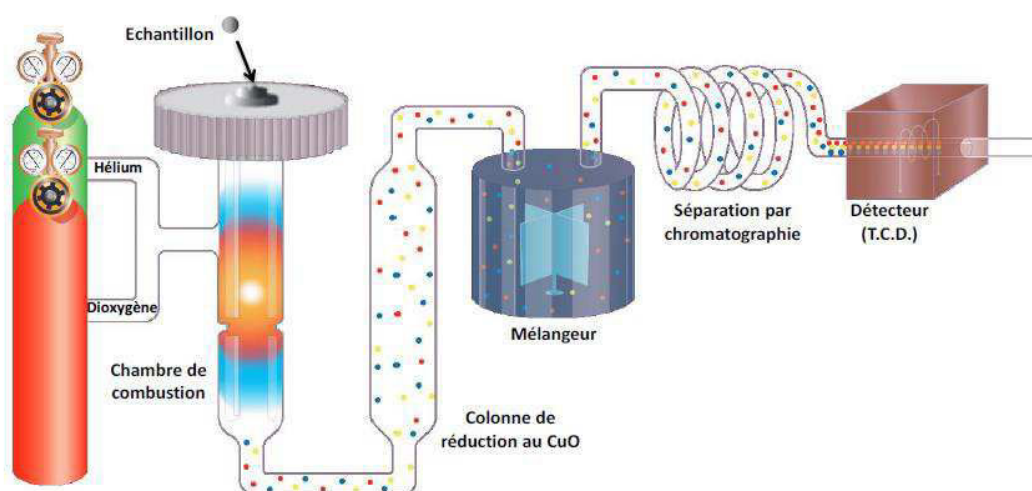


Figure 21 Schéma de principe du microanalyseur PERKIN ELMER 2400 série II, l'hélium est utilisé comme gaz vecteur.

L'échantillon sec préparé est mis dans une capsule d'étain et brûlé sous oxygène pur à 1800°C. La combustion « éclair » de l'échantillon assure une combustion complète. La combustion de l'échantillon libère un mélange de gaz : CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et N<sub>2</sub> résultant respectivement de la combustion du carbone, de l'hydrogène et de l'azote. A la sortie de la chambre de combustion, les gaz subissent une réduction à l'aide d'oxyde de cuivre afin d'éliminer l'oxygène résiduel et de convertir les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) en diazote (N<sub>2</sub>). Les gaz passent ensuite dans une chambre de mélange où ils sont maintenus dans des conditions de pression et de température constantes. Ils sont séparés par chromatographie et quantifiés grâce à un détecteur à conductivité thermique.

L'analyseur permet de travailler avec des échantillons solides ou liquides d'origine organique, organométallique ou inorganique de 3 à 500 mg, avec un temps d'analyse de 6 min par échantillon. Le dosage des éléments chimiques est linéaire entre 0,001 et 3,6 mg pour le carbone, 0,001 et 1,0 mg pour l'hydrogène, 0,001 et 6,0 mg pour l'azote. On fait l'hypothèse que la biomasse est composée uniquement de carbone, d'hydrogène, d'oxygène

et d'azote. La fraction d'oxygène est donc complémentaire à la somme des fractions de carbone, d'hydrogène et d'azote.

## II.2. Analyse du milieu de culture

Les analyses du milieu de culture sont effectuées sur le surnageant d'un échantillon centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 rpm.

### II.2.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les échantillons prélevés sont dilués au 10<sup>ème</sup>, filtrés et analysés en HPLC (Thermo Scientific, France) pour la quantification des sucres, des acides organiques, de l'éthanol et du glycérol. La colonne utilisée est une colonne Rezex ROA-Organic acid H<sup>+</sup>(8%), 250\*4.6 mm (Phenomenex, France) thermostatée à 30°C et associée à deux détecteurs en série. Les pics des acides malique, citrique, succinique et acétique sont détectés par un détecteur UV (Accela PDA detector, Thermo Scientific, France) situé juste après la colonne. Les pics de glucose, de fructose, de glycérol et d'éthanol sont détectés par un réfractomètre (Finnigan Surveyor RI Plus detector, Thermo Scientific, France) situé en fin de boucle.

Le volume d'échantillon injecté est de 25 µL. La phase mobile est une solution aqueuse d'acide sulfurique 10 mM (pH 2.2). Son débit est fixé à 170 µL/min. Le système est calibré avec un mélange de glucose, de fructose, de glycérol et d'éthanol dans une gamme de 0 à 14 g/L et un mélange d'acides malique, citrique, succinique et acétique dans une gamme de 0 à 2 g/L. Les temps de rétention de ces composés sont donnés dans le

Tableau 11.

*Tableau 11 Temps de rétention des différentes espèces dosées à l'HPLC*

Espèces	Temps de rétention (min)
Glucose	10,5
Acide citrique	10,8
Fructose	11,5
Acide malique	11,7
Acide succinique	14,2
Glycérol	14,7
Acide acétique	16,8
Ethanol	21,4

### II.2.2. Azote assimilable

Lors du suivi de l'azote  $\alpha$ -aminé et de l'azote ammoniacal, un spectromètre SPECTROstar™ a été utilisé pour quantifier l'absorbance.

#### II.2.2.1. Azote $\alpha$ -aminé

En milieu basique, l'azote des groupements aminés primaires réagit avec l'ophthalaldéhyde (OPA) en présence de N-acétyl-L-cystéine (NAC) pour former des dérivés isoindole quantifiables à une longueur d'onde de 340 nm (Figure 22). La quantité de dérivés

d'isoindole formés par cette réaction est proportionnelle à la quantité d'azote  $\alpha$ -aminé. Le dosage est effectué avec le kit commercial Megazyme K-PANOPA distribué par Libios (Pontcharra Sur Turdine, France). Le dosage est linéaire dans une gamme de concentration allant de 4 à 200 mg/L. Le seuil de détection est de 2,5 mg/L. Ces dosages sont effectués dans des microplaques à 96 puits.

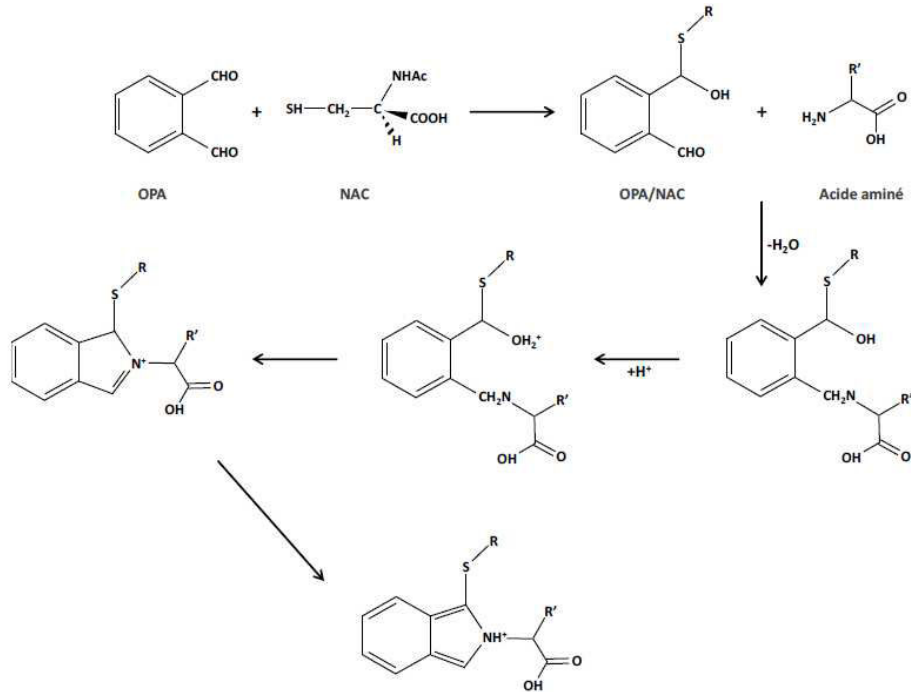
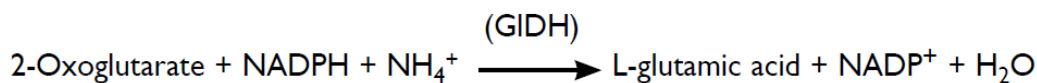


Figure 22 Réaction de la formation de dérivés isoindole par la réaction des acides aminés primaires avec l'OPA en présence de NAC (Aubrey, 2008).

Hormis l'azote de la proline, l'ensemble des atomes d'azote des acides aminés sont considérés assimilables en conditions anaérobiques (Duteurtre *et al.*, 1971; Jauniaux *et al.*, 1987; Salmon et Barre, 1998). Pour établir un bilan stœchio-cinétique, il est nécessaire de tenir compte de l'ensemble de l'azote des acides aminés contenu dans la levure. En effet certains acides aminés tels que l'arginine, l'histidine et le tryptophane possèdent des atomes d'azote en plus de ceux présents dans la fonction  $\alpha$ -aminé. Cependant la méthode analytique ne permet pas de les mesurer. L'azote aminé total est calculé en considérant que les levures assimilent les acides aminés sans préférence d'un acide aminé par rapport à un autre.

### II.2.2.2. Azote ammoniacal

En présence de l'enzyme glutamate déshydrogénase (GIDH) et de nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (NADPH), l'azote ammoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et le 2-oxoglutarate sont transformés en L-glutamate:



La quantité de NADP<sup>+</sup> est proportionnelle à la quantité de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> formée. Le NADPH consommé est quantifié par la mesure de la diminution d'absorbance à 340 nm. Le dosage

est effectué avec le kit commercial K-AMIAR dans des microplaques à 96 puits. Il est linéaire pour des quantités d'ions ammonium comprises entre 0,1 et 0,7 µg par puit.

### II.2.3. pH

Le pH du milieu est suivi hors ligne au moyen d'un pH-mètre EUTECH INSTRUMENTS™.

## II.3. Bilan carbone

Le bilan carbone est calculé à tout instant de la fermentation. Son pourcentage de bouclage correspond au rapport de la masse de carbone présente divisée par la masse de carbone initiale:  $\frac{m_C(t)}{m_C(t=0)}$ . On estime que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est produit de façon équimolaire à l'éthanol.

D'où,  $n_{CO_2}(t) = n_{\text{éthanol}}(t)$

$$\text{Et } C_{CO_2}(t) = \frac{m_{CO_2}(t)}{V(t)} = \frac{M_{CO_2} * n_{CO_2}(t)}{V(t)} = \frac{M_{CO_2} * n_{\text{éthanol}}(t)}{V(t)} = \frac{M_{CO_2} * C_{\text{éthanol}} * V(t)}{V(t) * M_{\text{éthanol}}} = \frac{M_{CO_2}}{M_{\text{éthanol}}} * C_{\text{éthanol}}(t)$$

Avec:

$n_i(t)$ : la quantité de matière de l'espèce i à l'instant t

$C_i(t)$ : la concentration massique de l'espèce i à l'instant t

$m_i(t)$ : la masse de l'espèce i à l'instant t

$M_i$ : la masse molaire de l'espèce i

$V(t)$ : le volume du réacteur à l'instant t

On estime que les variations de volume du réacteur sont dues, uniquement, aux volumes prélevés lors de l'échantillonnage. Au cours de nos expériences, la plus grande différence entre la variation de volume du réacteur et la somme des volumes prélevés était de 130 mL. Ceci correspondait respectivement à 4 et 6% du volume initial et du volume final du réacteur. Ceci confirme le fait de négliger les variations de volume qui ne sont pas dues à l'échantillonnage.

A toute instant, la masse de carbone totale correspond à la somme de la masse de carbone dans le réacteur et de la masse de carbone prélevée antérieurement.

La masse de carbone dans le réacteur correspond à somme de la masse de carbone des éléments présents dans le réacteur:

$$m_C(t)(\text{réacteur}) = m_{C_{\text{sucres}}}(t) + m_{C_{\text{glycérol}}}(t) + m_{C_{\text{éthanol}}}(t) + m_{C_{CO_2}}(t) + m_{C_{\text{biomasse}}}(t)$$

$$m_C(t)(\text{réacteur})$$

$$= \left( w_{C_{\text{sucres}}} * C_{\text{sucres}}(t) + w_{C_{\text{glycérol}}} * C_{\text{glycérol}}(t) + \left( w_{C_{CO_2}} * \frac{M_{CO_2}}{M_{\text{éthanol}}} + w_{C_{\text{éthanol}}} \right) * C_{\text{éthanol}}(t) + w_{C_{\text{biomasse}}} * C_{\text{biomasse}}(t) \right) * V(t)$$

Avec:

$m_{y_i}$ : la masse de l'élément y dans l'espèce i

$w_{y_i}$ : la fraction de l'élément y dans l'espèce i

Le volume du réacteur correspond au volume initial ôté de la somme des volumes prélevés:

$$V(t) = V(t = 0) - \sum_{i=0}^{t-1} V_p(i)$$

La masse de carbone prélevé est liée au volume prélevé:

$$m_c(t)(\text{prélevé}) = m_c(t)(\text{réacteur}) * \frac{V_p(t)}{V(t)}$$

$$m_c(t) = m_c(t)(\text{réacteur}) + \sum_{i=0}^{t-1} m_c(i)(\text{prélevé})$$

## II.4. Traitement des données expérimentales

### II.4.1. Lissage des courbes expérimentales

Les données expérimentales pour les cinétiques des FA ont été lissées avec une fonction spline cubique (Reinsch, 1967). Cette fonction  $g(t)$  vérifie pour chaque couple de points expérimentaux  $(t_i, X_i)$  les conditions :

$$\int_{t_0}^{t_n} g''(t)^2 dt, \text{ minimum} \quad \text{et} \quad \sum_{i=0}^{i=n} \left( \frac{g(t_i) - X_i}{\sigma(X_i)} \right)^2 < S$$

Avec,

$X_i$  : valeur expérimentale de la variable X au temps t

$t_i$  : Temps de prise de l'échantillon, compté à partir de l'ensemencement

$\sigma(X_i)$  : écart-type lié aux valeurs expérimentales de X

n : nombre total de points expérimentaux

S : constante de lissage

La première condition vise à minimiser  $g''(t)$ , la dérivée seconde des fonctions de lissage  $g(t)$ . Ceci rend linéaire les jonctions des courbures les unes entre les autres, générant ainsi des fonctions lisses. La deuxième condition exerce une contrainte sur ce lissage. En effet, la somme des carrés des écarts entre les points expérimentaux et les points du lissage ne doit pas dépasser la constante 'S'. Une macro Excel développée au sein du LGC permet de choisir manuellement la constante S et d'examiner son impact sur les courbes en temps réels. En pratique, elle doit être choisie conformément aux règles suivantes:

- L'allure de la courbe dérivée  $g'(t)$  doit être physiquement significative.
- La courbe  $g(t)$  ne doit pas dépasser graphiquement les barres d'erreur sur les points expérimentaux.



### II.4.2. Calcul des erreurs expérimentales

Si  $m$  mesures  $x_i$  d'une grandeur  $X$  sont effectuées, la valeur vraie de  $X$  peut être estimée par la moyenne  $\bar{x}$  des  $m$  valeurs  $x_i$  définie par:  $\bar{x} = \frac{\sum_{i=0}^m x_i}{m}$ .

L'estimation est d'autant meilleure que la dispersion des valeurs  $x_i$  autour de la moyenne  $\bar{x}$  est étroite. L'erreur expérimentale correspond au coefficient de variation  $V_r$  qui quantifie la dispersion des valeurs  $x_i$ . Il est défini par  $V_r = \frac{s_x}{\bar{x}}$ ,  $s_x$  étant une estimation de l'écart type de  $X$  qui est calculé de la manière suivante:

$$s_x = \sqrt{\sum_{i=1}^m \frac{(x_i - \bar{x})^2}{m - 1}}$$

La valeur de l'erreur expérimentale observée pour chaque élément analysé est présentée dans le tableau suivant. L'erreur expérimentale est obtenue en quantifiant la dispersion de plusieurs mesures d'un échantillon.

Tableau 12 Erreur expérimentale des méthodes analytiques

Méthodes analytiques	Erreur expérimentale
Enumération au microscope	9%
Poids sec	6%
Comptage sur milieu solide	13%
Glucose (HPLC)	4%
Fructose (HPLC)	3%
Glycérol (HPLC)	2%
Ethanol (HPLC)	4%
Azote $\alpha$ -aminé	12%
Azote ammoniacal	5%
Carbone (analyse élémentaire)	0,4%
Hydrogène (analyse élémentaire)	1%
Azote (analyse élémentaire)	0,2%

### II.4.3. Statistiques

Après avoir observé l'homogénéité des variances, (test de Fisher,  $p > 0,05$ ), une ANOVA ( $p < 0,05$ ) est utilisée pour déterminer les différences statistiquement significatives entre les modalités. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le logiciel RStudio (Racine, 2012).

### II.4.4. Terminologie

La durée de la fermentation est le temps pour que 97 % du sucre initial soit consommé. Elle est exprimée en heure.

Le rendement en éthanol est défini comme étant le rapport de la quantité d'éthanol formée sur la quantité de sucre consommée. Il est exprimé en g/g.

La vitesse moyenne de production d'éthanol est définie comme étant le rapport de la quantité d'éthanol formée sur la durée de la fermentation, exprimé en g/L/h.

La vitesse moyenne de consommation des sucres est définie comme étant la quantité totale de sucre consommée divisée par la durée de la fermentation. Elle est exprimée en g/L/h.

Le taux de croissance est la dérivée de la biomasse en fonction du temps divisée par la quantité de biomasse. Elle est exprimée en h<sup>-1</sup>.

### III. Méthodes numériques

L'outil numérique *Modelight* a été développé afin de réaliser les intégrations numériques et les estimations paramétriques nécessaires à la modélisation des cultures mixtes de levures. Cette application a été développée sous Matlab® 6 au cours de la thèse de S. Pommier (2003). Elle fonctionne sur tout ordinateur équipé d'une version de Matlab® comprise entre 6 et 2014a (inclusive), accompagnée de la suite de routines "Optimization Toolbox".

#### III.1. Terminologie

Afin d'éviter toute confusion, nous précisons ci-dessous le sens que nous donnons aux termes employés par la suite.

- **EDO** : Equation(s) différentielle(s) ordinaire(s).
- **Modèle** : Ensemble d'équations différentielles décrivant la dynamique d'un système physico-(bio)chimique, c'est à dire l'évolution dans le temps des variables décrivant ce système en fonction de paramètres. Un modèle est dit *évolutif* s'il consiste en un système d'EDO qui évolue au cours du temps lorsque des événements de transition sont atteints.
- **Paramètre** : Ensemble des grandeurs qui apparaissent dans le système d'EDO d'un modèle et qui sont fixes au cours du temps (par opposition aux variables). Eviter la confusion entre les paramètres du modèle et les « paramètres » d'une expérience, c'est à dire les grandeurs physiques qui sont fixées et que l'on appellera ici conditions initiales.
- **Événement** : Etat du système étudié correspondant à une valeur particulière de l'une de ses variables ou d'une fonction de ses variables. Un événement est dit *de transition* si le système d'EDO évolue lorsque cet événement est atteint.
- **Intégration** : Résolution du système d'EDO conduisant à la connaissance des valeurs des variables entre un temps initial et un temps final.
- **Estimation Paramétrique** : Recherche de la valeur des paramètres d'un modèle par optimisation d'un *critère*. Cette recherche est aussi appelée « problème inverse » par opposition à un problème classique de résolution d'EDO, pour lequel les paramètres sont connus et les variables sont à calculer.
- **Critère** : Fonction numérique caractérisant l'écart entre les valeurs expérimentales ( $X_{exp}$ ) et les valeurs calculées ( $X_{calc}$ ) par résolution du système d'EDO. Le critère choisi par défaut est celui des moindres carrés :  $\sum (X_{calc} - X_{exp})^2$ , mais des pondérations sont possibles.
- **Jeu de données** : Ensemble des valeurs expérimentales ou des variables « connues », disponibles pour des conditions initiales particulières.

## III.2. Fonctionnalités

*Modelight* permet de rapidement tester des modèles dynamiques à partir de la seule connaissance de leurs variables, de leurs paramètres et du système d'équations différentielles qui les définit. Aucune programmation algorithmique n'est requise. Cette application a deux principales fonctionnalités:

- l'intégration de modèles, c'est-à-dire la simulation
- l'estimation paramétrique de modèles à partir des données expérimentales

Lorsque le logiciel est utilisé en mode intégration, il permet de déterminer le profil des variables entre un instant initial et un temps final, connaissant leurs valeurs au temps initial ainsi que les valeurs des paramètres du modèle. L'utilisation du mode d'estimation paramétrique permet de résoudre le problème inverse de l'intégration: connaissant le profil des variables entre un temps initial  $t_0$  et un temps final  $t_f$ , les valeurs des paramètres sont déterminées, de telle sorte que l'écart entre les valeurs des variables calculées par intégration du modèle et les valeurs connues soit minimal. Dans la pratique, les valeurs connues correspondent à des valeurs expérimentales obtenues à partir de conditions initiales particulières. Il est possible de choisir parmi l'ensemble des paramètres du modèle ceux que l'on souhaite fixer arbitrairement, et ceux dont on souhaite déterminer les valeurs. Ceci est utile dans les cas où certains paramètres sont connus a priori.

## III.3. Algorithme

### III.3.1. Présentation générale

La structure générale de l'interface (

Figure 23), permet de traiter les problèmes d'intégration et d'estimation paramétrique. L'utilisateur saisit toutes les entrées nécessaires à la résolution du problème par l'intermédiaire d'une interface graphique. Les résultats sont sauvegardés dans des fichiers texte, et peuvent être représentés sous forme graphique.

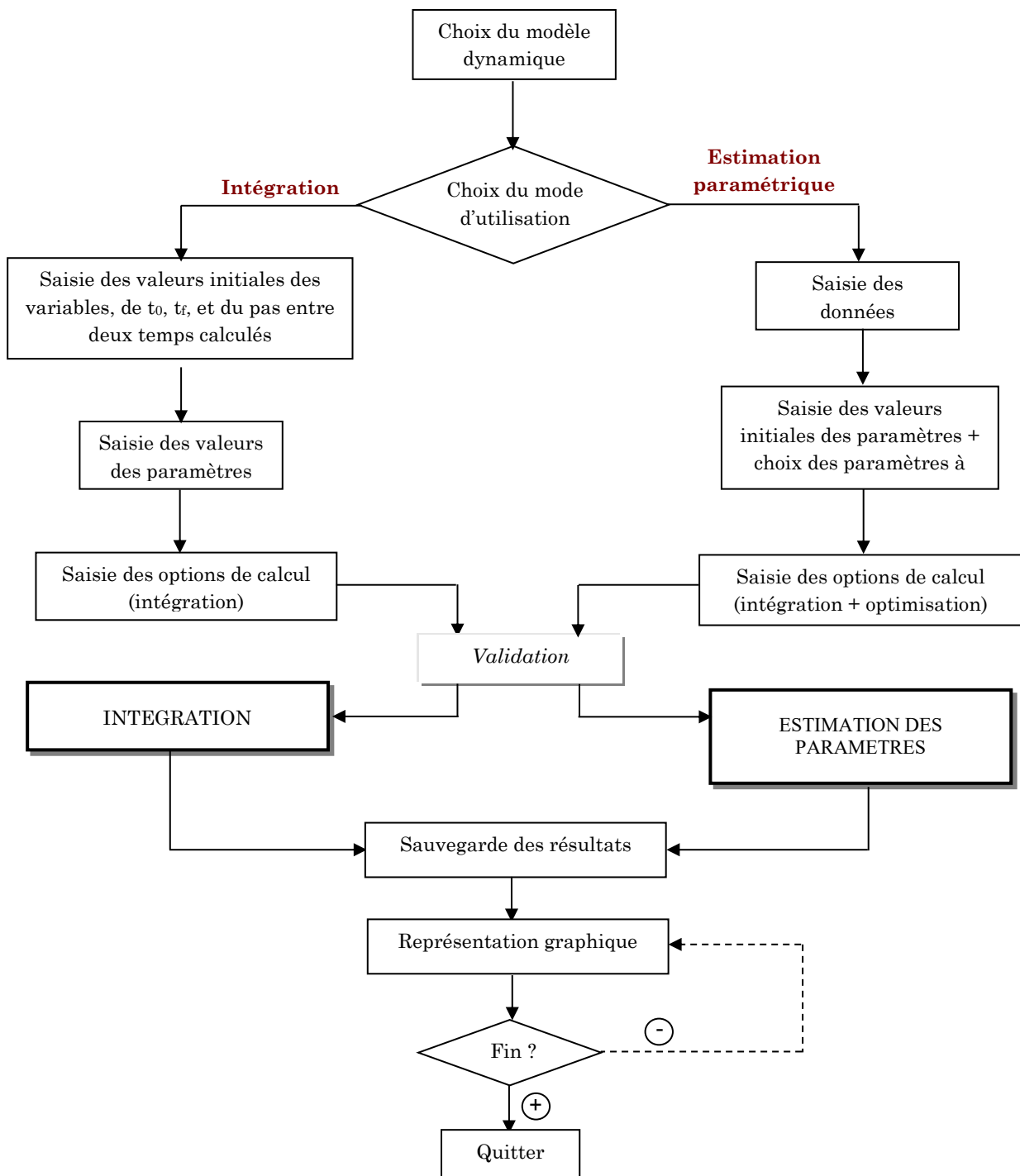


Figure 23 Structure générale de l'interface de l'application Modelight (Pommier, 2003).

### III.3.2. Intégration

La méthode d'intégration par défaut est une méthode de Runge-Kutta à pas variable d'ordre 4 (Dormand and Prince, 1980). Cette méthode s'est avérée lente pour résoudre certaines équations proposées durant ce travail de thèse. Vu la complexité de certaines équations différentielles à résoudre, nous avons aussi utilisé la méthode ode15s. Elle est basée sur

une implémentation à taille de pas quasi-constante des formules différentielles numériques de la famille de Klopfenstein-Shampine (Shampine and Reichelt, 1997).

### III.3.3. Estimation paramétrique

#### III.3.3.1. Concept général

L'estimation paramétrique a pour objectif de définir la valeur des paramètres du modèle permettant d'obtenir, pour des conditions initiales données, des profils de variables se rapprochant le plus possible de profils « connus » (en général issus d'expériences) . Pour ce faire, on définit une grandeur scalaire représentative de l'écart entre valeurs connues et valeurs calculées. L'objectif de l'estimation paramétrique revient alors à une optimisation numérique qui peut être représentée comme suit :

$$\left\{ \begin{array}{l} P^{opt} = \min_P \Phi(P, X_{exp}, X_{calc}) \\ X_{calc} = f(P, X_0) \\ P \in \mathcal{P} \end{array} \right. \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} \mathcal{P} : \text{ensemble des valeurs possibles des} \\ \text{paramètres,} \\ P^{opt} : \text{la valeur des } p \text{ paramètres } P \text{ solution du} \\ \text{problème} \\ X_{exp} : \text{ensemble des valeurs connues disponibles} \\ X_{calc} : \text{ensemble des valeurs calculées par le} \\ \text{modèle} \\ X_0 : \text{conditions initiales} \\ f : \text{modèle} \end{array}$$

La fonction  $\Phi$  est appelée *critère*.

On appelle *estimateur* la fonction  $h : X_{exp} \longrightarrow P^{opt}$  . Par abus de langage, on désigne également par *estimateur* la méthode numérique employée pour résoudre l'optimisation d'un critère donné.

Dans les cas qui nous concernent, les valeurs « connues » sont des « jeux de données expérimentales », chacun correspondant à des conditions initiales particulières. On a ainsi  $X_{exp} = (X_{exp}\{1\}, \dots, X_{exp}\{i\}, \dots, X_{exp}\{n_{exp}\})$ ,  $i = 1, \dots, n_{exp}$ . Chaque jeu de données est constitué de profils de variables au cours du temps. Pour chaque  $i$ ,  $X_{exp}\{i\}$  représente des couples  $(t, X)$  déterminés expérimentalement. Les variables considérées sont les mêmes quel que soit  $i$ , mais le nombre de points de mesure des variables peut être différent d'un jeu de données à un autre.

L'intégration du modèle pour chaque condition initiale doit impérativement fournir les valeurs des variables aux temps expérimentaux, afin de pouvoir procéder à l'estimation d'un critère significatif.

La démarche générale pour l'estimation des paramètres optimaux est synthétisée sur la Figure 24.

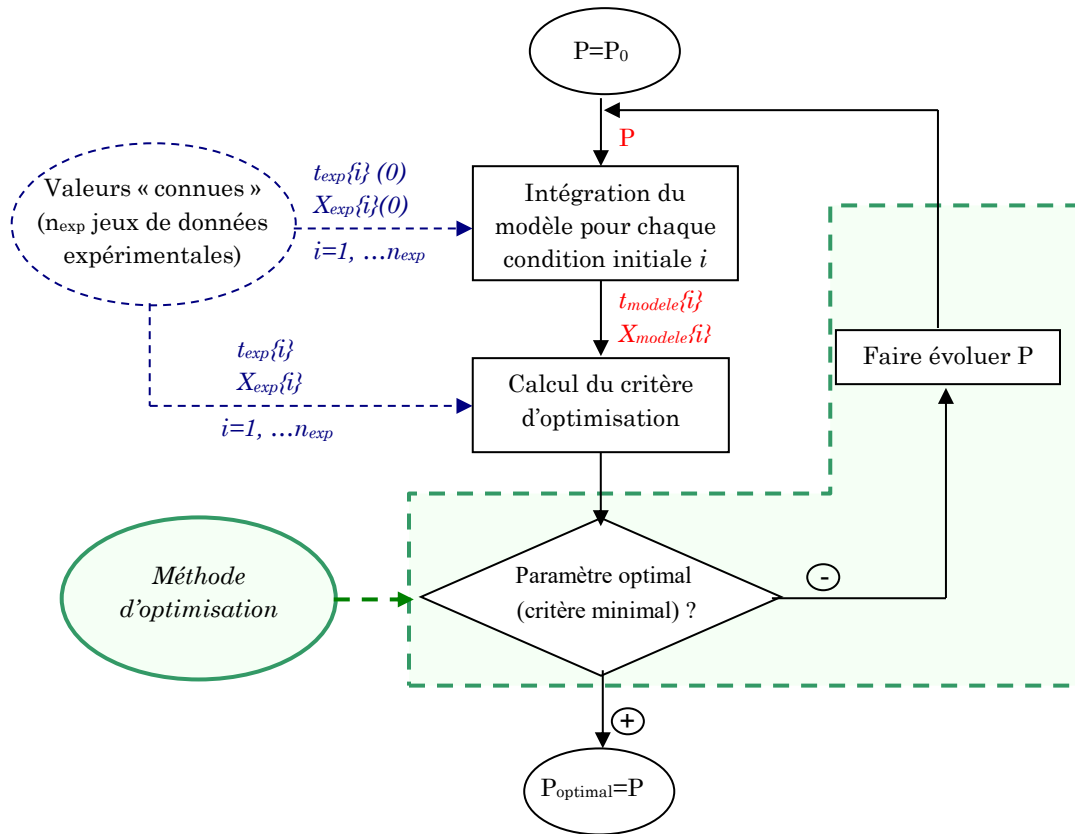


Figure 24 Démarche générale pour l'estimation paramétrique.

### III.3.3.2. Critères d'optimisation

Le critère d'optimisation constitue l'élément essentiel de l'estimation paramétrique. La grandeur scalaire qu'il fournit est l'unique indicateur de l'écart qui existe entre les valeurs de variables calculées d'après le modèle et les valeurs « connues ». La recherche des paramètres optimaux doit s'appuyer sur plusieurs jeux de données expérimentales, c'est à dire sur des valeurs « connues » de variables correspondant à des conditions initiales variées. Le critère à minimiser est ainsi la somme des sous-critères :  $\sum_i^{n_{exp}} S_i$ ,  $n_{exp}$  étant le nombre de jeux de données considéré, et  $S_i$  le critère calculé pour chaque jeu de données.

L'expression du critère est la suivante :

$$\sum_{i=1}^{n_{exp}} \sum_{j=1}^{n_{var}} \sum_{k=1}^{n_p(i)} \left( X_{calc}^i(k, j) - X_{exp}^i(k, j) \right)^2 \text{ avec } \left\{ \begin{array}{l} n_{exp} : \text{ nombre de jeu de données} \\ n_p(i) : \text{ nombre de points de mesure pour le jeu de données } i. \\ n_{var} : \text{ nombre de variables mesurées.} \\ X_{exp}^i(k, j) : \text{ valeur de la variable } j \text{ mesurée au point } k \text{ pour des conditions initiales } i. \\ X_{calc}^i(k, j) : \text{ valeur de la variable } j \text{ calculée par le modèle au point } k \text{ pour des conditions initiales } i. \\ t_{exp}^i(k) : \text{ temps auquel le point } k \text{ est mesuré (ou calculé) pour le jeu de donnée } i. \end{array} \right.$$

La méthode numérique utilisée pour la résolution du problème de minimisation du critère est une méthode de type *SQP* (*Sequential Quadratic Programming*) disponible dans la bibliothèque d'optimisation de Matlab<sup>®</sup>.

La méthode *SQP* permet la résolution de problèmes d'optimisation avec contraintes. Les contraintes peuvent être du type  $\begin{cases} g_i(P) = 0 & i = 1, \dots, m_e \\ g_i(P) \leq 0 & i = m_e + 1, \dots, m \end{cases}$ , avec  $m_e$  contraintes égalité, et

$m - m_e$  contraintes inégalités. Les fonctions  $g_i$  sont quelconques. Dans les cas qui nous concernent, les contraintes appliquées sont souvent limitées au bornage des paramètres :  $P_{min} < P < P_{max}$ . Ce bornage évite l'obtention de solutions numériques physiquement aberrantes.

### III.3.3.3. Sensibilité du critère aux paramètres

Lorsque les paramètres optimaux ont été trouvés, il est intéressant de déterminer la sensibilité du critère d'optimisation à la solution. Il s'agit de vérifier que les valeurs numériques données sont significatives, c'est à dire de vérifier que les paramètres considérés ont bien une influence sur les résultats de l'intégration du modèle. Un module de recherche par perturbations numériques permet d'étudier la sensibilité des paramètres. Il consiste à rechercher la variation maximale des paramètres trouvés qui conduit à une variation du critère d'optimisation considéré d'un pourcentage  $\epsilon$ . Chaque paramètre  $k$  est traité séparément en recherchant les valeur  $\eta_k^+$  et  $\eta_k^-$  vérifiant :



$$\begin{cases} \Phi(P^{opt}(1), \dots, (1 + \eta_k^+) P^{opt}(k), \dots, P^{opt}(p)) = (1 + \varepsilon) \cdot \Phi(P^{opt}(1), \dots, P^{opt}(k), \dots, P^{opt}(p)) \\ \Phi(P^{opt}(1), \dots, (1 - \eta_k^-) P^{opt}(k), \dots, P^{opt}(p)) = (1 + \varepsilon) \cdot \Phi(P^{opt}(1), \dots, P^{opt}(k), \dots, P^{opt}(p)) \end{cases}$$

La recherche de  $\eta_k^+$  et  $\eta_k^-$  se fait par incrémentation. Le pas est de 0,01 (1%).



# CHAPITRE I: CULTURES PURES DE LEVURES

---

"Sur le plan de la méthodologie scientifique, il faut être sévère avec soi-même"

*Cheick Anta Diop*

## I. Objectifs

---

Ce premier chapitre sert d'introduction à l'ensemble des travaux réalisés. Il présente des résultats concernant les cinétiques de croissance, de consommation de substrats et de production de métabolites en culture pure, afin de bien cerner les éléments qui déterminent le comportement des levures. L'objectif est de quantifier l'influence de plusieurs facteurs sur les fermentations de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en culture pure.

Nous présenterons successivement les effets de l'azote assimilable en anaérobiose non strict, l'impact du passage d'un environnement anaérobique non strict à un environnement anaérobique strict et les effets des facteurs anaérobies en anaérobiose strict sur l'évolution des cinétiques de chaque levure en culture pure. L'influence des paramètres opératoires sera évaluée en comparant la croissance, la consommation des nutriments et la production des métabolites observées pour chaque levure dans des conditions expérimentales différentes. L'influence des paramètres opératoires sur le comportement de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* sera également comparé.

## II. Influence la concentration d'azote assimilable

Les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont été réalisées en réacteur avec les milieux MS170 et MS300. En passant du milieu MS170 au milieu MS300, la concentration initiale d'azote assimilable passe de 176 à 324 mg N/L.

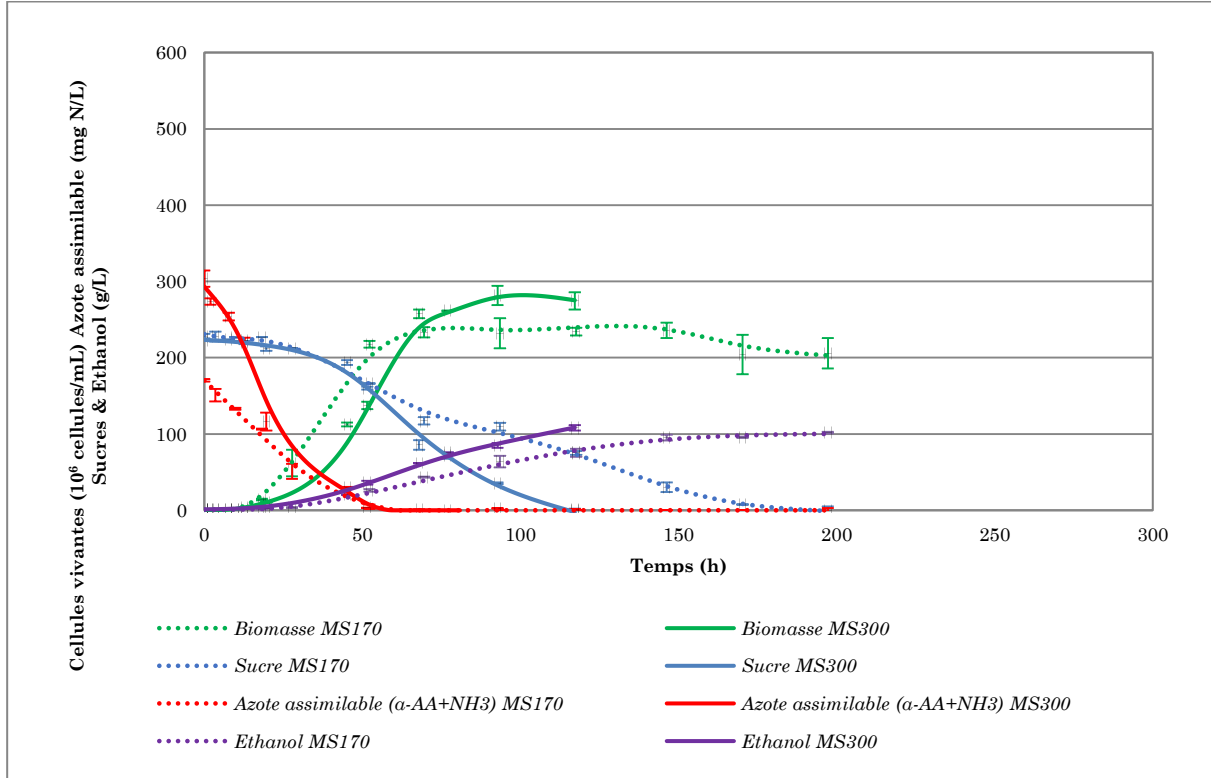


Figure 25 Profils de croissance, de consommation de sucre, d'assimilation d'azote et de production d'éthanol au cours des cultures de *S. cerevisiae* en anaérobiose non stricte. Les barres représentent l'écart moyen observé sur deux répétitions.

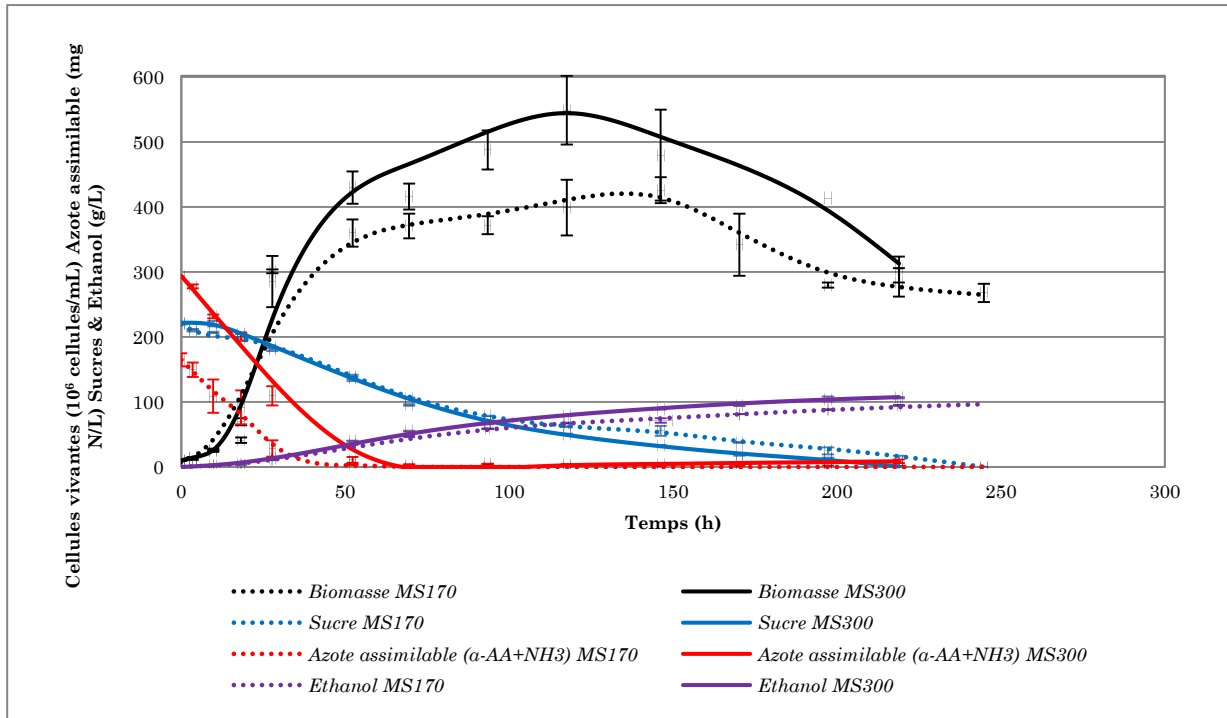


Figure 26 Profils de croissance, de consommation de sucre, d'assimilation d'azote et de production d'éthanol au cours des cultures de *T. delbrueckii* en anaérobiose non stricte. Les barres représentent l'écart moyen observé sur deux répétitions.

Croissance des levures:

Lorsque la concentration initiale d'azote assimilable augmente, on observe une augmentation significative de la population maximale de *S. cerevisiae* et de *T. delbrueckii* en culture pure. La population maximale de *S. cerevisiae* augmente légèrement en passant de 240 à 281 .10<sup>6</sup> cellules/mL (Figure 25). On observe une augmentation plus nette de la population maximale de *T. delbrueckii* qui passe de 420 à 542 .10<sup>6</sup> cellules/mL (Figure 26). L'augmentation d'azote assimilable favorise donc la production de cellules vivantes.

Dans les deux milieux de culture, *S. cerevisiae* (Figure 25) et *T. delbrueckii* (Figure 26) assimilent complètement l'azote disponible. On constate une baisse de la vitesse de croissance peu après l'épuisement de l'azote assimilable. Dans le milieu MS170, il y a un arrêt net de la croissance de *S. cerevisiae* au moment où l'azote du milieu est épuisé. Dans les trois autres conditions, la croissance est ralentie. Globalement, le manque d'azote entraîne un ralentissement de la croissance. Ces résultats sont concordants avec ceux de Bely *et al.*, (1990) qui ont observé que l'ajout d'azote assimilable permettait de relancer la croissance de levures *S. cerevisiae* en phase de ralentissement.

Fermentation alcoolique:

En augmentant la concentration initiale d'azote assimilable, on observe une diminution du temps de fermentation de 197 à 117 h et de 245 à 218 h respectivement pour *S. cerevisiae* (Figure 25) et *T. delbrueckii* (Figure 26). Le sucre est totalement consommé au cours de toutes ces fermentations. L'augmentation d'azote assimilable a induit une augmentation de la vitesse moyenne de consommation de sucre de 68 et 11 % respectivement pour *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*.

En milieu MS170, la concentration finale en éthanol est de 102 et 97 g/L respectivement pour *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. En milieu MS300, chaque levure produit 108 g/L d'éthanol en fin de culture pure. Pour les deux milieux de culture, la concentration finale et le rendement en éthanol de *S. cerevisiae* ne sont pas significativement différents de ceux de *T. delbrueckii*. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration d'azote assimilable n'entraîne pas de modifications significatives de la concentration finale et du rendement en éthanol des deux levures en culture pure.

Production de glycérol:

En augmentant la concentration initiale d'azote assimilable, on observe une diminution de la concentration finale en glycérol produite par *T. delbrueckii* (12,4 vs 10,3 g/L). La concentration de finale en glycérol produite par *S. cerevisiae* n'est pas significativement modifiée (6,8 vs 8,3 g/L). Dans les deux milieux de culture, *T. delbrueckii* produit plus de glycérol que *S. cerevisiae*.

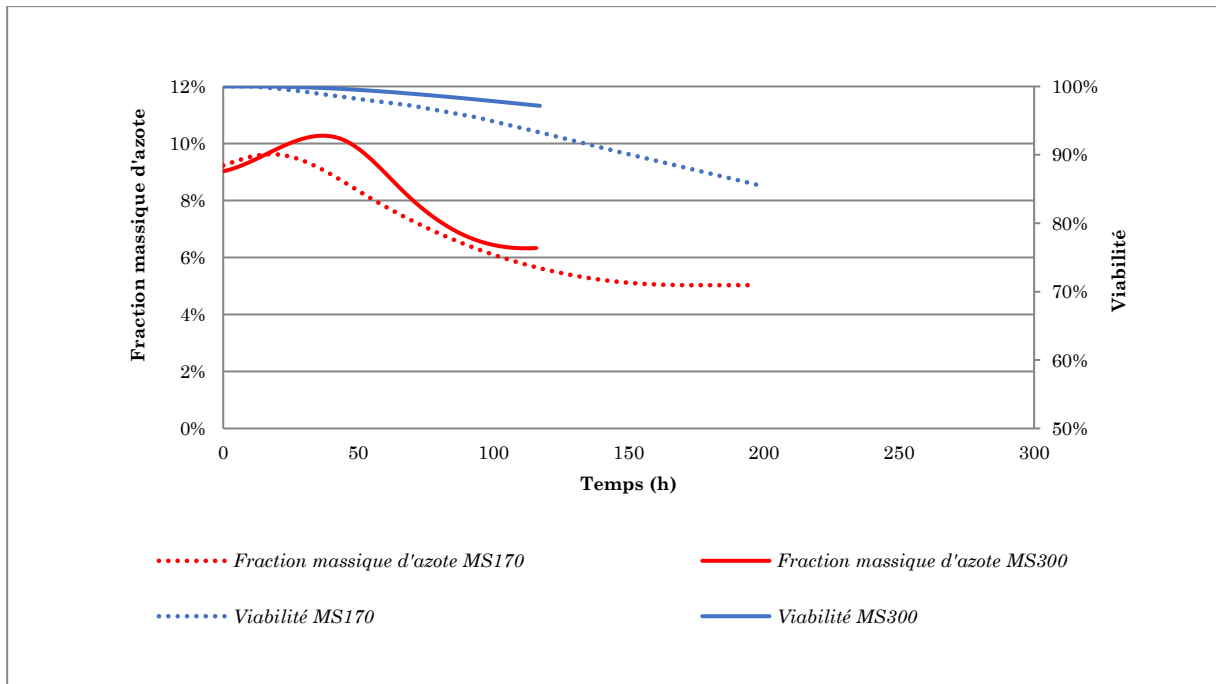


Figure 27 Profils de viabilité et de fraction massique d'azote dans un culot sec au cours des cultures pures de *S. cerevisiae* en anaérobiose non stricte.

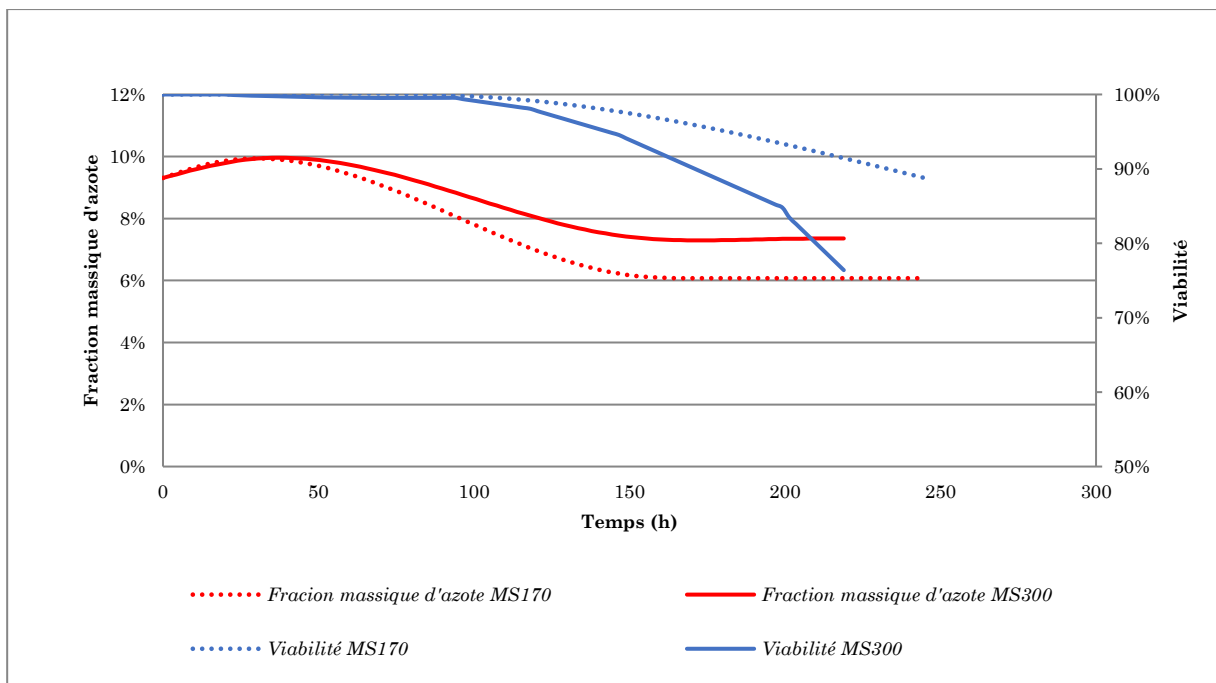


Figure 28 Profils de viabilité et de fraction massique d'azote dans un culot sec au cours des cultures pures de *T. delbrueckii* en anaérobiose non stricte.

Azote assimilé:

Plus la quantité initiale d'azote assimilable est élevée, plus le contenu cellulaire en azote est important (Figure 27 et Figure 28). En effet, en passant du milieu MS170 à MS300, on observe une augmentation de la fraction massique d'azote dans un culot sec de *S. cerevisiae* (de 5,0 à 6,3%) et de *T. delbrueckii* (de 6,1 à 7,3%) dosé en fin de fermentation.

Viabilité

En observant les profils de viabilité de *S. cerevisiae* (Figure 27), on constate que la fermentation est effectuée avec une viabilité plus importante en milieu MS300. Une plus grande viabilité de *S. cerevisiae* est donc associée à une fraction cellulaire d'azote plus grande. Néanmoins, une exposition plus courte à de fortes concentrations en éthanol pourrait expliquer cette augmentation de viabilité. En observant les profils de viabilité de *T. delbrueckii* (Figure 28), on constate que la fermentation est effectuée avec une viabilité moins importante en milieu MS300. Contrairement à *S. cerevisiae*, une plus grande viabilité de *T. delbrueckii* est donc associée à une fraction cellulaire d'azote plus faible. Ceci pourrait s'expliquer par la production d'éthanol ou l'épuisement des sucres observés plus rapidement en milieu MS300.

Les caractéristiques des fermentations permettant d'évaluer l'influence de la concentration initiale d'azote assimilable sont regroupées dans le Tableau 13.

Tableau 13 Influence la concentration d'azote assimilable sur les cultures pures

Milieu	Culture pure <i>S. cerevisiae</i>		Culture pure <i>T. delbrueckii</i>	
	MS170	MS300	MS170	MS300
<b>Maximum de cellules vivantes (10<sup>6</sup>cellules/mL)</b>	240 ±10	281 ±13	420 ± 20	542 ± 53
<b>Sucres initiaux (g/L)</b>	221 ± 3	222 ± 1	218 ± 1	222 ± 2
<b>Ethanol final (g/L)</b>	101,7 ± 2,6	108,0 ± 1,3	96,4 ± 2,6	107,6 ± 1,1
<b>Rendement éthanol/sucres (g/g)</b>	0,46 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,48 ± 0,01
<b>Temps de fermentation (h)</b>	197 ± 11	117 ± 7	245 ± 11	218 ± 7
<b>Vitesse moyenne de consommation de sucres (g/L/h)</b>	1,13 ± 0,04	1,90 ± 0,02	0,91 ± 0,02	1,01 ± 0,01
<b>Azote assimilable résiduel (mg N/L)</b>	0	0	0	8,7 ± 2,5
<b>Glycérol (g/L)</b>	6,8 ± 0,3	8,3 ±0,4	12,4 ± 0,4	10,3 ±0,1
<b>Fraction d'azote dans la biomasse en fin de fermentation</b>	5,2 %	6,9 %	6,1 %	7,3 %
<b>Viabilité finale</b>	86 %	97%	89 %	76 %

Moyenne de deux expériences ± écart-type

L'influence de la concentration initiale d'azote assimilable sur les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* a été étudiée en anaérobiose non stricte. D'une part, l'azote assimilable favorise la croissance des deux levures. Ces résultats confirment l'importance des éléments azotés pour la croissance mentionnée dans de nombreux travaux de recherche (Henschke et Jiranek, 1993; Taillandier *et al.*, 2007; De Koker, 2015). D'autre part, l'azote assimilable améliore la vitesse d'absorption des sucres des deux levures. Ces résultats concordent avec les travaux de Bely et al., (1994), dans lesquels une addition d'azote



assimilable améliorerait le transport des hexoses au cours de fermentation œnologique de *S. cerevisiae*.

### III. Impact de l'anaérobiose stricte

Les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont été réalisées avec le milieu MS300 selon deux modalités différentes. La première modalité se déroule en anaérobiose non stricte dans le réacteur décrit dans Matériel et Méthodes I.3.2. La seconde modalité se déroule en anaérobiose stricte dans le BRM avec une surpression alternée d'azote.

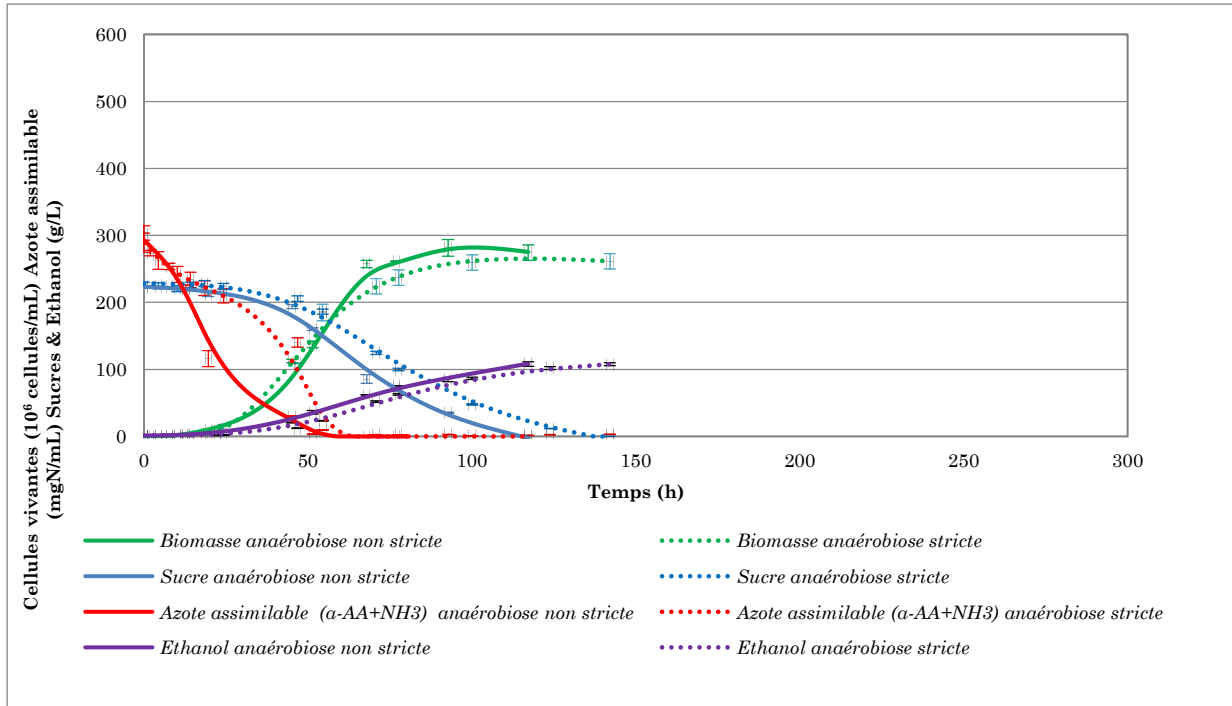


Figure 29 Anaérobiose stricte et non stricte: profils de croissance, de consommation de sucre, d'assimilation d'azote et de production d'éthanol au cours des cultures pures *S. cerevisiae*. Les barres représentent l'écart moyen observé sur deux répétitions.

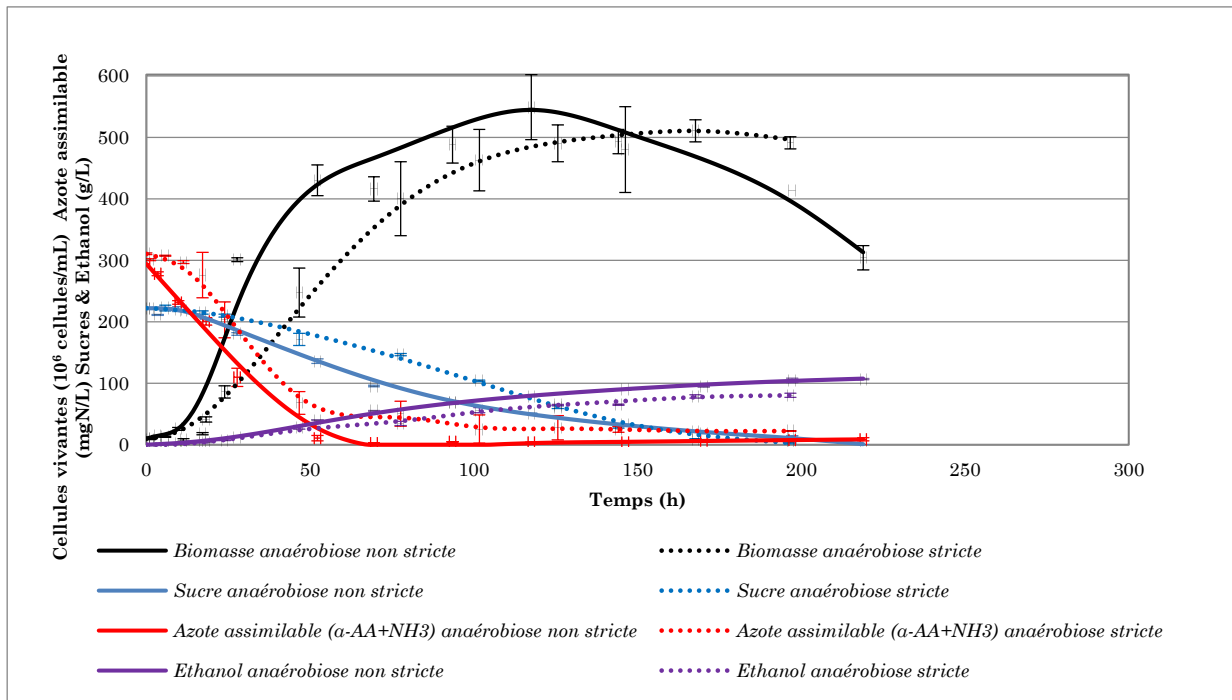


Figure 30 Anaérobiose stricte et non stricte: profils de croissance, de consommation de sucre, d'assimilation d'azote et de production d'éthanol au cours des cultures pures *T. delbrueckii*. Les barres représentent l'écart moyen observé sur deux répétitions.

Croissance des levures:

Les profils de croissance de *S. cerevisiae* observés dans les deux conditions opératoires sont quasiment similaires (Figure 29). La croissance de *S. cerevisiae* n'est pas influencée par l'absence initiale d'oxygène. En revanche, les profils de croissance de *T. delbrueckii* des deux modalités sont différents (Figure 30). En effet, la vitesse de croissance est moins importante en anaérobiose stricte. La croissance de *T. delbrueckii* est donc affectée par le manque d'oxygène alors que celle de *S. cerevisiae* ne l'est pas. Malgré une vitesse de croissance plus faible en anaérobiose stricte, *T. delbrueckii* atteint une population maximale comparable à celle observée en anaérobiose non stricte.

Consommation de sucre:

Bien que les profils de population soient semblables, la vitesse moyenne de consommation de sucre de *S. cerevisiae* est moins importante en anaérobiose stricte (1,58 vs 1,90 g/L/h) (Tableau 14). Les capacités de la *S. cerevisiae* à absorber le sucre sont donc affectées par le manque initial d'oxygène. En observant les 80 premières heures de fermentation, on constate que *T. delbrueckii* consomme plus de sucre en anaérobiose non stricte. Cette condition expérimentale présente une population plus importante que l'anaérobiose stricte après 80 h de fermentation. Néanmoins, en dépit d'une croissance moins rapide en anaérobiose stricte, la vitesse moyenne de consommation de sucre de *T. delbrueckii* est plus grande que celle observée en anaérobiose non stricte (1,12 vs 1,01 g/L/h) (Tableau 14).

Production d'éthanol et de glycérol:

Les concentrations finales en éthanol (108 g/L) et en glycérol (8 g/L) observées au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* dans les deux conditions opératoires sont équivalentes (Tableau 14). Dans les deux conditions opératoires, *T. delbrueckii* consomme l'entièreté du sucre et des concentrations finales en glycérol ( $\approx 10$  g/L) semblables sont atteintes (Tableau 14). Cependant, on observe une différence notable de l'utilisation du sucre par *T. delbrueckii*, dans la mesure où la fermentation en anaérobiose stricte ne produit que 80 g/L d'éthanol (vs 107 g/L en anaérobiose non stricte).

Assimilation d'azote:

Pour les deux levures, on constate que les cinétiques d'assimilation d'azote sont moins rapides en anaérobiose stricte (Figure 29 et Figure 30). Le manque d'oxygène initial ralentit donc l'assimilation d'azote. Dans les fermentations réalisées par *S. cerevisiae*, la totalité de l'azote assimilable disponible est consommée dans les deux conditions opératoires. En revanche, *T. delbrueckii* n'est pas capable d'assimiler tout l'azote disponible en anaérobiose stricte, une concentration résiduelle de 22 mg N/L subsiste (Figure 30). En anaérobiose non stricte, *T. delbrueckii* assimile totalement l'azote du milieu puis, on observe une augmentation de l'azote du milieu qui atteint 9 mg N/L en fin de fermentation.

Viabilité:

En fin de fermentation, *S. cerevisiae* présente une importante viabilité de 97%. Celle-ci, ne change pas selon les conditions opératoires. Pour *T. delbrueckii*, on observe que la viabilité en fin de fermentation est plus élevée en anaérobiose stricte (92% vs 76 %).

Les caractéristiques des fermentations permettant de comparer l'impact des conditions opératoires sont regroupées dans le Tableau 14.

Tableau 14 Influence des conditions opératoires sur les cultures pures: anaérobiose stricte et non stricte

	Culture pure <i>S. cerevisiae</i>		Culture pure <i>T. delbrueckii</i>	
	Anaérobiose Non stricte	Anaérobiose Stricte	Anaérobiose Non stricte	Anaérobiose Stricte
<b>Maximum de cellules vivantes (10<sup>6</sup> cellules/mL)</b>	281 ±13	262 ± 27	542 ± 53	510 ± 9
<b>Sucres initiaux (g/L)</b>	222 ± 1	225 ± 4	222 ± 2	222 ± 4
<b>Ethanol final (g/L)</b>	108,0 ± 1,3	107,7 ± 1,3	107,6 ± 1,1	80,2 ± 1,2
<b>Rendement éthanol/sucres (g/g)</b>	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,35 ± 0,02
<b>Temps de fermentation (h)</b>	117 ± 7	142 ± 7	218 ± 7	197 ± 10
<b>Vitesse moyenne de consommation de sucres (g/L/h)</b>	1,90 ± 0,02	1,58 ± 0,03	1,01 ± 0,01	1,12 ± 0,02
<b>Azote assimilable résiduel (mg N/L)</b>	0	0	8,7 ± 2,5	22,3 ± 10,1
<b>Glycérol (g/L)</b>	8,3 ±0,4	7,9 ± 0,3	10,3 ±0,1	9,4 ± 0,2
<b>Viabilité finale</b>	97 %	97 %	76 %	92 %

Moyenne de deux expériences ± écart-type

Les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont été réalisées en milieu MS300 dans des conditions anaérobiques stricte et non stricte. Lorsqu'on passe de l'anaérobiose non stricte à l'anaérobiose stricte, la croissance de *T. delbrueckii* est affectée par le manque d'oxygène initial alors que celle de *S. cerevisiae* ne l'est pas. Similairement, Holm Hansen *et al.*, (2001) ont observé que *T. delbrueckii* était moins tolérante au manque d'oxygène que *S. cerevisiae*.

Comparée à l'anaérobiose non stricte, l'anaérobiose stricte entraîne une diminution de la vitesse moyenne de consommation de sucre de *S. cerevisiae*, sans changements significatifs des concentrations finales en éthanol et en glycérol. L'anaérobiose stricte entraîne une diminution considérable de la concentration finale en éthanol de *T. delbrueckii*. Cette production d'éthanol plus faible pourrait être la cause de la forte viabilité de *T. delbrueckii* observée en fin de fermentation en anaérobiose stricte.

Par ailleurs, l'anaérobiose stricte induit un ralentissement de l'assimilation d'azote des deux levures. *S. cerevisiae* assimile totalement l'azote disponible dans les deux conditions. En anaérobiose non stricte, *T. delbrueckii* assimile totalement l'azote du milieu, puis on observe une augmentation de l'azote du milieu en fin de fermentation. Celle-ci est associée à une faible viabilité. Un relargage d'éléments azotés successif à la lyse des levures peut être suspecté. Ce phénomène a été décrit par Alexandre *et al.*, (2001). En anaérobiose stricte, *T. delbrueckii* ne consomme pas entièrement l'azote assimilable disponible. Cette observation nous amène à faire l'hypothèse qu'en anaérobiose stricte, *T. delbrueckii* a des

carences nutritionnelles qui entraînent une assimilation d'azote incomplète. Les deux conditions expérimentales diffèrent de par leur concentration initiale d'oxygène dissous à l'instant initial. L'oxygène est indispensable à la synthèse de lipides insaturés. Une carence en lipides insaturés est donc suspectée.

#### IV. Influence des facteurs anaérobies

Les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont été réalisées avec les milieux MS300 et MS300M afin de déterminer l'impact des facteurs anaérobies sur la culture pure de chaque levure. Ces expériences ont été faites en anaérobiose stricte, dans un BRM. En passant du milieu MS300 au milieu MS300M, la quantité de facteurs anaérobies est doublée. Les concentrations d'ergostérol, d'acide oléique et de Tween 80 augmentent respectivement de 15 à 30 mg/L, de 443 à 886 µg/L et de 0,5 à 1 mL/L.

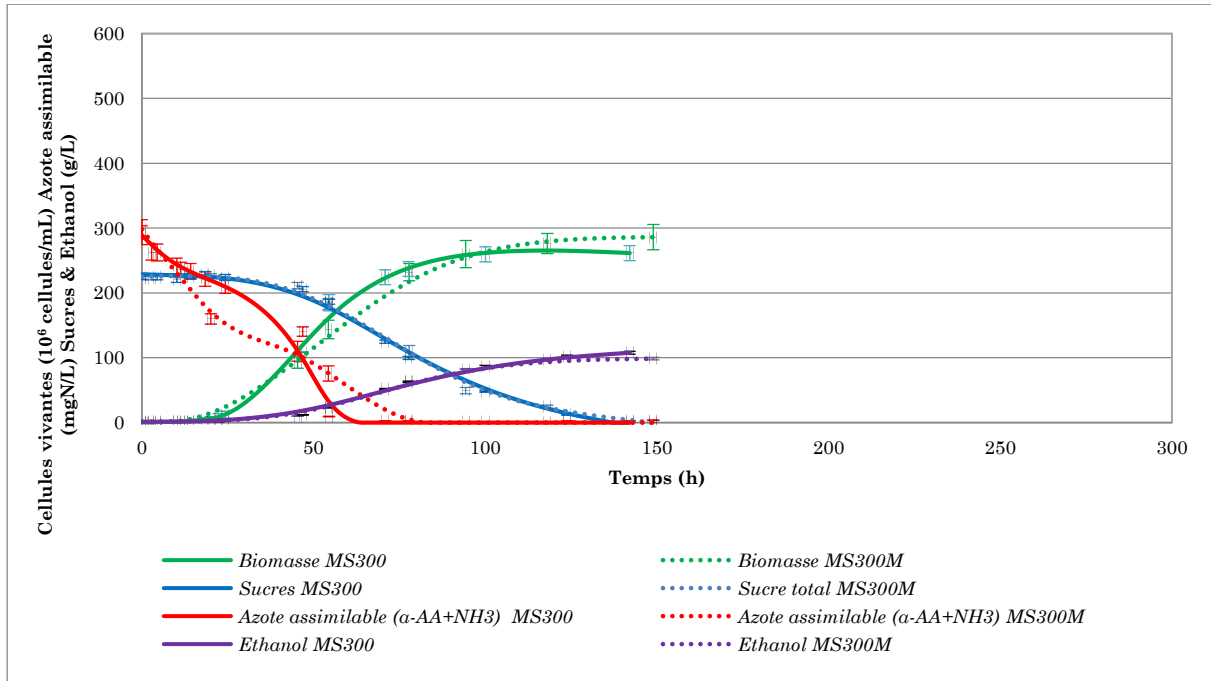


Figure 31 Influence de la concentration initiale des facteurs anaérobies sur la culture pure de *S. cerevisiae* en anaérobiose stricte. Les barres représentent l'écart moyen observé sur deux répétitions.

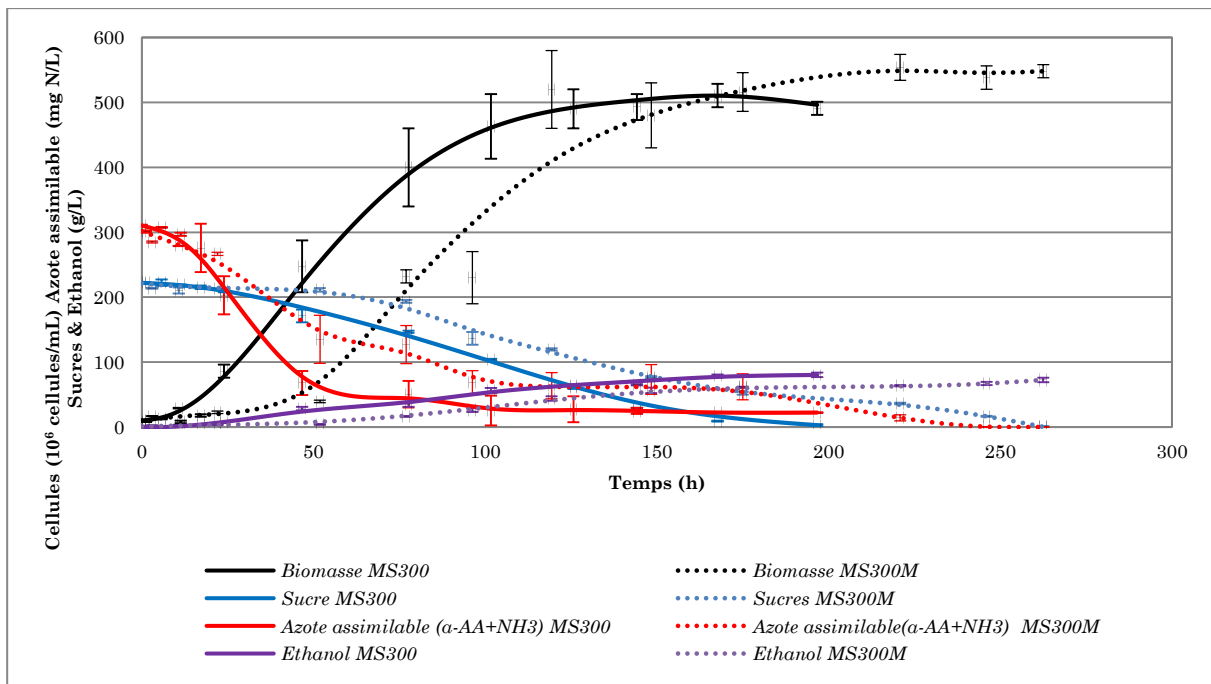


Figure 32 Influence de la concentration initiale des facteurs anaérobies sur la culture pure de *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte. Les barres représentent l'écart moyen observé sur deux répétitions.

Croissance des levures:

Les profils de croissance de *S. cerevisiae* en milieu MS300 et MS300M sont quasiment confondus (Figure 31). La concentration initiale de facteurs anaérobies n'a pas d'impact sur la croissance de *S. cerevisiae*. Lorsqu'on double la concentration initiale de facteurs anaérobies, on observe que la concentration maximale de cellules vivantes de *T. delbrueckii* n'est pas modifiée. Cependant, la phase de latence est prolongée d'environ 40 heures (Figure 32).

Assimilation d'azote:

*S. cerevisiae* consomme complètement l'azote disponible en milieu MS300 et MS300M. Entre les deux milieux de cultures, le temps nécessaire pour assimiler totalement l'azote disponible n'est pas significativement différent. En observant les profils d'assimilation d'azote de *T. delbrueckii* (Figure 32), on constate que l'assimilation d'azote est plus rapide en milieu MS300. En doublant la concentration initiale de facteurs anaérobies, l'assimilation d'azote est certes plus lente, mais elle est complète.

Consommation de sucres:

Les vitesses moyennes de consommation de sucre de *S. cerevisiae* sont de 1,58 et de 1,51 g/L/h respectivement dans les milieux MS300 et MS300M. L'augmentation de la concentration initiale de facteurs anaérobies n'a significativement pas d'impact sur l'absorption de sucre de *S. cerevisiae*. Contrairement, la prolongation de la phase de latence induite par l'augmentation de la concentration initiale de facteurs anaérobies, entraîne une diminution de la vitesse moyenne de consommation de sucre de *T. delbrueckii* de 1,12 à 0,84 g/L/h.

Production d'éthanol:

Les profils de production d'éthanol de *S. cerevisiae* observés dans les milieux MS300 et MS300M sont confondus et la concentration finale en éthanol est d'environ 100 g/L. Les concentrations finales en éthanol observées au cours des cultures pures de *T. delbrueckii* sont de 80 et 73 g/L respectivement en milieu MS300 et MS300M. L'augmentation de facteurs anaérobies ne modifie pas significativement la production d'éthanol des deux levures.

Glycérol:

La concentration finale en glycérol de *S. cerevisiae* est de 8 g/L dans les deux milieux de culture. L'augmentation de facteurs anaérobies n'a pas d'impact significatif sur la production de glycérol de cette levure. En revanche, elle entraîne une augmentation significative de la production de glycérol de *T. delbrueckii* qui passe de 9,4 à 15,5 g/L.

Viabilité:

Les viabilités en fin de fermentation de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en culture pure restent élevées et aucune différence significative n'a été observée entre les viabilités finales des milieux MS300 et MS300M (Tableau 15).

Les caractéristiques des fermentations permettant d'évaluer l'impact des facteurs anaérobies sur les cultures pures de levures sont regroupées dans le Tableau 15.

Tableau 15 Influence des facteurs anaérobies sur les cultures pures

Milieu	Culture pure <i>S. cerevisiae</i>		Culture pure <i>T. delbrueckii</i>	
	MS300	MS300M	MS300	MS300M
Maximum de cellules vivantes (10 <sup>6</sup> cellules/mL)	262 ± 27	286 ± 19	510 ± 9	554 ± 20
Sucres initiaux (g/L)	225 ± 4	225 ± 3	222 ± 4	221 ± 1
Ethanol final (g/L)	107,7 ± 1,3	98,6 ± 2,1	80,2 ± 1,2	72,6 ± 3,4
Rendement éthanol/sucres (g/g)	0,48 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,32 ± 0,02
Temps de fermentation (h)	142 ± 7	149 ± 8	197 ± 10	263 ± 8
Vitesse moyenne de consommation de sucres (g/L/h)	1,58 ± 0,03	1,51 ± 0,02	1,12 ± 0,02	0,84 ± 0,01
Azote assimilable résiduel (mg N/L)	0	0	22,3 ± 10,1	0
Glycérol (g/L)	7,9 ± 0,3	8,2 ± 0,3	9,4 ± 0,2	15,5 ± 0,4
Viabilité finale	97 %	91 %	92 %	89 %

Moyenne de deux expériences ± écart-type

Des cultures pures de *S. cerevisiae* et de *T. delbrueckii* ont été réalisées dans les milieux MS300 et MS300M afin d'évaluer l'influence des facteurs anaérobies en conditions anaérobiques strictes. Au cours des cultures pures de *S. cerevisiae*, l'augmentation de la concentration initiale de facteurs anaérobies n'entraîne pas de changements significatifs du nombre maximum de cellules vivantes, de la vitesse moyenne de consommation de sucre et les concentrations finales en éthanol et en glycérol. Dans la gamme de concentrations testées, l'augmentation de facteurs anaérobies n'a pas d'effet sur le comportement de *S. cerevisiae*.

En revanche, lors des cultures pures de *T. delbrueckii*, doubler la concentration initiale de facteurs anaérobies engendre une prolongation de la phase de latence de 40 h. *T. delbrueckii* semble avoir des difficultés à initier sa croissance en milieu MS300M. De plus, la concentration finale de glycérol augmente de 65% lorsqu'on double la concentration initiale de facteurs anaérobies. La production glycérol permet de réduire le stress osmotique et de maintenir l'équilibre d'oxydoréduction. Cette importante augmentation témoigne des difficultés de *T. delbrueckii* à croître dans le milieu MS300M. Bien que la phase de latence soit plus longue en milieu MS300M, la concentration maximale de cellules vivantes de *T. delbrueckii* n'est pas significativement différente de celle obtenue en milieu MS300. En anaérobiose stricte, *T. delbrueckii* consomme tout le sucre avec de faibles rendements en éthanol (<0,35). L'augmentation de facteurs anaérobies n'a pas d'influence significative sur la concentration finale d'éthanol produit par *T. delbrueckii*.



En milieu MS300, *T. delbrueckii* ne parvient pas à consommer tout l'azote assimilable disponible. L'hypothèse d'une carence en lipides insaturés a été émise pour expliquer cette assimilation incomplète d'azote. Le milieu MS300M contient deux fois plus de lipides insaturés (ergostérol, acide oléique et tween 80) que le milieu MS300. En doublant la concentration initiale de facteurs anaérobies, pendant les 50 premières heures de fermentation on observe une faible absorption d'azote probablement due au faible nombre de cellules vivantes de *T. delbrueckii* durant la phase de latence prolongée. Puis, *T. delbrueckii* croit et parvient à complètement consommer l'azote assimilable. Ces résultats confortent ainsi l'hypothèse d'une carence en lipides insaturés qui ne permet pas une absorption complète de l'azote assimilable disponible.

## V. Analyse du bilan carbone

Le bilan carbone a été suivi lors des cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Le carbone se répartit essentiellement dans la biomasse, le sucre, l'éthanol, le glycérol et le dioxyde de carbone. La concentration en dioxyde de carbone est estimée en considérant que ce dernier est produit avec la même stœchiométrie que l'éthanol durant la fermentation. Une partie du carbone ne se trouve pas dans les composés précédemment cités, il s'agit de la fraction indéterminée de carbone. Elle est calculée en soustrayant le carbone constituant les composés considérés à un instant au carbone présent à l'instant initial. Les valeurs de fraction indéterminée de carbone à l'instant final sont présentées dans Tableau 16.

Tableau 16 Fraction indéterminée de carbone à l'instant final lors des cultures pures

Milieu	Anaérobiose non stricte		Anaérobiose Stricte	
	MS170	MS300	MS300	MS300M
<i>S. cerevisiae</i>	3 %	0 %	1 %	10 %
<i>T. delbrueckii</i>	6 %	0 %	20 %	25 %

Au regard des erreurs expérimentales et vu que tous les composés carbonés éventuels n'ont pas été dosés (esters, alcools supérieurs...): les fractions indéterminées de carbone inférieures ou égale à 10% sont considérées comme négligeables. L'ensemble des fermentations de *S. cerevisiae* présentent des fractions indéterminées de carbone négligeables à l'instant final. Il en est de même pour les fermentations de *T. delbrueckii* en milieu anaérobique non strict.

En anaérobiose stricte, les cultures pures de *T. delbrueckii* en milieu MS300 et MS300M présentent une fraction indéterminée de carbone supérieure à 20%. Cela signifie qu'une concentration de sucre supérieure à 44 g/L a été absorbée et a servi à produire des composés autres que de la biomasse, du glycérol et de l'éthanol. Ces résultats nous incitent à analyser la cinétique du bilan carbone en anaérobiose stricte (Figure 33). La fraction indéterminée de carbone augmente progressivement au cours des fermentation de *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte (Figure 33c et d). Le déséquilibre du bilan carbone apparaît après 100 h de fermentation. Ces résultats surprenants nous ont conduit à faire 6 répétitions de la culture pure de *T. delbrueckii* en milieu MS300. Toutes les répétitions avaient un déséquilibre progressif du bilan carbone qui commençait après 100 heures de fermentation et le suivi de l'évolution des levures au microscope ne suggérait aucune contamination.

Comparée à l'anaérobiose non stricte, l'anaérobiose stricte entraîne une modification de l'utilisation du sucre par *T. delbrueckii*. Des investigations devraient être menées pour comprendre les mécanismes sous-jacents à cette modification. Les éventuels composés produits ne sont pas les acides citrique, malique, succinique et acétique dans la mesure où aucune variation significative de ces acides n'a été observée. Le CO<sub>2</sub> est supposé produit de façon équimolaire à la production d'éthanol. Tout mécanisme produisant du CO<sub>2</sub> autrement que par voie fermentaire pourrait causer l'apparition de telles fractions indéterminées de carbone. Cependant il n'y avait ni oxygène ni éléments accepteurs d'électrons en quantité suffisante pour oxyder des concentrations en sucre aussi importantes.

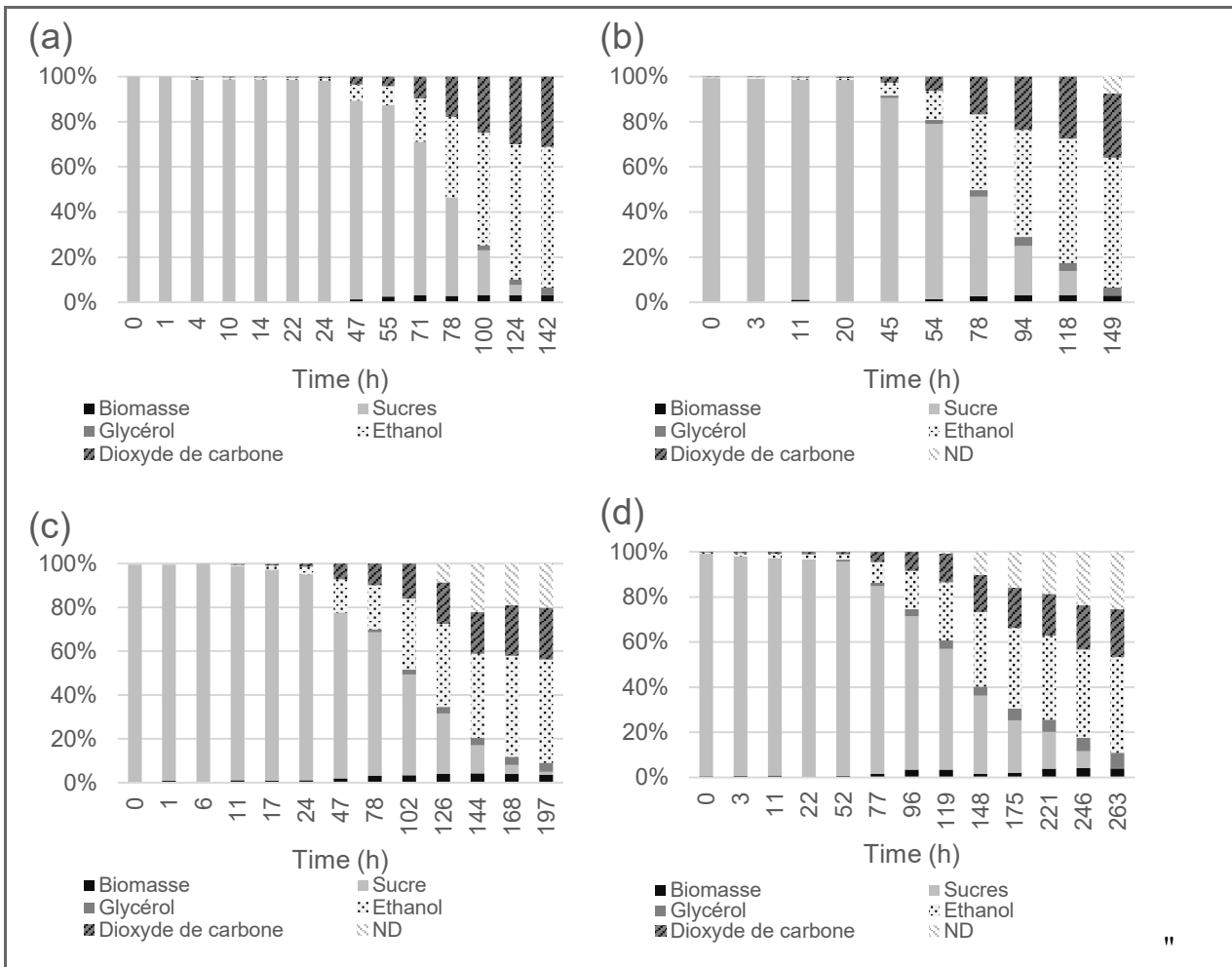


Figure 33 Répartition du carbone en culture pure: *S. cerevisiae* en milieu MS300 (a) et MS300M (b) and *T. delbrueckii* en milieu MS300 (c) et MS300M (d). ND représente la fraction de carbone non déterminée.

## VI. Conclusion

Ce chapitre rend compte des résultats obtenus au cours d'expériences dont l'objectif était de quantifier l'influence de trois paramètres opératoires sur les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Il s'agissait de la concentration initiale en azote assimilable, du passage d'un environnement anaérobique non strict à un environnement anaérobique strict et de la concentration initiale en facteurs anaérobies.

L'azote assimilable, en favorisant la croissance cellulaire, en améliorant les vitesses d'absorption des sucres et de production d'éthanol, a des effets semblables sur les deux espèces. L'augmentation de la concentration initiale en azote assimilable a donc permis de lever une limitation nutritionnelle.

L'impact de l'anaérobiose stricte et des facteurs anaérobies sont inhérents à chaque espèce. En effet l'anaérobiose stricte induit une diminution de la vitesse de consommation du sucre de *S. cerevisiae* alors qu'elle entraîne une diminution importante de la quantité d'éthanol produite par *T. delbrueckii* ainsi qu'une consommation incomplète de l'azote assimilable.

Les lipides exogènes ont permis de compenser l'absence d'oxygène lors de la culture de *S. cerevisiae* en anaérobiose stricte, permettant ainsi une consommation complète des substrats. L'assimilation incomplète d'azote par *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte reflète une limitation nutritionnelle: la concentration en lipides exogènes n'est pas suffisante pour pallier au manque d'oxygène.

En anaérobiose stricte, l'augmentation de facteurs anaérobies n'a pas d'influence sur le comportement de *S. cerevisiae*. En revanche, elle induit la prolongation de la phase de latence de *T. delbrueckii* ainsi qu'une consommation complète de l'azote assimilable disponible. Cela conforte l'hypothèse de limitation nutritionnelle mentionnée dans le paragraphe précédent. Toutefois, *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont des comportements différents vis-à-vis des lipides exogènes. Les causes de cette différence pourraient s'expliquer par la différence de composition des membranes des deux levures

L'ensemble des résultats obtenus en culture pure est synthétisé dans l'annexe 3. Ces résultats constituent la base de l'analyse des cultures mixtes présentée dans le chapitre II et les fondements de la modélisation des cultures pures exposée dans le chapitre III.

## **CHAPITRE II: CULTURES MIXTES DE LEVURES**

---

" Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes,  
mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements "

*Charles Darwin*

## I. Objectifs

---

Avec l'intérêt croissant pour les cultures mixtes de levures, l'impact sur les interactions microbiennes de plusieurs facteurs tels que l'oxygène (Holm Hansen *et al.*, 2001), l'azote (Taillandier *et al.*, 2014), le ratio d'inoculation (Pommier *et al.*, 2005), le pH (Ramon-Portugal, 1995) et la température (Salvadó *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2015) ont fait l'objet d'études.

Le rôle des lipides ou facteurs anaérobies sur les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* est documenté dans la littérature (Mauricio *et al.*, 1990, 1991; Rozès, 1992; Deytieux *et al.*, 2005; Redón *et al.*, 2009). Toutefois leurs influences sur les interactions microbiennes n'ont pas été étudiées à notre connaissance.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons réalisé des expérimentations pour quantifier l'influence des facteurs anaérobies sur les cultures mixtes de levures. Ces fermentations ont été effectuées dans le BRM, en présence et en absence de membrane pour observer l'influence des facteurs anaérobies sur les interactions directes et indirectes entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Ce chapitre présente les résultats obtenus lors de cette étude sous forme d'extraits d'un article publié dans le journal European Food Research and Technology (Brou *et al.*, 2018).

Les expériences mentionnées dans cet article ont été réalisées en anaérobiose stricte et les termes AGF, SCF, CCF et MCF respectivement les facteurs de croissances anaérobies (lipides exogènes), les cultures pures, les cultures mixtes compartimentées et les cultures mixtes mélangées.

## II. Cultures mixtes de levures en anaérobiose stricte

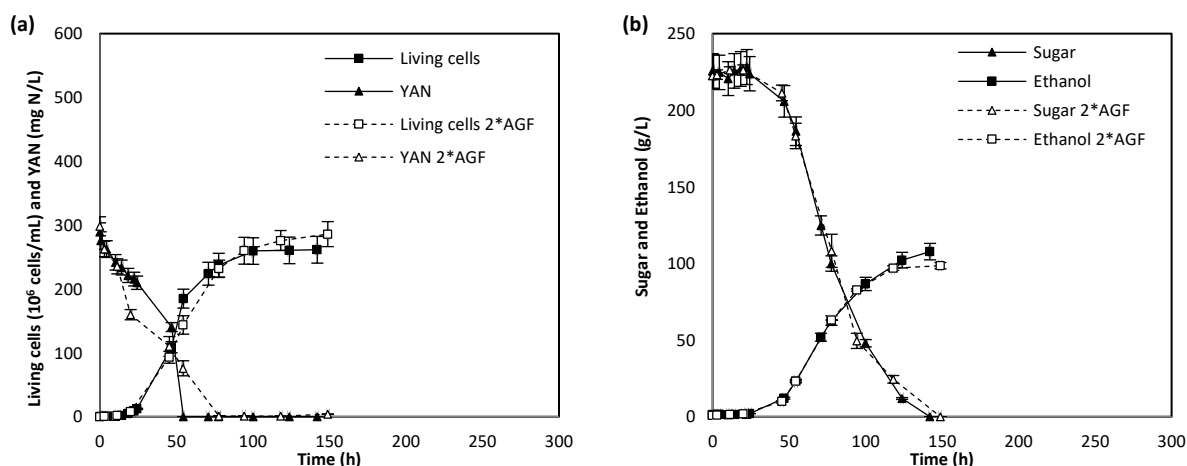
### European Food Research and Technology

Mixed culture fermentation using *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* with direct and indirect contact: Impact of anaerobic growth factors.

Paul Brou, Patricia Taillandier, Sandra Beaufort, Cédric Brandam  
 Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS,  
 Toulouse, France

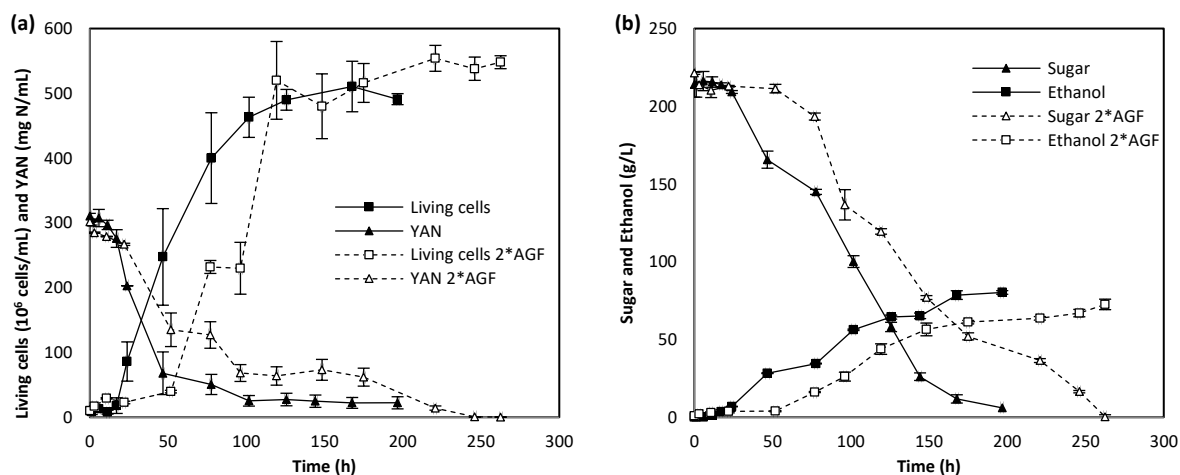
### 1. Results

#### 1.1. Effect of anaerobic growth factors (AGF) on single culture fermentation (SCF)



**Fig. 1** Effect of increase in anaerobic growth factors on *S. cerevisiae* SCF: (a) Living cells and YAN profiles, (b) sugar and ethanol profiles. Vertical bars represent the standard deviations

SCFs were performed in MS300 and MS300M. AGF augmentation did not modify *S. cerevisiae* growth, sugar uptake or ethanol production profiles (Fig. 1a and b). Moreover, the final glycerol concentrations were similar ( $\approx 8$  g/L). In the range tested, an increase of AGF had no significant impact on *S. cerevisiae* behaviour in anaerobic fermentation.



**Fig. 2** Effect of growth anaerobic factors increase on *T. delbrueckii* SCF: (a) Living cells and YAN profiles, (b) sugar and ethanol profiles. Vertical bars represent the standard deviations

Unexpectedly, an AGF increase induced an extension of the *T. delbrueckii* latency phase up to 50 hours (Fig. 2a). The resulting sugar consumption and ethanol production were slower than those observed in SCF with AGF single dose (Fig. b). In MS300, *T. delbrueckii* did not completely consume the YAN. After AGF increase, despite the slow YAN assimilation, no residual nitrogen compound was observed (Fig. 2a). In *T. delbrueckii* SCF, such AGF augmentation induced a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the final glycerol concentration from 9.4 to 15.5 g/L. In both media, *S. cerevisiae* fermentation time was shorter than that of *T. delbrueckii*, in accordance with several studies on this specific pair of yeasts [4, 11].

## 1.2. Co-cultures with a single dose of anaerobic growth factors

SCFs, MCFs and CCFs were performed in MS300. In all conditions, the maximum concentration of living *S. cerevisiae* cells was close to 280 10<sup>6</sup> cells/mL (Fig. 3a). The presence of *T. delbrueckii* did not impact the maximum population reached by *S. cerevisiae*. Regarding the first 50 h in SCF and CCF, *S. cerevisiae* growth rates were similar to and lower than those in MCF (Fig. 3a). Consequently, direct contact stimulated *S. cerevisiae* growth whereas indirect contact did not. Compared to SCF, the maximum population and the final viability of *T. delbrueckii* were lower in CCF. In CCF, between 50 and 100 h, the number of *T. delbrueckii* living cells decreased by 48 % (Fig. 3a). *S. cerevisiae* therefore had an indirect toxic action on *T. delbrueckii*. Such a significant decrease ( $p < 0.05$ ) was associated with a stable viability (Fig. 3e).

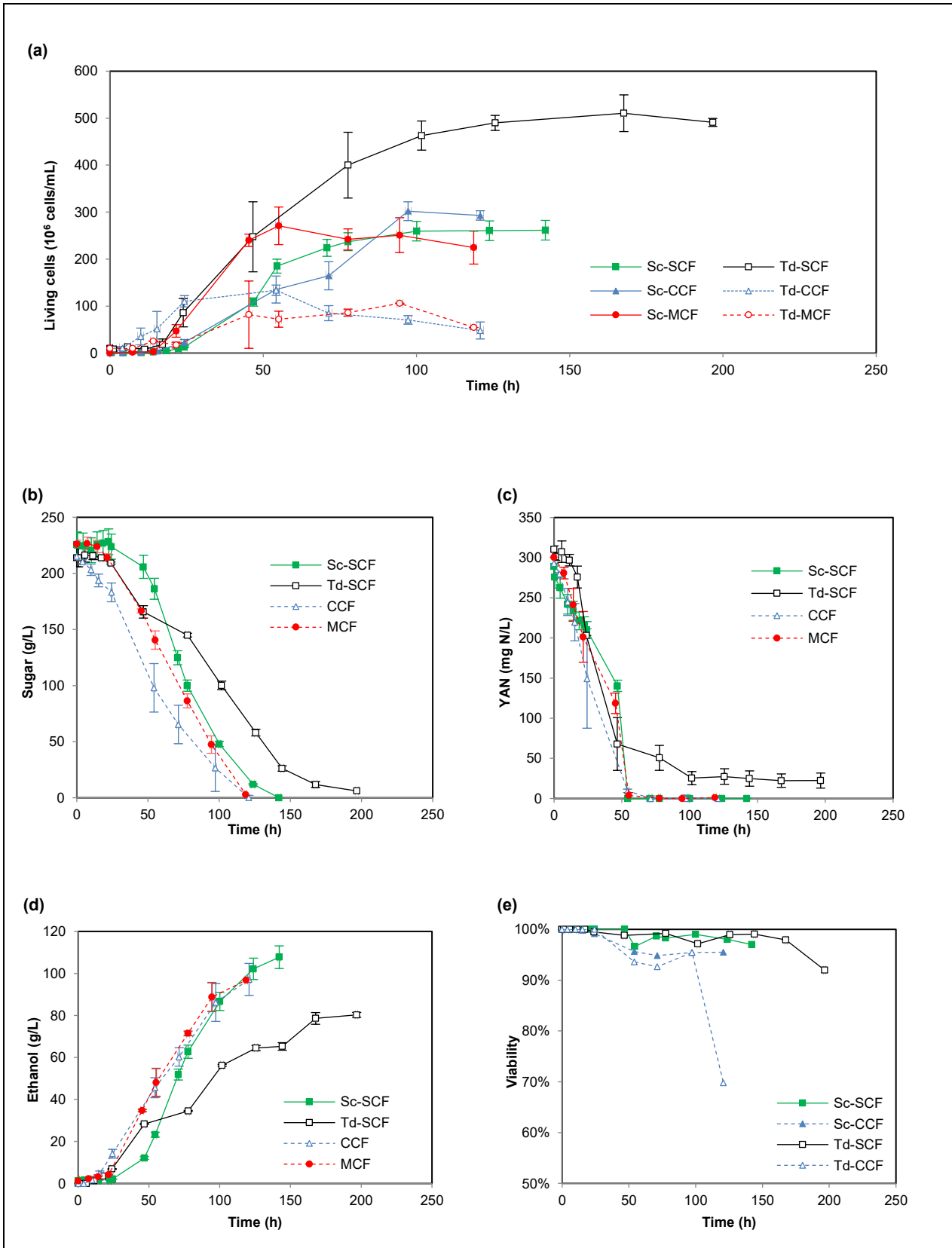
The maximum number of living *T. delbrueckii* cells reached 510, 133 and 106 10<sup>6</sup> cells/mL in SCF, CCF and MCF, respectively (Table 1). *S. cerevisiae* presence therefore induced a drastic reduction of the *T. delbrueckii* maximum population. Nevertheless, no significant differences were observed between direct and indirect contact ( $p > 0.05$ ). Consequently, *S. cerevisiae* did not perform any cell-to-cell contact. Despite the initial *T. delbrueckii* population being 20 times higher, *S. cerevisiae* living cells became predominant after 55 and 21 h in CCF and MCF, respectively. Physical contact thus promoted *S. cerevisiae* domination in MS300.

At the very end of the fermentation, with high ethanol level and sugar impoverishment, in CCF, *T. delbrueckii* viability fell sharply to 70% (Fig. 3e), that of *S. cerevisiae* remained high



(95%), and only in MCF were aggregated stained cells observed. The aggregated, stained cells were smaller than the scattered, unstained cells.

Compared to SCFs, sugar was consumed faster in co-culture (Fig. 3b and Table 1). Fermentation time observed in CCF and MCF were not significantly different ( $p>0.05$ ). Except in *T. delbrueckii* SCF, YAN was completely consumed in less than 60 h (Fig. 3c). Ethanol concentrations reached in CCF, MCF and *S. cerevisiae* SCF were similar ( $\approx 100$  g/L) and significantly higher ( $p<0.05$ ) than that in *T. delbrueckii* SCF (80 g/L) (Fig. 3d). The characteristics of all fermentations performed in MS300 are summed up in Table 1.



**Fig. 3** Living cells (a), sugar (b), YAN (c), ethanol (d), and yeasts viability (e) profiles in SCF, CCF and MCF performed with MS300. Data are mean values of two fermentations. Vertical bars represent the standard deviations

**Table 1** Final parameters of fermentations performed in membrane bioreactor for single-culture fermentation (SCF) of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii*, mixed-culture fermentation (MCF) and compartmented-culture fermentation (CCF). Cultures were performed at 20 °C, 250 rpm with nitrogen flux in headspace of vessels, in MS300 medium

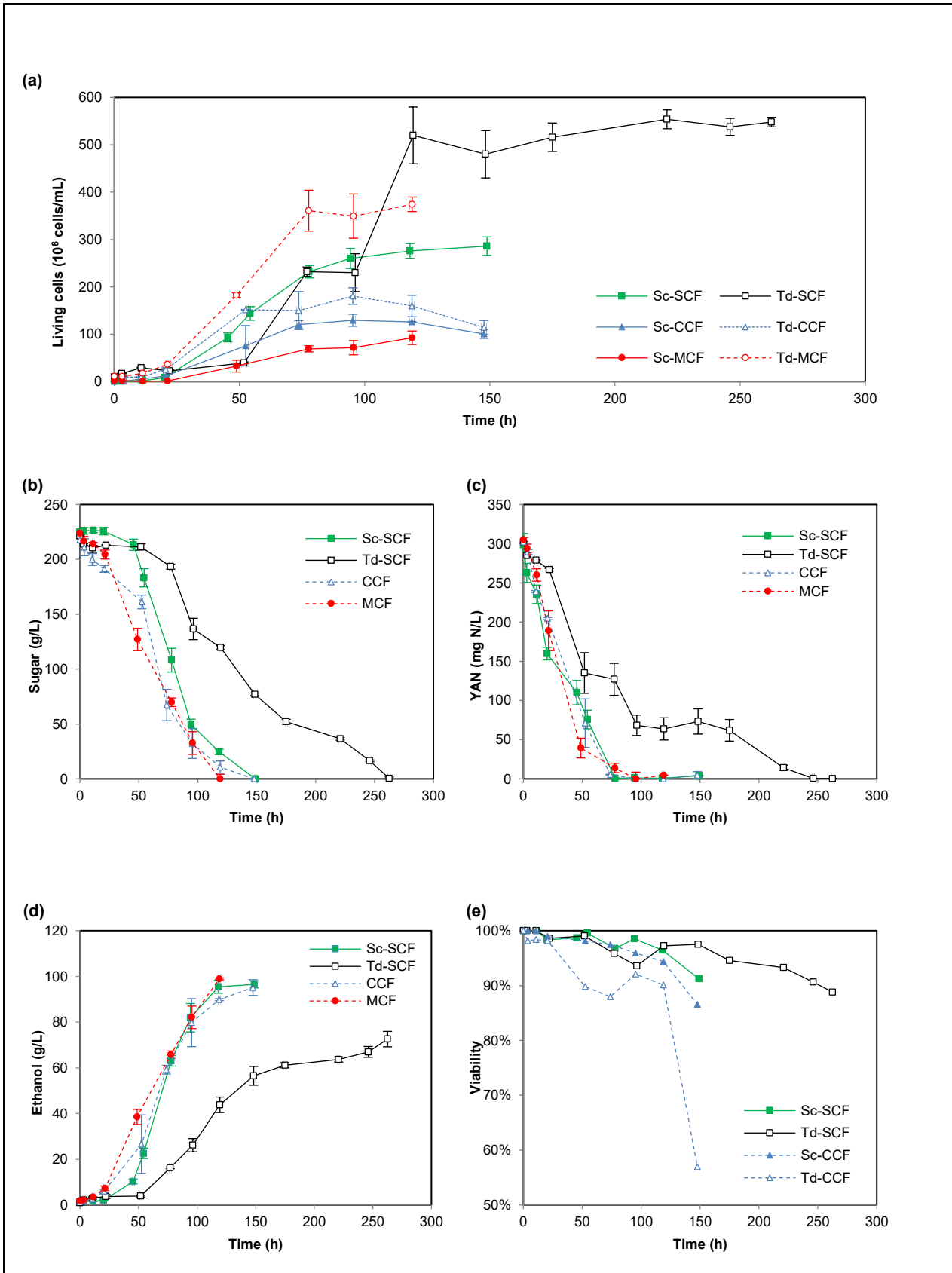
	SCF		CCF	MCF
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>		
Maximum living cells of <i>T. delbrueckii</i> (10 <sup>6</sup> cells/mL)	-	510 ± 9	133 ± 11	106 ± 1
Maximum living cells of <i>S. cerevisiae</i> (10 <sup>6</sup> cells/mL)	262 ± 27	-	302 ± 20	271 ± 40
Time of fermentation (h)	142 ± 7	197 ± 10	121 ± 7	118 ± 8
Initial sugar (g/L)	225 ± 4	222 ± 4	217 ± 3	226 ± 3
Mean sugar consumption rate (g/L/h)	1.58 ± 0.03	1.12 ± 0.02	1.79 ± 0.02	1.89 ± 0.03
Final ethanol (g/L)	107.7 ± 1.3	80.2 ± 1.2	97.1 ± 5.9	102.7 ± 0.8
Ethanol yield (g/g)	0.48 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.46 ± 0.01
Glycerol (g/L)	7.9 ± 0.3	9.4 ± 0.2	7.9 ± 0.7	7.9 ± 0.5
Final undetermined carbon fraction	1%	20%	5%	4%
Residual nitrogen (mg N/L)	0	22.3 ± 10	0	0

Values are means of two experiments ± standard deviation.

### 1.3. Co-cultures with a double dose of anaerobic growth factors

In MS300M, the maximum number of living *S. cerevisiae* cells reached 286, 129 and 61 10<sup>6</sup> cells/mL for SCF, CCF and MCF, respectively (Fig. 4a). *T. delbrueckii* presence thus considerably reduced the *S. cerevisiae* maximum population. *S. cerevisiae* growth was more impacted when both yeasts were in direct contact. Unlike in SCF, *T. delbrueckii* did not present any extended latency phase in co-cultures with a double dose of AGF. Compared to SCF, the maximum concentration of *T. delbrueckii* living cells was lower in co-cultures. It can thus be concluded that the presence of *S. cerevisiae* hindered *T. delbrueckii* growth. Regarding co-cultures, when the two yeasts were not separated, *T. delbrueckii* reached a higher maximum population and, in parallel, *S. cerevisiae* reached a lower maximum population (Fig. 4a). Moreover, for both yeasts, before 50 h of fermentation, the growth rate observed in CCF was not significantly different from that observed in MCF. Each yeast had a different maximum population, although YAN profiles in CCF and MCF were similar (Fig. 4c).

*S. cerevisiae* completed SCF faster than *T. delbrueckii*. Paradoxically, MCF, in which *T. delbrueckii* was preponderant, presented a higher mean sugar consumption rate than CCF (Fig. 4b). Direct contact thus enhanced the ability of the pair of yeasts to consume sugar. At the end of the CCF, *T. delbrueckii* viability suddenly fell and *S. cerevisiae* viability remained high - in the same way for CCF in MS300 (Fig. 3e and 4e). Nevertheless, no aggregation was observed in MCF in MS300M, unlike in MS300. The characteristics of all fermentations performed in MS300M are summed up in Table 2.



**Fig. 4** Living cells (a), sugar (b), YAN (c), ethanol (d), and yeasts viability (e) profiles in SCF, CCF and MCF performed with MS300M. Data are mean values of two fermentations. Vertical bars represent the standard deviations

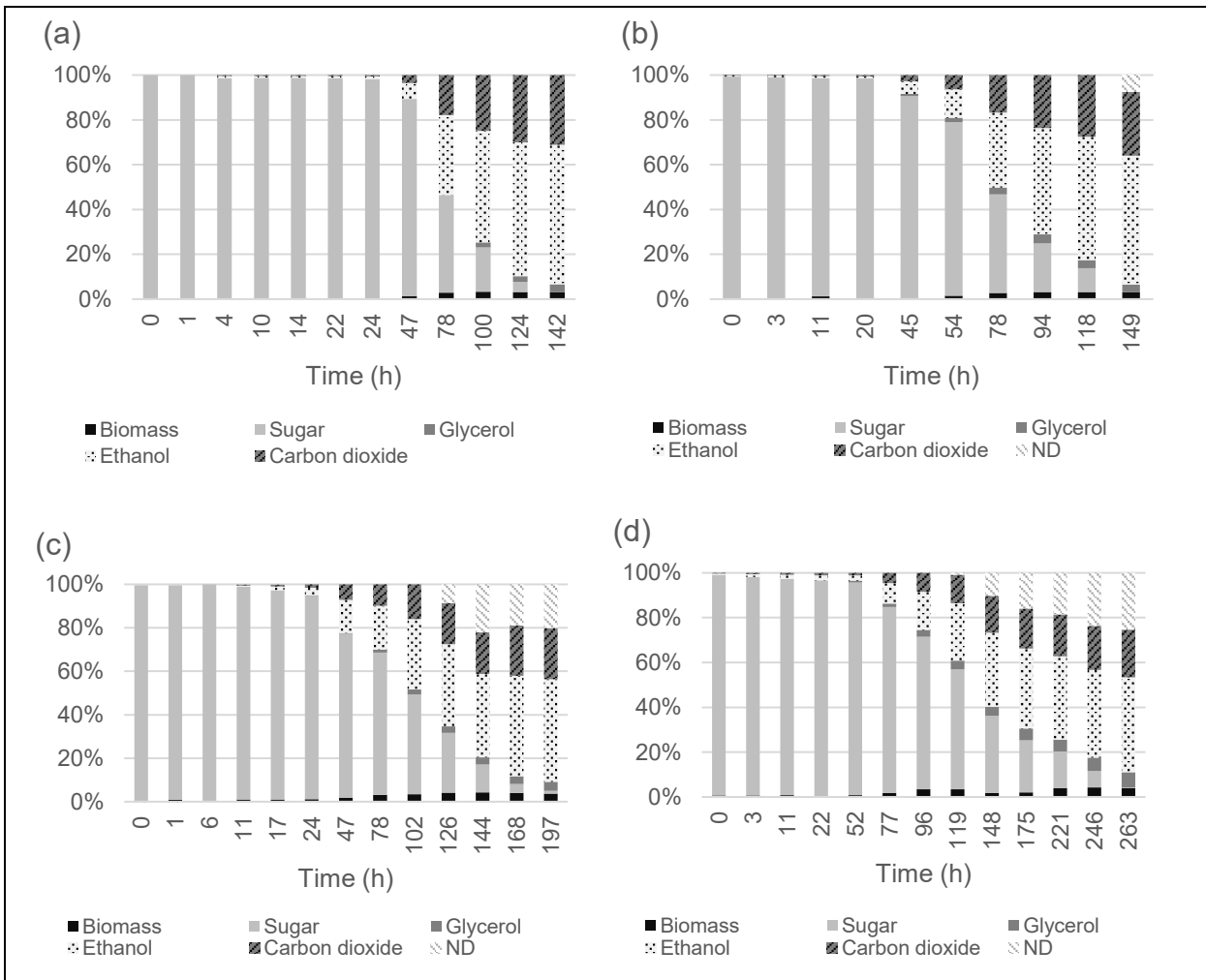
**Table 2** Final parameters of fermentations performed in membrane bioreactor for single-culture fermentation (SCF) of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii*, mixed-culture fermentation (MCF) and compartmented-culture fermentation (CCF). Cultures were performed at 20 °C, 250 rpm with nitrogen flux in headspace of vessels, in MS300M medium.

	SCF		CCF	MCF
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>		
Maximum living cells of <i>T. delbrueckii</i> (10 <sup>6</sup> cells/mL)	-	554 ± 20	181 ± 17	374 ± 16
Maximum living cells of <i>S. cerevisiae</i> (10 <sup>6</sup> cells/mL)	286 ± 19	-	129 ± 2	61 ± 15
Time of fermentation (h)	149 ± 8	263 ± 8	148 ± 1	119 ± 7
Initial sugar (g/L)	223 ± 3	221 ± 1	218 ± 3	224 ± 1
Mean sugar consumption rate (g/L/h)	1.50 ± 0.02	0.84 ± 0.01	1.47 ± 0.02	1.88 ± 0.01
Final ethanol (g/L)	98.6 ± 2.1	72.6 ± 3.4	95.1 ± 3.5	99.0 ± 0.4
Ethanol yield (g/g)	0.44 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.44 ± 0.01
Glycerol (g/L)	8.2 ± 0.3	15.5 ± 0.4	10.0 ± 0.6	11.6 ± 0.5
Final undetermined carbon fraction	7%	25%	8%	6%
Residual nitrogen (mg N/L)	0	0	4.7 ± 4.5	0

Values are means of two experiments ± standard deviation.

#### 1.4. Carbon balance

It should be stressed that CO<sub>2</sub> was not measured but its production was estimated by assuming the same stoichiometry as that of ethanol during fermentation. This assumption was adequate to describe co-cultures and *S. cerevisiae* SCFs (Fig. 55a and b). In *T. delbrueckii* SCFs, no unbalance was observed during a long fermentation period (≈ 100 h), then the carbon unbalance increased progressively until the end of the fermentation (Fig. 55c and d). Final carbon unbalances higher than 20% were observed in *T. delbrueckii* SCFs, with no significant differences observed between AGF doses (p>0.05).



**Fig. 5** Carbon mass partition in single culture fermentations. *S. cerevisiae* in MS300 (a) and MS300M (b) and *T. delbrueckii* in MS300 (c) and MS300M (d). ND represents the carbon fraction not determined

## 2. Discussion

In this work, SCF, CCF and MCF of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* were undertaken with different concentrations of anaerobic growth factors in order to evaluate their effect on interactions between yeasts. By doubling the AGF dose, ergosterol, oleic acid and Tween 80 concentrations rose from 15 to 30 mg/L, from 0.5 to 1  $\mu$ L/L and from 0.5 to 1 mL/L, respectively.

### 2.1. *T. delbrueckii* latency phase extension induced by AGF

A residual YAN concentration subsisted in *T. delbrueckii* SCF with a single dose of AGF. Since we suspected that a component in the medium was limiting, the dose of AGF was doubled to see whether *T. delbrueckii* could consume all the YAN available. After the increase of AGF initial concentration, *T. delbrueckii* could consume all the YAN available. However, *T. delbrueckii* displayed an extended latency phase after the AGF increase, suggesting that the raised AGF concentration was toxic for *T. delbrueckii* growth. The 65% increase in the final glycerol concentration confirms that *T. delbrueckii* cells were more

stressed after the AGF concentration was doubled. Unlike SCF, *T. delbrueckii* did not display any extended latency phase in co-cultures with a double dose of AGF. This result strongly suggests that *T. delbrueckii* absorbed a lower amount of AGF than the toxic dose when competing with *S. cerevisiae* present in the medium. By competing with *S. cerevisiae* for AGF, *T. delbrueckii* incorporates less AGF and the AGF concentration did not reach a level that was toxic for *T. delbrueckii*. Ergosterol is the predominant sterol in yeast cell membranes [40]. It is implicated in endocytosis and membrane curvature formation [41, 42]. Ergosterol influences the diffusion of proteins through the yeast plasma membrane [43]. Incorporation of exogenous lipids inside the membranes is expected to modify the hydrophobic lipid-lipid and lipid-protein interactions. Therefore, the spatial organization of membranes and the biological function of membrane-bound enzymes, such as those involved in the transport systems, could be indirectly affected [44]. An upset of the transport systems is consistent with the low YAN uptakes observed during the *T. delbrueckii* extended latency phase (Fig. 4c in comparison with Fig 3c).

## 2.2. *T. delbrueckii* sugar metabolism in strict anaerobiosis

In all fermentations, nitrogen pressure was applied alternately starting 16 h before the inoculation and continuing throughout the fermentation, to ensure that no dissolved oxygen remained in the medium and thus that conditions were strictly anaerobic. In *T. delbrueckii* SCFs, the carbon balance showed that between 75 and 80% of the sugar consumed was used for biomass, glycerol and ethanol production. In conditions that were not strictly anaerobic, with a single dose of AGF, *T. delbrueckii* rapidly consumed the available dissolved oxygen; sugar was completely consumed and entirely used for biomass, glycerol and ethanol production (data not shown). The same *T. delbrueckii* strain growing, in non-strict anaerobiosis, in Sauvignon Blanc grape must, did not show any carbon unbalance [45]. Consequently, carbon unbalance occurs only in strict anaerobiosis. It indicates the existence of a biochemical reaction using sugar as the substrate and producing CO<sub>2</sub> or a metabolite different from ethanol or glycerol. This reaction is triggered after a long fermentation period and does not depend on the initial concentration of AGF. Must needs to be investigated to identify this biochemical reaction. However, such a reaction does not lead to malic, citric, acetic or succinic acid production and is absent in co-culture.

## 2.3. Effects of lipids on yeasts behaviour

In this study, *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* showed different behaviour regarding AGF increase in the medium. AGF augmentation had no impact on *S. cerevisiae* SCF, whereas it induced an extended latency phase during *T. delbrueckii* SCF. Mauricio *et al.*, observed that the supplementation of grape must with 25 mg/L of ergosterol and 31 mg/L of oleic acid enhanced the fermentation rate of *S. cerevisiae* E-1 and *T. delbrueckii* M1-20-4 [46]. In the same study, the supplementation of grape must with only 25 mg/L of ergosterol enhanced the fermentation rate of *S. cerevisiae*, whereas it reduced that of *T. delbrueckii*. In our case, 30 mg/L of ergosterol, 1 µl/L of oleic acid and 1 mL/L of tween were added (double dose). Since the initial lipids concentration in the grape must was not mentioned, it is not possible to compare with the lipid concentrations used in the present work. However, it appears that the effects of lipid increase on growth and fermentation performance depends on the nature of the lipid mixture, the yeast genus and the medium composition.

## 2.4. Physical contact and competition

*S. cerevisiae* dominated all co-cultures with a single dose of AGF. In presence of *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae* reached a maximum population comparable to that observed in SCF. However, when both yeasts were in direct contact (MCF), *S. cerevisiae* presented an increase of growth rate at the beginning of the fermentation. Recently, Tronchoni *et al.*, analysed the transcriptional response to direct contact co-cultivation of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* [47]. Early changes in the transcription pattern suggested a stimulation the growth and glycolytic activity of both yeasts as a consequence of the presence of competition in the same medium, with a delayed response of *T. delbrueckii*. Secreted Hsp12, which is involved in the coordinated response of cells in multi-strain cultures of *S. cerevisiae*, was suspected be related to this early response [48]. Since *S. cerevisiae* growth was not stimulated when the yeasts were separated by a membrane in the present study, physical contact is believed to play a role in *S. cerevisiae* response to *T. delbrueckii* presence. Unlike in the last cited work, *T. delbrueckii* early growth was not stimulated by the presence of *S. cerevisiae* in our study. It should be stressed that the inoculation ratio of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* was 20/1 in the present work while it was 1/1 in the cited work. The strain used was also different.

*S. cerevisiae* completed SCF faster than *T. delbrueckii*. In MS300M, paradoxically, MCF, in which *T. delbrueckii* was preponderant, presented a mean sugar consumption rate that was higher than that of CCF. This observation is reminiscent of a stimulation of glycolytic activity observed by Tronchoni *et al.*, when the two yeasts were in physical contact [47].

In a study involving *S. cerevisiae* and *H. guilliermondii* focusing on yeast interactions at molecular level in natural grape must, it was found that *GAP1*, *AGP1*, *MEP1* and *MEP2*, encoding amino acid transporters for the first two and ammonium permease for the last two, were more highly expressed in *S. cerevisiae* in the single culture, than in the mixed culture [50]. Yeasts were not separated by a membrane. The reduction of the expression of such genes responsible for YAN assimilation could explain the suspected reduction of YAN assimilation by *S. cerevisiae* in MS300M. This phenomenon appears to be induced by physical contact with a non-*Saccharomyces* yeast.

## 2.5. AGF influence on *S. cerevisiae* amensalism

In MS300, *S. cerevisiae* induced death of *T. delbrueckii* by indirect interaction and so dominated co-cultures. The decrease of *T. delbrueckii* concentration while the viability values remained stable led us to suspect that *T. delbrueckii* cells undergoing *S. cerevisiae* amensalism were lysed too rapidly to be coloured by methylene blue. Moreover, at the end of fermentation in MCF, aggregated cells were observed and the aggregated stained cells were smaller than the scattered unstained cells. Since *T. delbrueckii* has a smaller cell size than *S. cerevisiae* [50], we suppose that *T. delbrueckii* dead cells were aggregated and living *S. cerevisiae* were scattered. In consequence, direct contact with *S. cerevisiae* would cause aggregation of dead *T. delbrueckii* cells. Such aggregation was not observed in MS300M.

AGF augmentation completely upset *S. cerevisiae* domination. Several authors have shown that *S. cerevisiae* amensalism against non-*Saccharomyces* yeasts is mediated by AMPs [16,17,51]. The toxicity of AMPs depends on their concentration [52]. Albergaria *et al.*, observed that *S. cerevisiae* continuously secretes AMPs from the second day to end of the



fermentation [16]. Consequently, we supposed that the AMP concentration was sufficient to induce *T. delbrueckii* death in co-cultures with the double dose of AGF. However, after the AGF increase, *T. delbrueckii* growth was not impeded, pointing out that *S. cerevisiae* AMPs were less efficient.

The death mechanisms induced by these AMPs on sensitive yeasts involve cell membrane permeabilization [51]. Most AMPs induce death of sensitive cells by interacting with cell membranes and permeabilizing them [53,54]. Interaction between sensitive cell membrane and AMPs is the first step of the toxic activity [55]. The lipid composition of the sensitive cell membrane plays a primordial role in this interaction [56]. Cells that are resistant to permeabilization induced by AMPs have a membrane lipid composition different from that of sensitive cells [57]. Since incorporated exogenous lipids modify membrane lipid composition, we assumed that *T. delbrueckii* growing in MS300 and MS300M had a different membrane lipid composition. We hypothesize that *T. delbrueckii* membrane lipid composition did not allow an efficient interaction with AMPs, thus avoiding their toxic activity during co-cultures in MS300M.

To the best of our knowledge, this is the first time that a modification of a nutrient concentration completely reverses the domination. The initial concentration of anaerobic growth factors greatly influences co-culture fermentation population dynamics, thus highlighting a new means for monitoring population evolution and eventually wine organoleptic properties.

### 3. References

1. Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16:675–729
2. Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* 10:123–133
3. Sadoudi M, Tourdot-Maréchal R, Rousseaux S, Steyer D, Gallardo-Chacón JJ, Ballester J, Vichi S, Guérin-Schneider R, Caixach J, Alexandre H (2012) Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol* 32:243–253
4. Taillandier P, Lai QP, Julien-Ortiz A, Brandam C (2014) Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J Microbiol Biotechnol* 30:1959–1967
5. Contreras A, Curtin C, Varela C (2015) Yeast population dynamics reveal a potential ‘collaboration’ between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1885–1895
6. Ciani M, Maccarelli F (1997) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J Microbiol Biotechnol* 14:199–203
7. Ciani M, Picciotti G (1995) The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol Lett* 17:1247–1250
8. Renault P, Miot-Sertier C, Marullo P, Hernández-Orte P, Lagarrigue L, Lonvaud-Funel A, Bely M (2009) Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 134:201–210
9. Brandam C, Lai QP, Julien-Ortiz A, Taillandier P (2013) Influence of Oxygen on Alcoholic Fermentation by a Wine Strain of *Torulaspora delbrueckii*: Kinetics and Carbon Mass Balance. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:1848–1853
10. Renault P, Coulon J, de Revel G, Barbe JC, Bely M (2015) Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int J Food Microbiol* 207:40–48
11. Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D (2008) Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* 122:312–320
12. Nissen P, Arneborg N (2003) Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 180:257–263

13. Velázquez R, Zamora E, Álvarez ML, Hernández LM and Ramírez M (2015) Effects of new *Torulasporea delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Front Microbiol* 6:1222
14. Ramírez M, Velázquez R, Maqueda M, López-Piñeiro A, Ribas JC (2015) A new wine *Torulasporea delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Front Microbiol* 6:983
15. Rodriguez-Cousino N, Maqueda M, Ambrona J, Zamora E, Esteban R, Ramírez M (2011) A New Wine *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin (Klus), Encoded by a Double-Stranded RNA Virus, with Broad Antifungal Activity Is Evolutionarily Related to a Chromosomal Host Gene. *Appl Environ Microbiol* 77:1822–1832
16. Albergaria H, Francisco D, Gori K, Arneborg N, Gírio F (2010) *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:965–972
17. Branco P, Francisco D, Monteiro M, Almeida MG, Caldeira J, Arneborg N, Prista C, Albergaria H (2017) Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:159–171
18. Albergaria H, Arneborg N (2016) Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:2035-2046
19. Holm Hansen E, Nissen P, Sommer P, Nielsen JC, Arneborg N (2001) The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 91:541–547
20. Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1471–1510
21. Alexandre H, Rousseaux I, Charpentier C (1994) Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol Lett* 124:17–22
22. Pina C, Santos C, Couto JA, Hogg T (2004) Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*, influence of different culture conditions. *Food Microbiol* 21:439–447
23. Deytieux C, Mussard L, Biron MJ, Salmon JM (2005) Fine measurement of ergosterol requirements for growth of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:266–271
24. Delfini C, Costa A (1993) Effects of the Grape Must Lees and Insoluble Materials on the Alcoholic Fermentation Rate and the Production of Acetic Acid, Pyruvic Acid, and Acetaldehyde. *Am J Enol Vitic* 44:86–92

25. Rosi I, Bertuccioli M (1992) Influence of lipid addition on fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma characteristics of experimental wines. *J Inst Brew* 98:305–314
26. Lee AG (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1666:62–87
27. Lees ND, Bard M, Kirsch DR (1997) In: Parish EJ, Nes WD (eds) *Biochemistry and function of sterols*, 1st edn. CRC Press, Boca Raton
28. Kleinhans FW, Lees ND, Bard M, Haak RA, Woods RA (1979) ESR determinations of membrane permeability in a yeast sterol mutant. *Chem Phys Lipids* 23:143–154
29. Loira I, Vejarano R, Bañuelos MA, Morata A, Tesfaye W, Uthurry C, Villa A, Cintora I, Suárez-Lepe JA (2014) Influence of sequential fermentation with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Sci Technol* 59:915–922
30. Canonico L, Comitini F, Ciani M (2017) *Torulaspota delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol* 259:7–13
31. Azzolini M, Fedrizzi B, Tosi E, Finato F, Vagnoli P, Scrinzi C, Zapparoli G (2012) Effects of *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *Eur Food Res Technol* 235:303–313
32. Nissen P, Nielsen D, Arneborg N (2003) Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20:331–341
33. Brandam C, Fahimi N, Taillandier P (2016) Mixed cultures of *Oenococcus oeni* strains: A mathematical model to test interaction on malolactic fermentation in winemaking. *LWT - Food Sci Technol* 69:211–216
34. Lopez CLF, Beaufort S, Brandam C, Taillandier P (2014) Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type medium fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 30:2223–2229
35. Salgado ME, Albasi C, Riba JP (2000) A two-reservoir, hollow-fiber bioreactor for the study of mixed-population dynamics: Design aspects and validation of the approach. *Biotechnol Bioeng* 401–408 .
36. Salmon JM, Barre P (1998) Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol* 64:3831–3837
37. Albasi C, Tataridis P, Salgado Manjarrez E, Taillandier P (2001) A New Tool for the Quantification of Microorganism Interaction Dynamics. *Ind Eng Chem Res* 40:5222–5227

38. Jimenez RR, Ladha JK (1993) Automated elemental analysis: A rapid and reliable but expensive measurement of total carbon and nitrogen in plant and soil samples. *Commun Soil Sci Plant Anal* 24:1897–1924
39. Racine JS (2012) RStudio: A Platform-Independent IDE for R and Sweave. *J Appl Econom* 27:167–172
40. Rodriguez RJ, Low C, Bottema CD, Parks LW (1985) Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta BBA-Lipids Lipid Metab* 837:336–343
41. Lucero HA, Robbins PW (2004) Lipid rafts–protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys* 426:208–224
42. Souza CM, Pichler H (2007) Lipid requirements for endocytosis in yeast. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1771:442–454
43. Valdez-Taubas J, Pelham HRB (2003) Slow Diffusion of Proteins in the Yeast Plasma Membrane Allows Polarity to Be Maintained by Endocytic Cycling. *Curr Biol* 13:1636–1640
44. Viegas CA, Rosa MF, Sá-Correia I, Novais JM (1989) Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolic Fermentation. *Appl Environ Microbiol* 55:21–28
45. Renault PE, Albertin W, Bely M (2013) An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4105–4119
46. Mauricio JC, Millán C, Ortega JM (1998) Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *World J Microbiol Biotechnol* 14:405–410
47. Tronchoni J, Curiel JA, Morales P, Torres-Pérez R, Gonzalez R (2017) Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *Int J Food Microbiol* 241:60–68
48. Rivero D, Berná L, Stefanini I, Baruffini E, Bergerat A, Csikász-Nagy A, De Filippo C, Cavalieri D (2015) Hsp12p and PAU genes are involved in ecological interactions between natural yeast strains: Natural yeast interactions. *Environ Microbiol* 17:3069–3081
49. Barbosa C, Mendes-Faia A, Lage P, Mira NP, Mendes-Ferreira A (2015) Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microb Cell Factories* 14:124
50. Hernández-López MJ, Pallotti C, Andreu P, Aguilera J, Prieto JA, Randez-Gil F (2007) Characterization of a *Torulaspora delbrueckii* diploid strain with optimized performance in sweet and frozen sweet dough. *Int J Food Microbiol* 116:103–110
51. Branco P, Viana T, Albergaria H, Arneborg N (2015) Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane

permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *Int J Food Microbiol* 205:112–118

52. Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI (1986) In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* 68:1407–1410

53. Pandey BK, Srivastava S, Singh M, Ghosh JK (2011) Inducing toxicity by introducing a leucine-zipper-like motif in frog antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochem J* 436:609–620

54. Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238

55. Harris F, Dennison S, Phoenix D (2009) Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Curr Protein Pept Sci* 10:585–606

56. Kagan BL, Ganz T, Lehrer RI (1994) Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* 87:131–149

57. Gallo M, Katz E (1972) Regulation of Secondary Metabolite Biosynthesis: Catabolite Repression of Phenoxazinone Synthase and Actinomycin Formation by Glucose. *J Bacteriol* 109:659–667

## **CHAPITRE III: MODELISATION DES CULTURES PURES DE LEVURES**

---

"La raison pour laquelle certains portraits ne ressemblent pas à leur modèle vivant, c'est parce que les modèles ne font aucun effort pour ressembler à leur portrait."

*Salvador Dali*

## I. Introduction

Les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont été réalisées dans plusieurs milieux de culture. Pour chaque levure, quatre expériences ont été réalisées en culture pure. Deux expériences contenant des concentrations initiales d'azote assimilable différentes ont été réalisées en anaérobiose non stricte. Deux expériences contenant des concentrations initiales de facteurs anaérobies différentes ont été réalisées en anaérobiose stricte.

L'azote est un élément essentiel pour la croissance des levures. La quantité d'azote assimilable initiale est un facteur qui détermine la concentration cellulaire maximale obtenue au cours de la fermentation. Néanmoins, les résultats présentés dans le chapitre I montrent que les levures continuent à croître après l'épuisement de l'azote (Figure 34). Ce phénomène a été observé sur l'ensemble des cultures pures de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*.

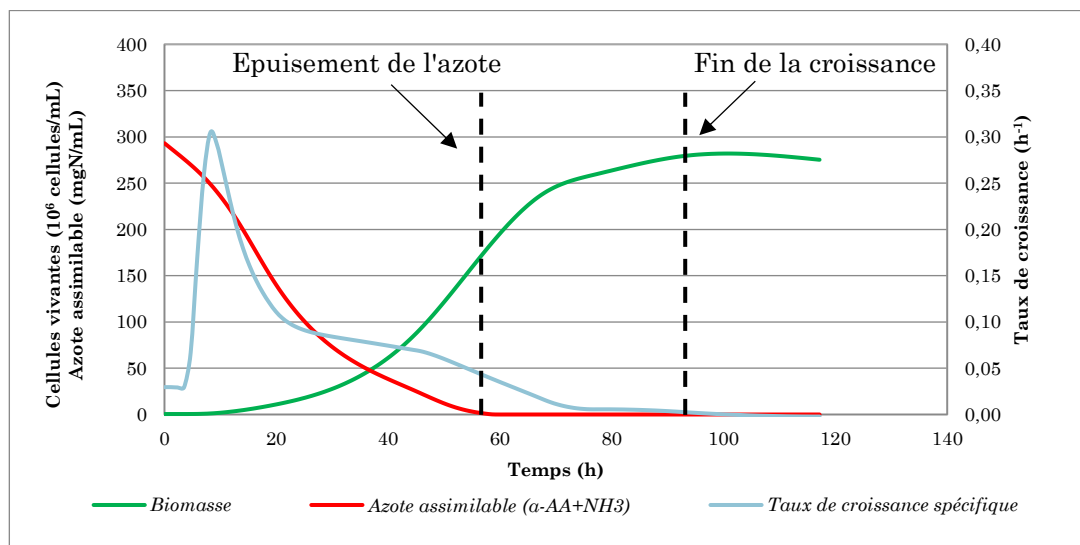


Figure 34 Evolution du nombre de cellules vivantes, de la d'azote assimilable et du taux de croissance spécifique au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* en milieu MS300 en anaérobiose non stricte.

Nous proposons de représenter l'évolution des cultures pures par un modèle stœchiocinétique basé sur cette observation. Dans ce modèle, l'évolution macroscopique des différents composés est décrite par des vitesses de réactions couplées à un bilan matière.

Ce chapitre est organisé en deux parties. La première partie présente la conception d'un modèle décrivant l'évolution du milieu fermentaire en fonction de la quantité d'azote du milieu et en anaérobiose non stricte. La seconde partie expose les adaptations qui ont été faites à partir de ce modèle pour représenter les résultats expérimentaux obtenus en anaérobiose stricte et suivant la quantité initiale de facteurs anaérobies.



## II. Conception d'un modèle mathématique en anaérobiose non stricte

### II.1. Concepts d'azote minimal et d'azote stocké

*S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* continuent de croître après l'épuisement de l'azote assimilable. Ainsi, lorsqu'il n'y a plus d'azote assimilable, la croissance des levures s'effectue sur une source d'azote située à l'intérieur de la cellule. Il est donc nécessaire de prendre en compte une source d'azote intracellulaire pour décrire mathématiquement les cinétiques de croissance des microorganismes étudiés.

Un suivi de la fraction cellulaire d'azote a été effectué lors des cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Il a permis de mesurer les fractions d'azote minimales contenues dans chaque espèce (Tableau 17 et Tableau 18). Ces fractions minimales ont été observées en fin de fermentation. Les valeurs expérimentales minimales sont obtenues pour les essais en MS170. Elles sont de 50 et 61 mg d'azote par gramme de cellules totales respectivement pour *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*.

Tableau 17 Quantité minimale d'azote (mg) par gramme de cellules totales

Milieu	MS170	MS300
<i>S. cerevisiae</i>	50	63
<i>T. delbrueckii</i>	61	73

Tableau 18 Quantité minimale d'azote ( $\mu\text{g}$ ) par millions cellules totales

Milieu	MS170	MS300
<i>S. cerevisiae</i>	1,3	1,7
<i>T. delbrueckii</i>	0,8	0,9

Nous supposons que la carence en azote est la principale cause du manque de croissance observée en milieu MS170. L'hypothèse consiste à admettre qu'une quantité minimale d'azote cellulaire est nécessaire pour assurer les fonctions vitales de la cellule.

Dans un premier temps, cette quantité est considérée égale à la valeur expérimentale minimale obtenue sur le milieu MS170. Multiplier cette dernière par la concentration des cellules vivantes présentes à chaque instant permet d'obtenir un profil de concentration d'azote minimal requis pour assurer les fonctions vitales des cellules (Figure 35 à Figure 38). On observe que la quantité d'azote assimilée est supérieure à la quantité minimale d'azote cellulaire (Figure 35 à Figure 38). La différence entre l'azote total assimilé et l'azote minimal requis a une cinétique qui s'apparente à une accumulation suivie d'une consommation d'azote. Ainsi, cette différence est appelée azote stocké. L'arrêt de croissance se produit lorsque le stock devient nul, ce stock constitue une réserve d'azote biodisponible pour la croissance des levures. La croissance est limitée par le stock d'azote en milieu MS170. En milieu MS300, les levures stockent une plus grande quantité d'azote (Figure 37 et Figure 38). L'azote stocké reste important au moment de l'arrêt de la croissance.

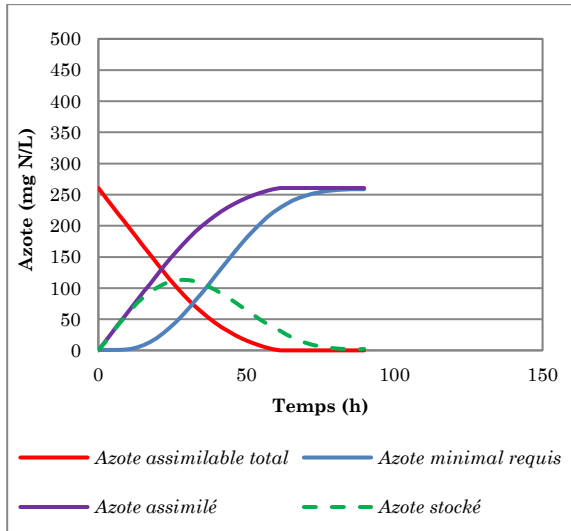


Figure 35 Répartition de l'azote au cours la fermentation du milieu MS170 par *S. cerevisiae* en anaérobiose non stricte.

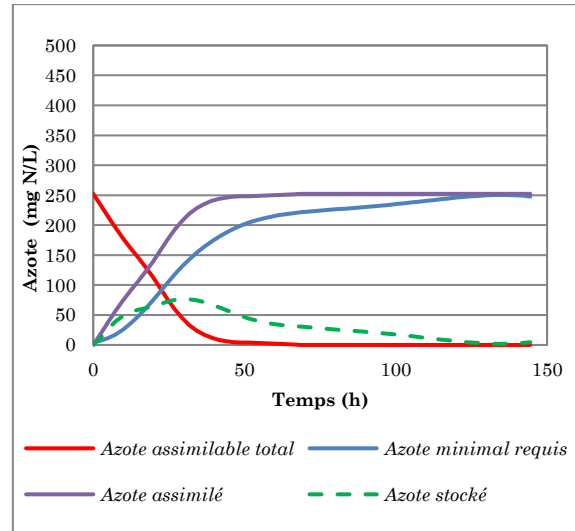


Figure 36 Répartition de l'azote au cours la fermentation du milieu MS170 par *T. delbrueckii* en anaérobiose non stricte.

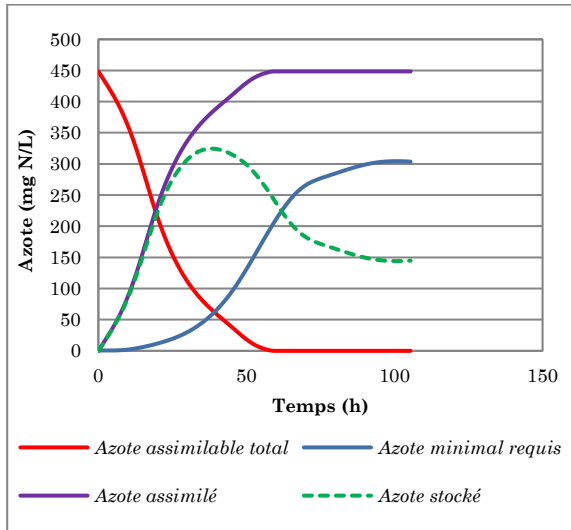


Figure 37 Répartition de l'azote au cours la fermentation du milieu MS300 par *S. cerevisiae* en anaérobiose non stricte.

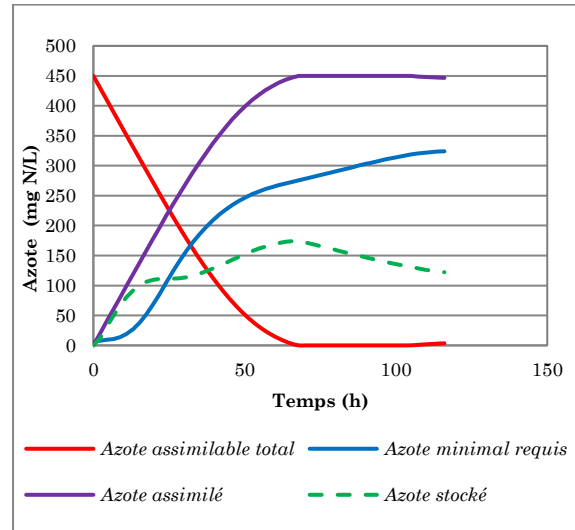


Figure 38 Répartition de l'azote au cours la fermentation du milieu MS300 par *T. delbrueckii* en anaérobiose non stricte.

Quel que soit le milieu de culture, le stock d'azote atteint une valeur maximale suivie d'une déplétion progressive. Un ralentissement de la vitesse de croissance survient au cours de cette déplétion. Les réserves d'azote semblent être impliquées dans l'évolution de la vitesse de croissance.

L'azote assimilable présent dans le milieu de culture limite la croissance des levures. Cependant, il est complètement épuisé avant la fin de leur croissance. Par conséquent, l'évolution de la biomasse ne peut pas être représentée numériquement par l'azote assimilable. De ce fait, il convient d'introduire les notions d'azote cellulaire minimal et d'azote stocké pour décrire les cinétiques de population. Ceci implique la conception d'un modèle structuré dans lequel l'azote total assimilé se repartie en deux compartiments. Dans ce modèle structuré, la cellule assimile l'azote ( $N$ ) qui est réparti dans deux compartiments: le compartiment constitutif et le compartiment de stockage.

Le compartiment constitutif contient une quantité d'azote égale à la quantité minimale d'azote cellulaire ( $N_{min}$ ). Ce compartiment assure les fonctions minimales vitales permettant de maintenir la cellule en vie. Le compartiment constitutif correspond à l'ensemble des éléments azotés du cytoplasme, des membranes et du contenu des organelles à l'exception des vacuoles. Tout comme le compartiment constitutif, le compartiment de stockage contribue à l'activité cellulaire. Cependant seul le compartiment de stockage contient les réserves d'azote biodisponible pour la croissance. Le compartiment de stockage correspond au contenu azoté des vacuoles qui constitue une part considérable de l'azote cellulaire (Wiemken et Nurse, 1973; Wiemken et Dürr, 1974; Messenguy *et al.*, 1980; Large, 1986). Le contenu du compartiment de stockage ( $N_s$ ) augmente lorsque la cellule assimile de l'azote et diminue lorsque la population augmente.

Lorsque les cellules se multiplient, la quantité d'azote nécessaire pour la formation du compartiment constitutif supplémentaire est puisée dans les réserves de la cellule mère. Le stock d'azote restant est équitablement réparti entre la cellule mère et la cellule néoformée (Figure 39). Au niveau macroscopique, l'assimilation d'azote et la multiplication des cellules se déroulent simultanément.

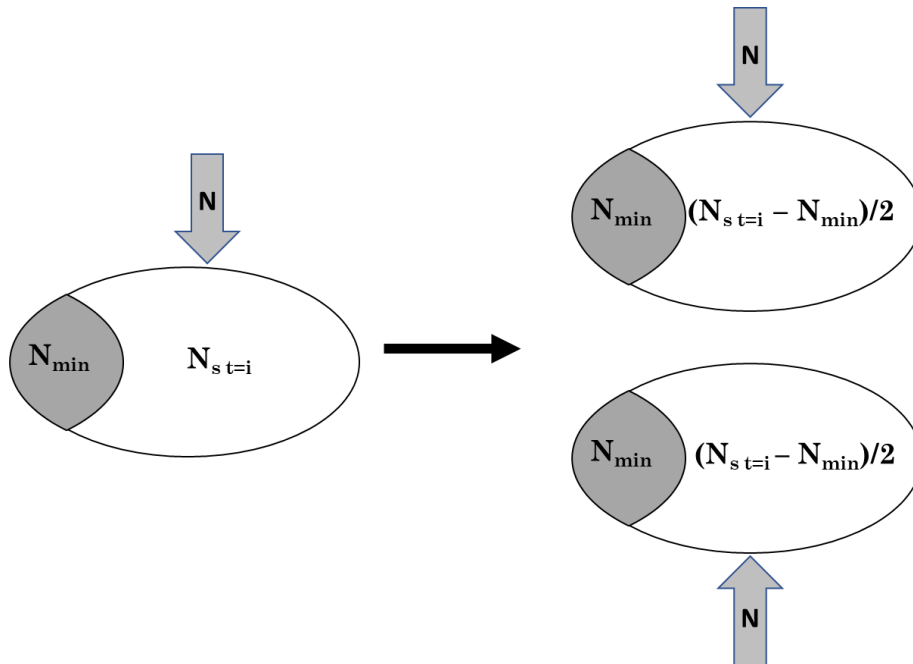


Figure 39 Schéma du modèle proposé.

## II.2. Autres hypothèses du modèle

Certaines hypothèses ont été émises en vue de décrire l'évolution du milieu fermentaire. On suppose que les réacteurs utilisés sont parfaitement agités et que les volumes prélevés au cours du temps ne perturbent pas l'évolution du système. Le modèle décrit l'évolution du sucre total et ne différencie pas le glucose du fructose. De façon analogue, le modèle considère l'azote assimilable total sans faire de distinction entre l'azote ammoniacal et celui provenant des acides aminés. La production d'éthanol et de glycérol sont deux réactions

supposées indépendantes et instantanées qui utilisent le sucre comme substrat. Il n'y a donc pas d'accumulation de sucres dans les cellules.

### II.3. Principes

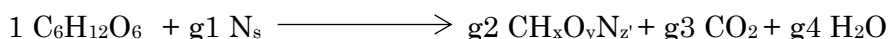
Un modèle stœchio-cinétique a été développé pour décrire l'évolution de la biomasse, du sucre, de l'azote assimilable, du glycérol et de l'éthanol. Ce modèle est basé sur les cinq réactions suivantes:

- La croissance ( $r1$ ): la levure consomme de l'azote stocké et du sucre pour la croissance.
- La fermentation ( $r2$ ): la levure transforme du sucre en éthanol.
- L'absorption d'azote ( $r3$ ): la levure absorbe de l'azote assimilable qui passe du milieu de culture vers le compartiment de stockage.
- La mortalité liée à l'éthanol ( $r4$ ): une levure vivante meurt et donne une levure morte.
- La production de glycérol ( $r5$ ): la levure transforme du sucre en glycérol.

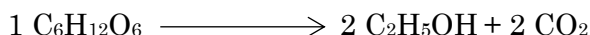
### II.4. Cinétique et stœchiométrie

La masse molaire mesurée des levures ( $\text{CH}_x\text{O}_y\text{N}_z$ ) varie au cours de la fermentation. On estime que la masse molaire  $\text{CH}_x\text{O}_y\text{N}_{z'}$  d'une cellule contenant un compartiment de stockage d'azote vide ne varie pas. La quantité d'azote minimale contenue dans le compartiment constitutif est la seule contribution en azote de cette masse molaire. Cette masse molaire est appelée masse molaire constitutive. A tout instant,  $z'$  est inférieur ou égal à  $z$ . Utiliser une masse molaire constante permet de s'affranchir de la description sa dynamique et contribue à la réduction de la complexité du modèle. Les cinq réactions considérées dans ce modèle sont liées par bilan matière, avec comme stœchiométries apparentes:

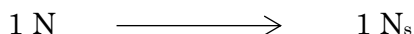
Croissance ( $r1$ ):



Fermentation ( $r2$ ):



Absorption d'azote ( $r3$ ):



Mortalité naturelle ( $r4$ ):

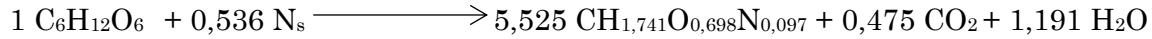


Production de glycérol ( $r5$ ):

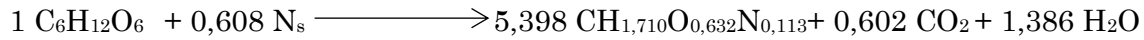


Les coefficients stœchiométriques  $g1$ ,  $g2$ ,  $g3$  et  $g4$  sont fixes. Pour chaque levure, l'équation de croissance est résolue en utilisant la masse molaire contenant la part d'azote la plus faible observée expérimentalement, c'est-à-dire lors des essais en milieu MS170. On peut ainsi calculer les coefficients stœchiométriques  $g1$ ,  $g2$ ,  $g3$  et  $g4$ .

*S. cerevisiae*:



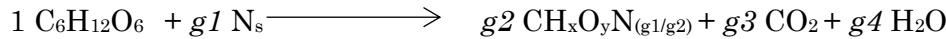
*T. delbrueckii*:



Le bilan de matière dans la réaction de croissance nous permet d'écrire l'égalité suivante:

$$z' = \frac{g1}{g2}$$

La réaction de croissance ( $r1$ ) s'écrit donc ainsi:



La réaction de croissance ( $r1$ ) reste équilibrée lorsqu'on fait varier le coefficient stœchiométrique  $g1$  sans changer les valeurs de  $g2$ ,  $g3$  et  $g4$ . Par conséquent, seul le coefficient  $g1$  sera identifié, les autres coefficients conservant les valeurs précédemment calculées (Tableau 19). Pour chaque levure, la valeur de  $g1$  est inférieure ou égale à la valeur expérimentale observée.

Tableau 19 Récapitulatif des coefficients stœchiométriques des réactions de croissance

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>
<b>g2</b>	5,525	5,398
<b>g3</b>	0,475	0,602
<b>g4</b>	1,191	1,386

## II.5. Expressions mathématiques

### II.5.1. Vitesse de croissance

Dans un modèle mathématique, la description de la dynamique d'une population  $X$  s'appuie sur l'expression de son taux spécifique de croissance  $\mu$ . On peut décrire l'évolution du taux de croissance de manière simplifiée par une diminution constante à partir d'une valeur maximale initiale. Cette diminution nécessite l'utilisation d'une fonction de freinage dans l'expression mathématique du taux spécifique de croissance.

Les observations expérimentales montrent une certaine linéarité entre le taux spécifique de croissance  $\mu$  et le nombre de cellules vivantes  $X$  (Figure 40 et Figure 43). Cette linéarité justifie l'emploi d'une fonction liée à  $X$  dans la fonction de freinage. Il en découle l'expression du taux spécifique de croissance suivante, qui n'est autre que la loi logistique:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (\text{Equation } 8)$$

Le terme  $\mu_{max}$  représente le taux spécifique de croissance maximale. Cette expression implique le ralentissement de la croissance jusqu'à la valeur de population maximale  $X_{max}$ .

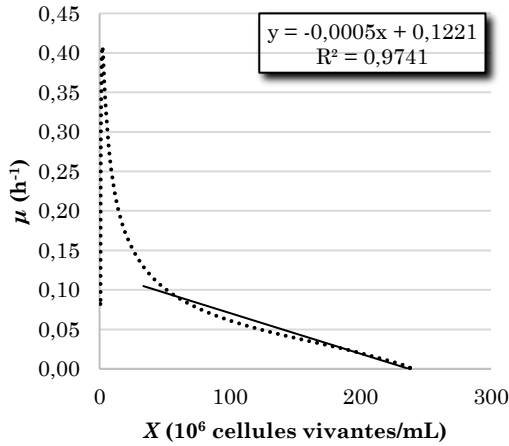


Figure 40 Relation entre  $X$  et  $\mu$  pour *S. cerevisiae* en milieu MS170 en anaérobiose non stricte.

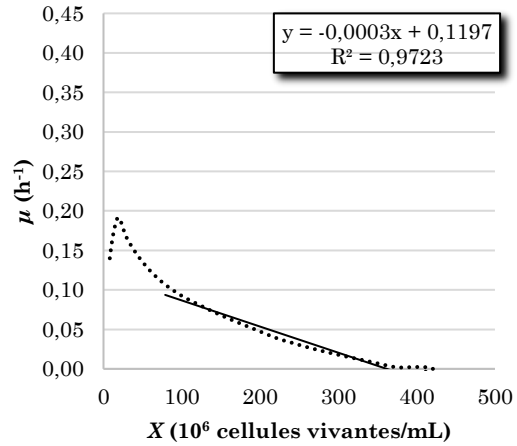


Figure 41 Relation entre  $X$  et  $\mu$  pour *T. delbrueckii* en milieu MS170 en anaérobiose non stricte.

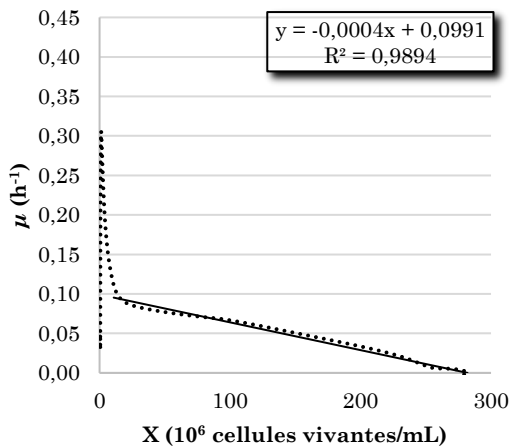


Figure 42 Relation entre  $X$  et  $\mu$  pour *S. cerevisiae* en milieu MS300 en anaérobiose non stricte.

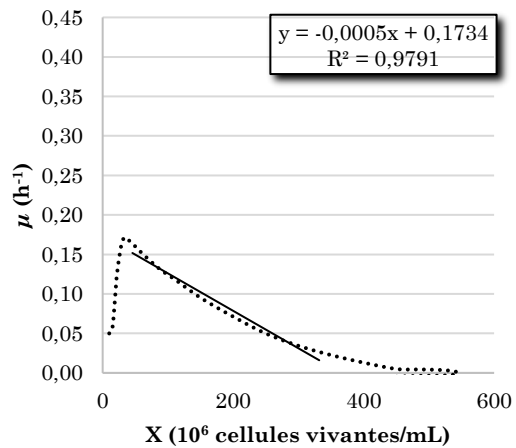


Figure 43 Relation entre  $X$  et  $\mu$  pour *T. delbrueckii* en milieu MS300 en anaérobiose non stricte.

Dans le cas de *S. cerevisiae*, cette relation est linéaire entre de faibles valeurs de population et les valeurs maximales de population. Dans le cas de *T. delbrueckii*, la relation entre  $\mu$  et  $X$  n'est plus linéaire lorsqu'on se rapproche des populations maximales. L'évolution du taux croissance spécifique de *T. delbrueckii* est nettement perturbée par l'évolution du milieu. De plus, l'éthanol ( $E$ ), produit continuellement au court de la fermentation, inhibe la croissance des levures (van Uden, 1985). Il en découle l'expression suivante du taux de croissance spécifique:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \cdot \left(\frac{K_E}{K_E + E}\right) \quad (h^{-1}) \quad (\text{Equation 9})$$

La concentration en éthanol inhibe la croissance des levures par le biais de la constante d'inhibition  $K_E$ .

Au cours de la fermentation, la cellule accumule des réserves d'azote ( $N_s$ ) puis les utilise progressivement pour croître. Un ralentissement de la vitesse de croissance survient lorsque le stock d'azote diminue. Les réserves d'azote semblent être impliquées dans la diminution de la vitesse de croissance, d'où leur incorporation dans l'expression suivante du taux de croissance spécifique:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \cdot \left(\frac{K_E}{K_E + E}\right) \cdot \left(\frac{N_s/X}{N_s/X + K_X}\right) \quad (h^{-1}) \quad (\text{Equation 10})$$

Le stock d'azote limite la croissance par le biais de la constante de limitation  $K_X$ . Dans cette expression, la croissance devient nulle dans deux conditions: lorsque la population atteint  $X_{max}$ , comme dans les fermentations en milieu MS300 et lorsque les réserves d'azote sont nulles comme dans les fermentations en milieu MS170.

Sachant que  $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$ , l'évolution de la biomasse vivantes se traduit par  $\frac{dX}{dt} = X * \mu$ , soit:

$$\frac{dX}{dt} = X \cdot \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \cdot \left(\frac{K_E}{K_E + E}\right) \cdot \left(\frac{N_s/X}{N_s/X + K_X}\right) \quad (\text{cellules} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation 11})$$

On définit donc la vitesse de la réaction de croissance de biomasse par l'expression suivante:

$$r1 = X_n \cdot k_\mu \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \cdot \left(\frac{K_E}{K_E + E}\right) \cdot \left(\frac{N_s/X}{N_s/X + K_X}\right) \quad (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation 12})$$

où  $X_n$  désigne la concentration molaire de levure déterminée à partir de la masse molaire constitutive.

$$X_n = \frac{\text{concentration massique (g/L)}}{\text{masse molaire constitutive (g/mol)}}$$

Le paramètre  $\mu_{max}$  de la loi logistique est analogue au produit  $g2 * k_\mu$  du modèle stœchio-cinétique proposé.

### II.5.2. Fermentation

La vitesse de fermentation est limitée par de faibles concentrations en sucre et inhibée par la présence d'éthanol (van Uden, 1985). De plus, en augmentant la concentration initiale d'azote assimilable, on a observé une augmentation de la vitesse moyenne de consommation de sucres. Cette dernière est associée à une augmentation des réserves d'azote. La vitesse de fermentation est décrite par l'expression suivante:

$$r_2 = k_s \cdot X_n \cdot \left( \frac{S}{S + K_S} \right) \cdot \left( \frac{K_{ES}}{K_{ES} + E} \right) \cdot \left( \frac{N_s/X}{N_s/X + K_{NS}} \right) \quad (\text{mol. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation 13})$$

Chaque cellule vivante absorbe le sucre et le transforme en éthanol, les constantes  $k_s$ ,  $K_S$ ,  $K_{ES}$  et  $K_{NS}$  rendent respectivement compte de la vitesse de réaction, de la limitation par le sucre, de l'inhibition par l'éthanol et de la limitation par les réserves d'azote.

### II.5.3. Absorption d'azote

La vitesse d'assimilation est liée à la concentration d'azote assimilable et au nombre de cellules présentes dans le milieu. La vitesse d'assimilation d'azote est décrite par l'expression suivante, dans laquelle  $k_N$  est la constante de vitesse de la réaction:

$$r_3 = k_N \cdot X_n \cdot N \quad (\text{mol. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation 14})$$



### II.5.4. Mortalité liée à l'éthanol

Au cours de la fermentation, on a observé une réduction de la viabilité au fur et à mesure que l'éthanol est produit (Figure 44). La viabilité de *T. delbrueckii* décroît abruptement dès que la concentration en éthanol atteint 80 g/L. Celle de *S. cerevisiae* décroît progressivement. Pour tenir compte de la spécificité de la mortalité liée à l'éthanol ( $E$ ) de chaque levure, la cinétique de cette réaction sera décrite par l'expression suivante:

$$r_4 = X_n \cdot e^{\left(\frac{E-E_{lim}}{10}\right)} \quad (\text{mol. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation 15})$$

La constante  $E_{lim}$  est une valeur limite à partir de laquelle la mortalité induite par l'éthanol est décuplée.

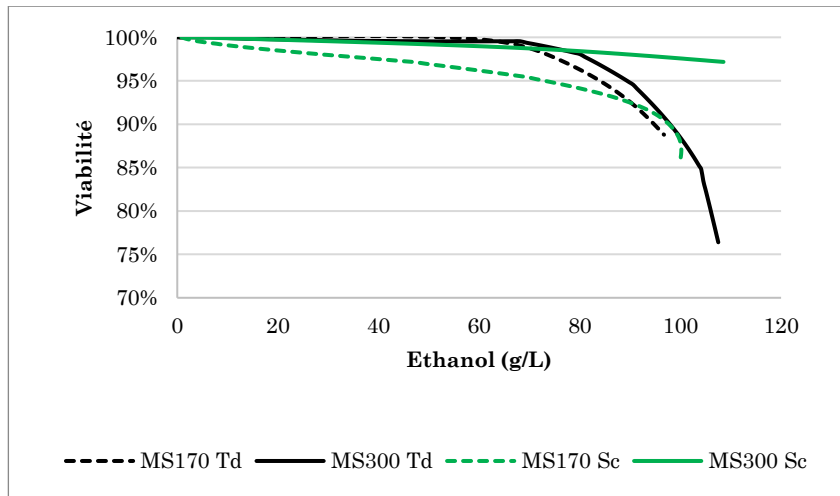


Figure 44 Mortalité en fonction de l'éthanol en anaérobiose non stricte.

### II.5.5. Production de glycérol

La vitesse de production de glycérol est limitée par de faibles concentration en sucre. La production de glycérol contribue au maintien de l'équilibre d'oxydoréduction. En effet, la production de glycérol est couplée à l'oxydation de NADH en NAD<sup>+</sup>. Elle permet de contrebalancer le surplus de NADH produit lors de la croissance de la biomasse. Par ailleurs, la production d'éthanol est aussi couplée à l'oxydation de NADH en NAD<sup>+</sup>. Plus l'éthanol est produit moins le glycérol est nécessaire pour maintenir l'équilibre d'oxydoréduction. La vitesse de production de glycérol est décrite par l'expression suivante:

$$r_5 = k_G \cdot X_n \cdot \left(\frac{S}{S + K_{SG}}\right) \cdot \left(\frac{K_{EG}}{K_{EG} + E}\right) \quad (\text{mol. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation 16})$$

Chaque cellule vivante absorbe le sucre et le transforme en glycérol, les constantes  $k_G$ ,  $K_{SG}$  et  $K_{EG}$  rendent respectivement compte de la vitesse de réaction, de la limitation par le sucre et de l'inhibition par l'éthanol.

### II.5.6. Mise en équation

L'évolution globale du milieu fermentaire est décrite par l'ensemble des équations cinétiques présentées précédemment associées à un système différentiel. L'ensemble des paramètres est exposé dans le Tableau 20.

Vitesses de réaction:

$$\begin{cases} r1 = X_n \cdot k_\mu \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \cdot \left(\frac{K_E}{K_E + E}\right) \cdot \left(\frac{N_s/X}{N_s/X + K_X}\right) \\ r2 = k_s \cdot X_n \cdot \left(\frac{S}{S + K_S}\right) \cdot \left(\frac{K_{ES}}{K_{ES} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_s/X}{N_s/X + K_{NS}}\right) \\ r3 = k_N \cdot X_n \cdot N \\ r4 = X_n \cdot e^{\left(\frac{E - E_{lim}}{10}\right)} \\ r5 = k_G \cdot X_n \cdot \left(\frac{S}{S + K_{SG}}\right) \cdot \left(\frac{K_{EG}}{K_{EG} + E}\right) \end{cases}$$

Système différentiel:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = (g2 * r1 - r4) \\ \frac{dS}{dt} = - (r1 + r2 + r5) \\ \frac{dN}{dt} = -r3 \\ \frac{dN_s}{dt} = (r3 - g1 * r1) \\ \frac{dE}{dt} = 2 * r2 \end{cases}$$

Tableau 20 Paramètres des cultures pures de levures en anaérobiose non stricte

	Paramètres	Unités
<b>Croissance</b>	$k_\mu$	h <sup>-1</sup>
	$X_{max}$	10 <sup>6</sup> cellules/mL
	$K_X$	µg N.10 <sup>-6</sup> cellules
	$g1$	(-)
	$K_E$	g/L
<b>Fermentation</b>	$k_s$	h <sup>-1</sup>
	$K_S$	g/L
	$K_{ES}$	g/L
	$K_{NS}$	µg N.10 <sup>-6</sup> cellules
<b>Assimilation d'azote</b>	$k_N$	L.mol <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
<b>Mortalité</b>	$E_{lim}$	g/L
<b>Production de glycérol</b>	$k_G$	h <sup>-1</sup>
	$K_{SG}$	g/L
	$K_{EG}$	g/L

## II.6. Identification des paramètres

L'identification des paramètres est réalisée en bloc. C'est-à-dire que pour une levure, les paramètres du modèle sont identifiés simultanément pour le milieu MS170 et le milieu MS300. Nous avons choisi une identification simultanée des deux milieux de culture afin d'obtenir des paramètres permettant de représenter les phénomènes considérés sur une plage importante de concentration initiale d'azote assimilable.

Excepté le stock d'azote, toutes les variables ont des valeurs déterminées expérimentalement, notamment à l'instant initial. L'initialisation de la valeur du stock d'azote est fondamentale pour l'identification des paramètres du modèle. La valeur de ce stock est fixée à  $0,1 \mu\text{g N} \cdot 10^{-6}$  cellules pour les deux levures. Il s'agit d'une valeur minimale n'obstruant pas la croissance initiale des levures. Cette valeur est inférieure à 1% de l'azote assimilé au cours de la fermentation.

Lorsqu'un paramètre est identifié, un intervalle de confiance à 90% est calculé. Les bornes de cet intervalle représentent les augmentations et diminutions de la valeur trouvée qui induisent une augmentation de la valeur du critère de 5%. L'incertitude correspond à l'amplitude de l'intervalle ramenée à la valeur du paramètre. Elle est exprimée en pourcentage. Les tableaux de résultats issus de l'estimation paramétrique proposent une incertitude sur les valeurs de chaque paramètre (Tableau 21).

L'incertitude permet ainsi d'apprécier la sensibilité du critère au paramètre considéré: pour de grandes valeurs de cette incertitude, le paramètre est difficilement identifiable et sa valeur a peu d'influence sur les prédictions du modèle.

Tableau 21 Paramètres identifiés par le modèle en anaérobiose non stricte

<i>S. cerevisiae</i>		Paramètres	<i>T. delbrueckii</i>		Unités
Incertitudes	Valeurs		Valeurs	Incertitudes	
10 %	0,032	$k_{\mu}$	0,029	18%	$\text{h}^{-1}$
13%	305	$X_{max}$	604	12%	$10^6 \text{ cell/mL}$
421%	$1 \cdot 10^{-3}$	$K_X$	$5 \cdot 10^{-4}$	1088%	$\mu\text{g N} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$
15%	0,41	$gI$	0,42	6%	(-)
36%	20	$K_E$	12	42%	$\text{g/L}$
17%	0,18	$k_s$	0,17	12%	$\text{h}^{-1}$
93%	71	$K_S$	79	21%	$\text{g/L}$
73%	102	$K_{ES}$	33	20%	$\text{g/L}$
1021%	$5 \cdot 10^{-6}$	$K_{NS}$	0		$\mu\text{g N} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$
177%	6,1	$k_N$	1	62%	$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
9%	155	$E_{lim}$	145	6%	$\text{g/L}$
808%	1,58	$k_G$	1,20	81%	$\text{h}^{-1}$
1100%	140	$K_{SG}$	126	228%	$\text{g/L}$
808%	1,6	$K_{EG}$	1,2	81%	$\text{g/L}$

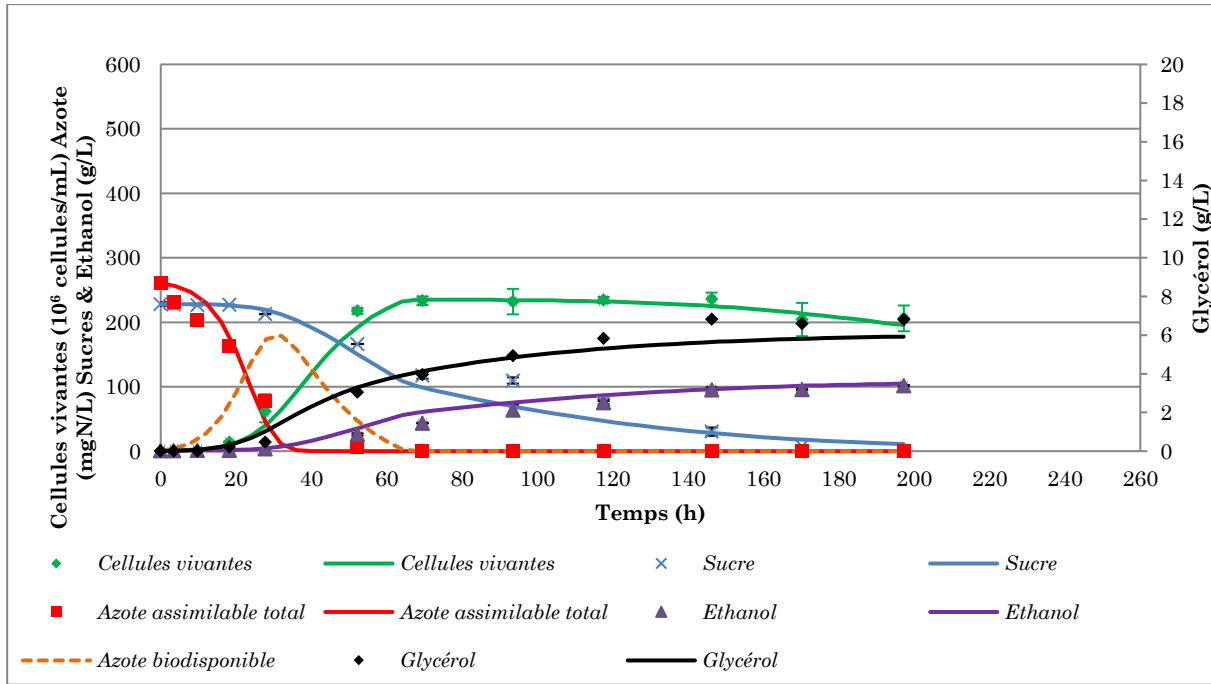


Figure 45 Confrontation du modèle avec la culture pure de *S. cerevisiae* en milieu MS170 en anaérobiose non stricte.

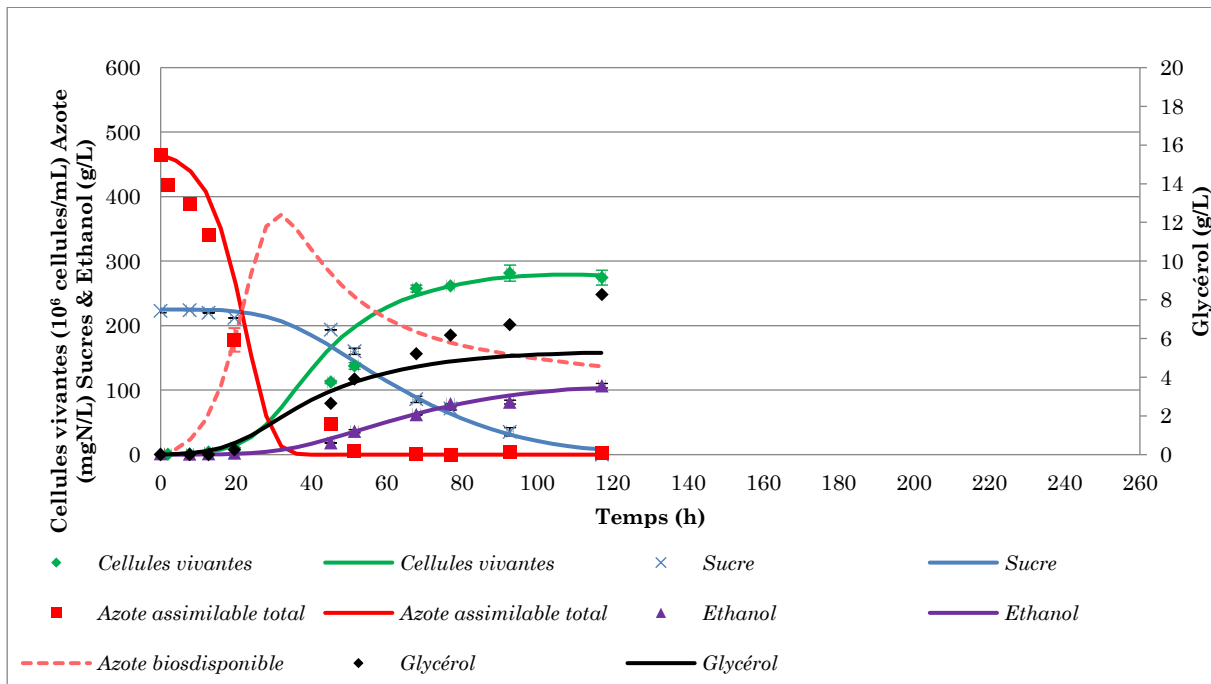


Figure 46 Confrontation du modèle avec la culture pure de *S. cerevisiae* en milieu MS300 en anaérobiose non stricte.

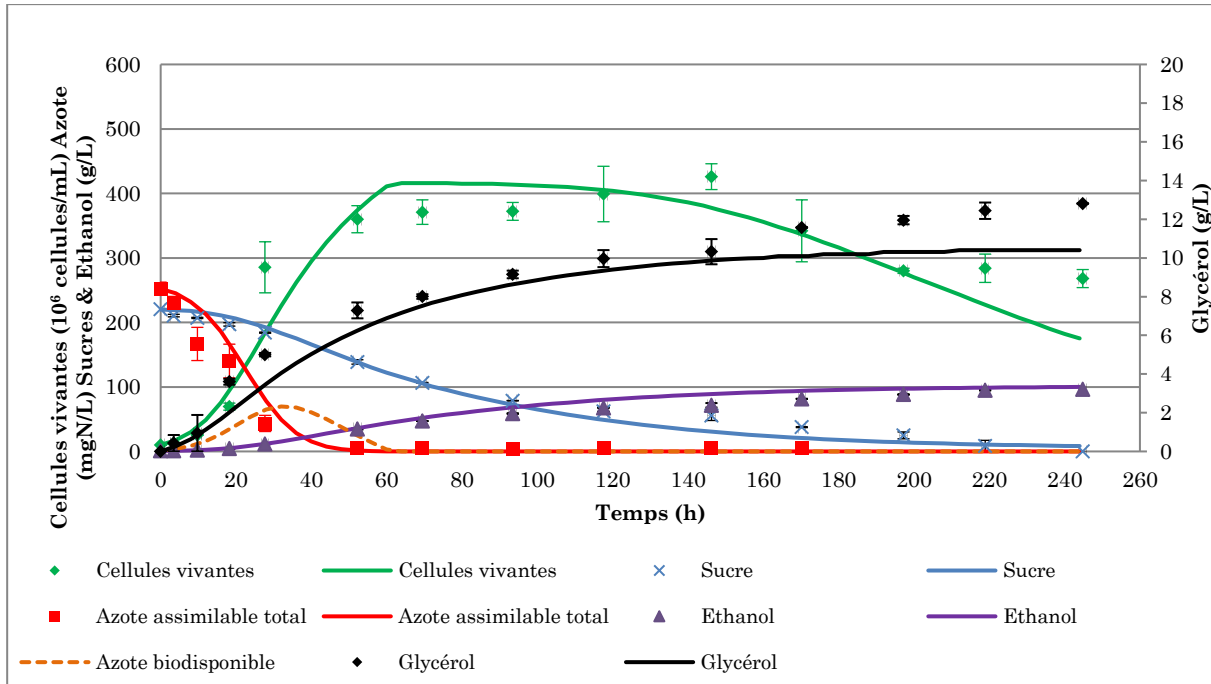


Figure 47 Confrontation du modèle avec la culture pure de *T. delbrueckii* en milieu MS170 en anaérobiose non stricte.

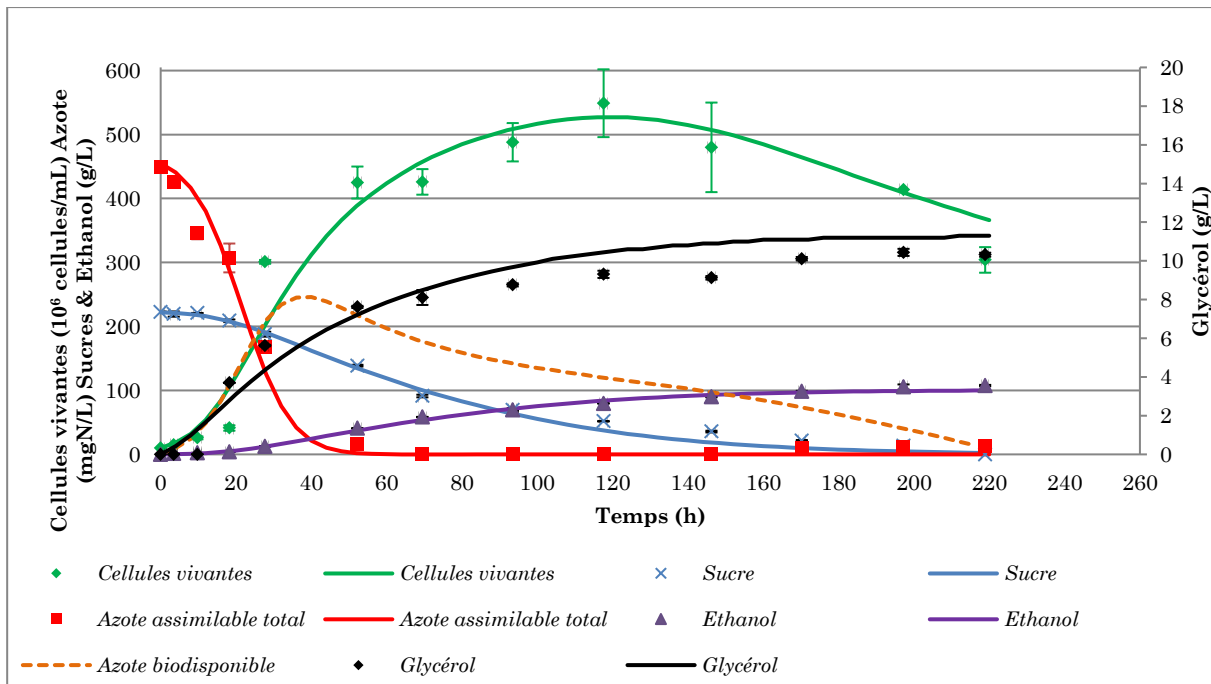


Figure 48 Confrontation du modèle avec la culture pure de *T. delbrueckii* en milieu MS300 en anaérobiose non stricte.

Pour les cultures pures des deux souches en anaérobiose non stricte, on constate que le modèle proposé permet une représentation fidèle des valeurs expérimentales. Certains paramètres tels que  $k_{\mu}$ ,  $X_{max}$ ,  $g_1$ ,  $E_{lim}$  et  $k_s$  sont sensibles (incertitudes <20%). D'autres comme  $K_X$ ,  $K_{NS}$ ,  $K_{EG}$  et  $K_{SG}$  sont moins sensibles. Néanmoins ils sont nécessaires pour correctement représenter les phénomènes observés expérimentalement. Par exemple, le paramètre  $K_{NS}$  est indispensable pour prendre en compte l'augmentation de la durée de la fermentation de *S. cerevisiae* observée lorsque la concentration initiale d'azote assimilable

baisse. La quantité minimale d'azote est déterminée en utilisant la valeur identifiée du paramètre  $g1$  (Tableau 22). Les valeurs expérimentales sont supérieures aux valeurs déterminées par le modèle. Les valeurs expérimentales indiquent que *T. delbrueckii* a des besoins en azote supérieurs à ceux de *S. cerevisiae*. Les valeurs numériques ne montrent pas de différence significative entre les besoins en azote des levures.

Tableau 22 Comparaison entre les quantités minimales d'azote expérimentale et identifiée (mg/g de biomasse)

	Valeur expérimentale	Valeur numérique
<i>S. cerevisiae</i>	50	38
<i>T. delbrueckii</i>	61	40

### III. Modélisation des cultures pures en anaérobiose stricte

#### III.1. Confrontation entre le modèle déterminé en anaérobiose non stricte avec les résultats en anaérobiose stricte

La modélisation des cultures pures en anaérobiose non stricte a permis d'identifier un jeu de paramètres. Connaissant les valeurs expérimentales initiales des cultures pures réalisées en anaérobiose stricte, des simulations avec ce jeu de paramètres ont été réalisées pour ces expériences (Figure 49 et Figure 50).

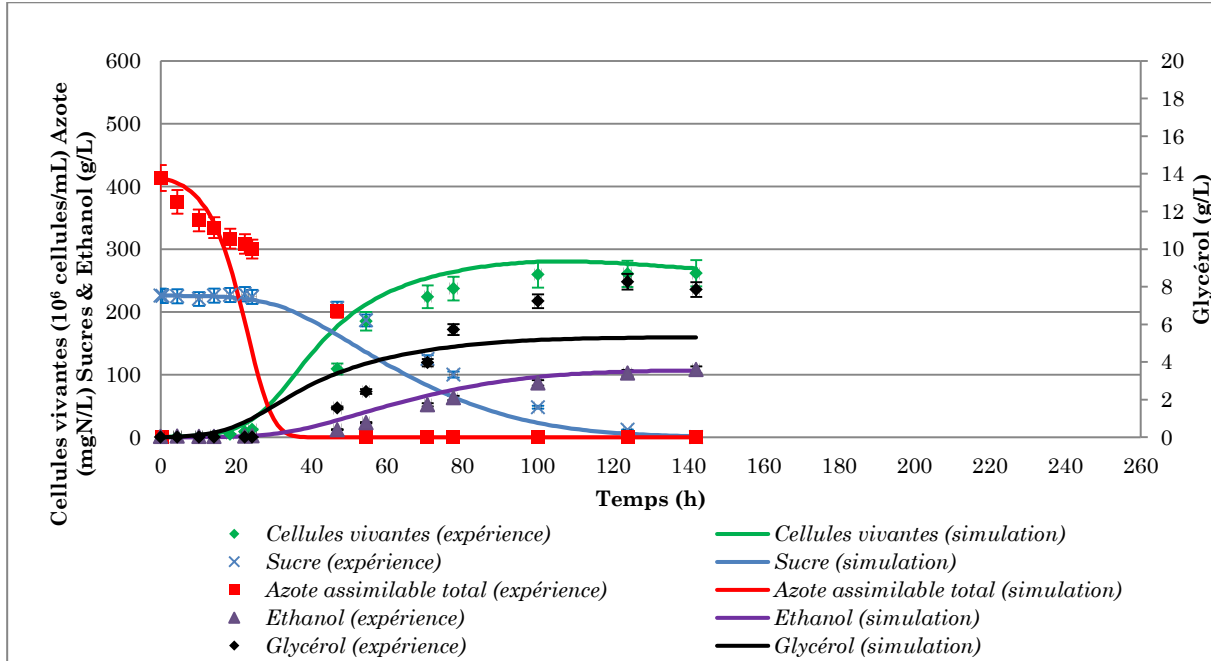


Figure 49 Confrontation entre les valeurs expérimentales obtenues au cours des cultures pure de *S. cerevisiae* en anaérobiose stricte et le modèle déterminé en anaérobiose non stricte.

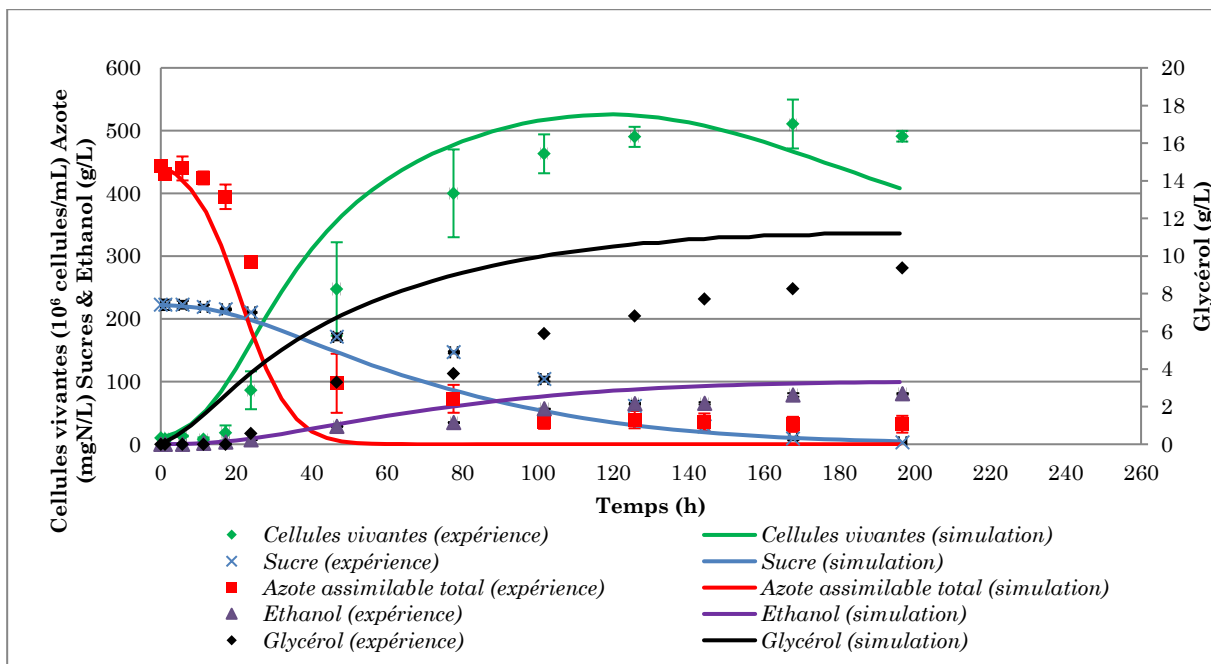


Figure 50 Confrontation entre les valeurs expérimentales obtenues au cours des cultures pure de *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte et le modèle déterminé en anaérobiose non stricte.

Bien que les conditions d'anaérobiose soient différentes entre la simulation et l'expérience, le milieu de culture utilisé (MS300) est identique. Le modèle développé en anaérobiose non stricte permet de décrire les populations maximales atteintes par *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte. Cependant, on observe que le modèle surestime la croissance initiale des levures. Le modèle proposé ne représente pas correctement les valeurs expérimentales. Passer à des conditions anaérobies strictes fait apparaître deux phénomènes qui ne sont pas observés en anaérobiose non stricte. Premièrement, *T. delbrueckii* n'assimile pas entièrement l'azote disponible. Deuxièmement, *T. delbrueckii* n'utilise que 75 à 80% du carbone consommé pour produire de la biomasse, de l'éthanol et du glycérol. Une estimation paramétrique à partir du modèle précédent ne peut être suffisante pour prendre en compte ces deux phénomènes. Il est donc nécessaire d'apporter des modifications au modèle pour tenir compte des spécificités de l'anaérobiose stricte.

La différence fondamentale entre les deux conditions est la présence d'oxygène dissous à l'instant initial lorsque l'anaérobiose est non stricte. L'oxygène est rapidement consommé en début de fermentation. Sa cinétique n'est pas prise en compte dans le modèle. Néanmoins, la présence initiale d'oxygène induit une augmentation de la vitesse de croissance qui sera caractérisée par un taux maximal plus important.

### III.2. Développement d'un modèle de cultures pures en anaérobiose stricte

Les cultures pures ont été réalisées en anaérobiose stricte dans deux milieux de culture. Il s'agit de milieux MS300 et MS300M. Ces milieux diffèrent de par leur concentration initiale en facteurs de croissance anaérobie. Les levures se comportent différemment lorsqu'on augmente la concentration initiale en facteurs anaérobies. En effet, la vitesse moyenne de fermentation et la croissance de *S. cerevisiae* ne sont pas impactées par l'augmentation de facteurs anaérobies. Cette dernière induit néanmoins une phase de latence prolongée, une augmentation de la durée de la fermentation et une assimilation complète de l'azote au cours de la fermentation de *T. delbrueckii*. Des modifications sont apportées au modèle développé pour tenir compte des spécificités de l'anaérobiose stricte et de l'impact des facteurs anaérobie sur le comportement des levures. Ces adaptations impliquent des modifications de certaines expressions mathématiques et l'ajout de réactions supplémentaires.

#### III.2.1. Absorption de facteurs de croissance anaérobie

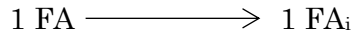
Les facteurs de croissance anaérobie utilisés au cours de cette étude sont composés d'acide oléique, de tween 80 et essentiellement d'ergostérol. Les facteurs anaérobies ( $FA$ ) sont considérés comme un ensemble homogène dont la cinétique est celle de l'ergostérol. La valeur initiale de  $FA$  est de 15 et 30 mg/L respectivement en milieu MS300 et MS300M. La vitesse d'absorption des facteurs anaérobies ( $r_6$ ) est liée à la quantité de cellules présentes dans le milieu de culture (Equation 18).

$$r_6 = k_{FA} \cdot X_n \cdot FA \quad (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation 17})$$



$k_{FA}$  est la constante de vitesse d'absorption des FA. Ces derniers n'ont pas été mesurés au cours de cette étude.  $k_{FA}$  est une valeur inspirée des résultats des travaux de Soubeyrand *et al.*, (2005) qui ont observé une consommation 18 mg/L de stérols en 30 minutes. La valeur de  $k_{FA}$  est supposée identique pour *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*.

Absorption des facteurs anaérobies (r6):



FA<sub>i</sub> représente la concentration de facteurs anaérobies absorbée par la cellule.

### III.2.2. Croissance

Les observations expérimentales montrent une certaine linéarité entre le taux spécifique de croissance  $\mu$  et le nombre de cellules vivantes  $X$  pour les cultures pures de *S. cerevisiae* et la culture pure de *T. delbrueckii* en milieu MS300 (Figure 51 et Figure 53). Pour la culture pure de *T. delbrueckii* en milieu MS300M, qui présente une longue phase de latence, le taux de croissance spécifique et le nombre de cellules vivantes ne sont pas corrélés linéairement (Figure 54).

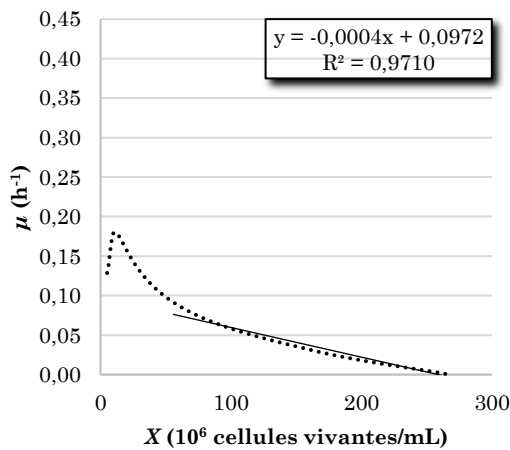


Figure 51 Relation entre  $X$  et  $\mu$  pour *S. cerevisiae* en milieu MS300 en anaérobiose stricte.

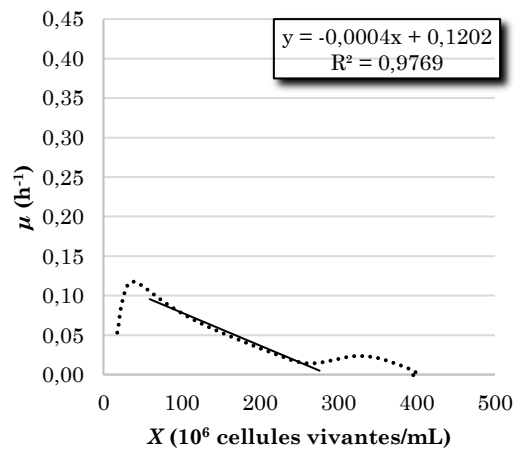


Figure 52 Relation entre  $X$  et  $\mu$  pour *T. delbrueckii* en milieu MS300 en anaérobiose stricte.

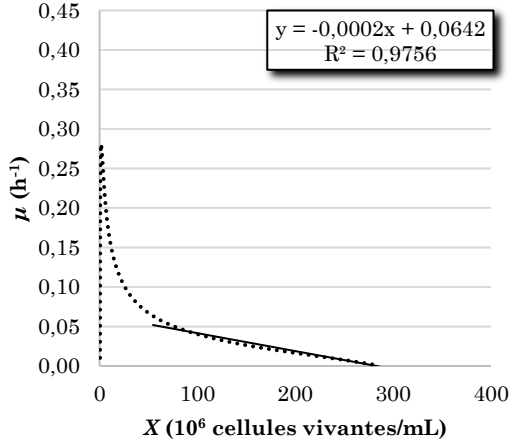


Figure 53 Relation entre  $X$  et  $\mu$  pour *S. cerevisiae* en milieu MS300M en anaérobiose stricte.

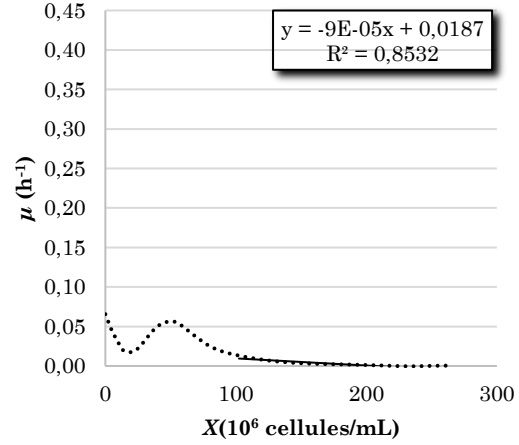


Figure 54 Relation entre  $X$  et  $\mu$  pour *T. delbrueckii* en milieu MS300M en anaérobiose stricte.

Les FA sont très vite absorbés dans la cellule. Le ralentissement de la croissance induit par la quantité de FA intracellulaire ( $FA_i$ ) est modélisé par une inhibition médiée par la constante  $K_{FA}$  (Equation 18).

$$r1 = k_{\mu} \cdot X_n \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \cdot \left(\frac{K_E}{K_E + E}\right) \cdot \left(\frac{N_s/X}{N_s/X + K_X}\right) \cdot \left(\frac{K_{FA}}{FA_i/X + K_{FA}}\right) \quad (mol.L^{-1}.h^{-1}) \quad (Equation 18)$$

### III.2.3. Assimilation d'azote

L'assimilation d'azote de *T. delbrueckii* est incomplète en milieu MS300. L'augmentation de la concentration initiale permet une assimilation complète de l'azote disponible. Pour pouvoir tenir compte de ces observations, nous proposons une formulation de la cinétique d'assimilation d'azote liée à un gradient entre l'azote stocké et l'azote assimilable du milieu (Equation 19). Le coefficient  $\alpha$  permet de prendre en compte le rôle des facteurs anaérobies dans l'assimilation d'azote.

$$r3 = k_N \cdot X_n \cdot \left(N_s - \frac{\alpha}{FA_i} N\right) \quad (mol.L^{-1}.h^{-1}) \quad (Equation 19)$$

### III.2.4. Métabolisme du sucre de *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte

*T. delbrueckii* utilise le sucre consommé pour produire de la biomasse, du glycérol et de l'éthanol (associé à du  $CO_2$ ). Le carbone utilisé pour ces productions correspond à 100 et 80% du carbone contenu dans le sucre consommé respectivement en anaérobiose non stricte et en anaérobiose stricte. Cela implique que le carbone contenu dans le sucre est utilisé pour faire une réaction autre que la production de biomasse, de glycérol et d'éthanol (associé à du  $CO_2$ ). Il convient donc d'introduire une réaction supplémentaire. Le sucre est le substrat

de cette réaction ( $r_7$ ) dont le produit n'a pas été identifié. Sa cinétique est décrite par l'expression suivante:

$$r_7 = k_{inc} \cdot X_n \cdot S \quad (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation } 20)$$

Où  $k_{inc}$  est la constante cinétique. Le déséquilibre du bilan carbone débute après la phase de croissance. Le modèle proposé lie le déclenchement de cette réaction à l'évolution du taux de croissance spécifique:

$$\begin{cases} \text{si } \mu > \mu_{crit} & r_7 = 0 \\ \text{si } \mu < \mu_{crit} & r_7 = k_{inc} \cdot X_n \cdot S \end{cases}$$

Le taux de croissance spécifique critique  $\mu_{crit}$  est le taux de croissance en dessous duquel la réaction ( $r_7$ ) se déroule. La réaction est spécifique de *T. delbrueckii*.

### III.2.5. Rôle des facteurs anaérobies dans la production de glycérol

En passant du milieu MS300 au milieu MS300M, la concentration finale en glycérol de *S. cerevisiae* ne varie pas. Celle de *T. delbrueckii* augmente de 65%. Les facteurs anaérobies ont un impact sur la production de glycérol de *T. delbrueckii* alors qu'ils ont un effet insignifiant sur celle de *S. cerevisiae*. Par conséquent, la production de chaque levure sera décrite par une équation cinétique différente. La cinétique de production de glycérol de *T. delbrueckii* fait intervenir les facteurs anaérobies intracellulaires (Equation 21), elle est inspirée de celle de *S. cerevisiae* (Equation 16).

$$r_5 = k_G \cdot X_n \cdot \left( \frac{S}{S + K_{SG}} \right) \cdot \left( \frac{K_{EG}}{K_{EG} + E} \right) \quad (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation } 16)$$

$$r_5 = k'_G \cdot X_n \cdot FA_i \cdot \left( \frac{S}{S + K_{SG}} \right) \cdot \left( \frac{K_{EG}}{K_{EG} + E} \right) \quad (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equation } 21)$$

### III.2.6. Mise en équation

L'évolution globale du milieu fermentaire en anaérobiose stricte est décrite par l'ensemble des équations cinétiques présentées précédemment associées à un système différentiel. L'ensemble des paramètres est présenté dans le Tableau 23.

Vitesses de réaction:

$$\left\{ \begin{array}{l} r1 = k_{\mu} \cdot X_n \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \cdot \left(\frac{K_E}{K_E + E}\right) \cdot \left(\frac{N_s/X}{N_s/X + K_X}\right) \cdot \left(\frac{K_{FA}}{FA_i/X + K_{FA}}\right) \\ r2 = k_s \cdot X_n \cdot \left(\frac{S}{S + K_S}\right) \cdot \left(\frac{K_{ES}}{K_{ES} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_s/X}{N_s/X + K_{NS}}\right) \\ r3 = k_N \cdot X_n \cdot \left(N_s - \frac{a}{FA_i} N\right) \\ r4 = X_n \cdot e^{\left(\frac{E-E_{lim}}{10}\right)} \\ r5 = k_G \cdot X_n \cdot \left(\frac{S}{S + K_{SG}}\right) \cdot \left(\frac{K_{EG}}{K_{EG} + E}\right), \quad \text{pour } S. cerevisiae \\ r5 = k_G' \cdot X_n \cdot FA_i \cdot \left(\frac{S}{S + K_{SG}}\right) \cdot \left(\frac{K_{EG}}{K_{EG} + E}\right), \quad \text{pour } T. delbrueckii \\ r6 = k_{FA} \cdot X_n \cdot FA \\ r7 = \begin{cases} 0 & \text{si } \mu > \mu_{crit} \\ k_{inc} \cdot X_n \cdot S & \text{si } \mu < \mu_{crit} \end{cases} \quad \text{pour } T. delbrueckii \end{array} \right.$$

Système différentiel:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = (g2 * r1 - r4) \\ \frac{dS}{dt} = \begin{cases} -(r1 + r2 + r5) & \text{pour } S. cerevisiae \\ -(r1 + r2 + r5 + r7) & \text{pour } T. delbrueckii \end{cases} \\ \frac{dN}{dt} = -r3 \\ \frac{dN_s}{dt} = (r3 - g1 * r1) \\ \frac{dE}{dt} = 2 * r2 \\ \frac{dG}{dt} = 2 * r5 \\ \frac{dFA}{dt} = -r6 \\ \frac{dFA_i}{dt} = r6 \end{array} \right.$$

Tableau 23 Paramètres des cultures pures de levures en anaérobiose stricte

	Paramètres	Unités
Croissance	$k_{\mu}$	$h^{-1}$
	$X_{max}$	$10^6 \text{ cell/mL}$
	$K_X$	$\mu\text{g N} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$
	$gI$	(-)
	$K_E$	$\text{g/L}$
	$K_{FA}$	$\text{mg} \cdot 10^{-9} \text{ cellules}$
Fermentation	$k_s$	$h^{-1}$
	$K_S$	$\text{g/L}$
	$K_{ES}$	$\text{g/L}$
	$K_{NS}$	$\mu\text{g N} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$
Assimilation d'azote	$k_N$	$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
	$a$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
Mortalité	$E_{lim}$	$\text{g/L}$
Production de glycérol	$k_G$	$h^{-1}$
	$k_G'$	$\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
	$K_{SG}$	$\text{g/L}$
	$K_{EG}$	$\text{g/L}$
Absorption des facteurs anaérobies	$k_{FA}$	$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
$r7$	$k_{inc}$	$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
	$\mu_{crit}$	$h^{-1}$

### III.2.7. Identification des paramètres

L'initialisation des variables dont les valeurs initiales ne sont pas connues est essentielle en vue d'une identification convenable des paramètres du modèle. Dans ce modèle, les concentrations d'azote stocké et de facteurs anaérobies initiales doivent être fixées. Comme dans le modèle précédent, la concentration d'azote initial stocké est fixée à 0,05 et 1 mg N/L respectivement pour *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Il s'agit de valeurs minimales n'obstruant pas la croissance initiale des levures. La valeur initiale des facteurs anaérobies intracellulaires est fixée à 0,001 mg.10<sup>-9</sup> cellules pour les deux levures. Il s'agit d'une faible valeur permettant une réaction de croissance ( $r1$ ) non nulle et une réaction d'assimilation d'azote ( $r3$ ) strictement positive. Cette quantité de facteurs anaérobies intracellulaires à l'instant initial est négligeable devant la quantité initiale de facteurs anaérobies dans les milieux de culture. L'identification des paramètres est réalisée simultanément pour les deux milieux.

Pour les cultures pures des deux souches en anaérobiose stricte, on constate que le modèle proposé permet une représentation relativement fidèle des valeurs expérimentales (Figure 55 à Figure 58). En effet, les profils de croissance, de consommation de sucre, de production d'éthanol et de glycérol sont correctement représentés. Le modèle représente correctement la latence prolongée de *T. delbrueckii* induite par l'augmentation de la concentration initiale

de facteurs anaérobies. L'assimilation d'azote incomplète en milieu MS300 est aussi bien décrite.

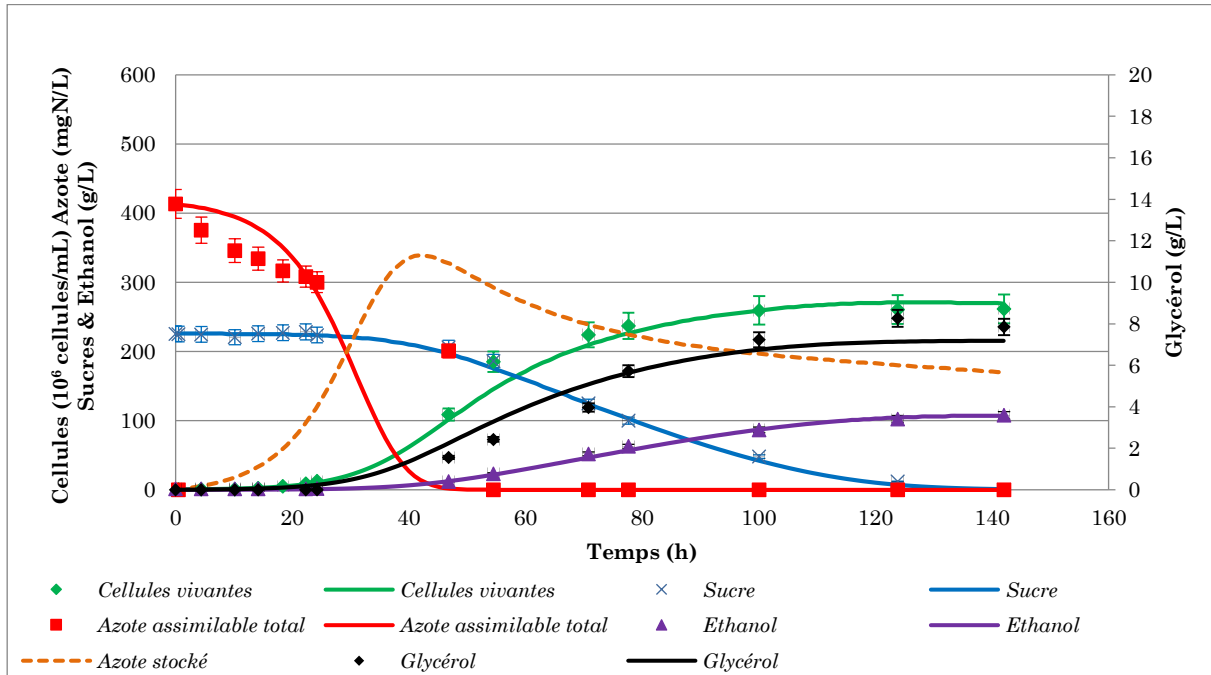


Figure 55 Confrontation du modèle avec la culture pure de *S. cerevisiae* en milieu MS300 en anaérobiose stricte.

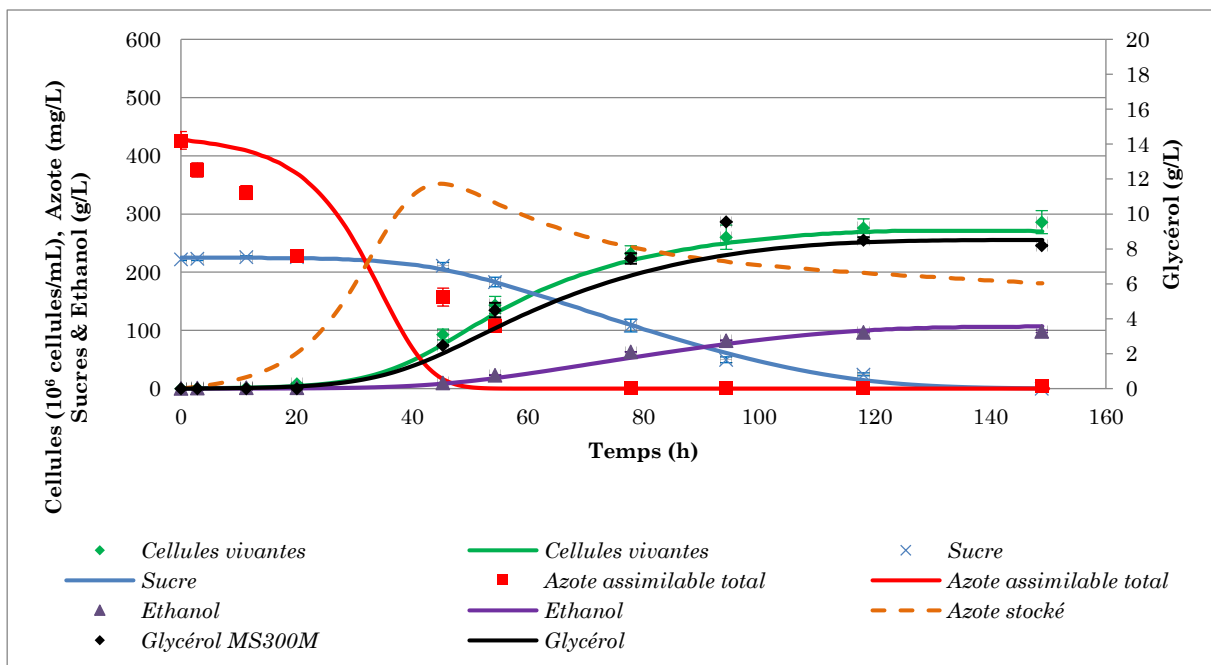


Figure 56 Confrontation du modèle avec la culture pure de *S. cerevisiae* en milieu MS300M en anaérobiose stricte.

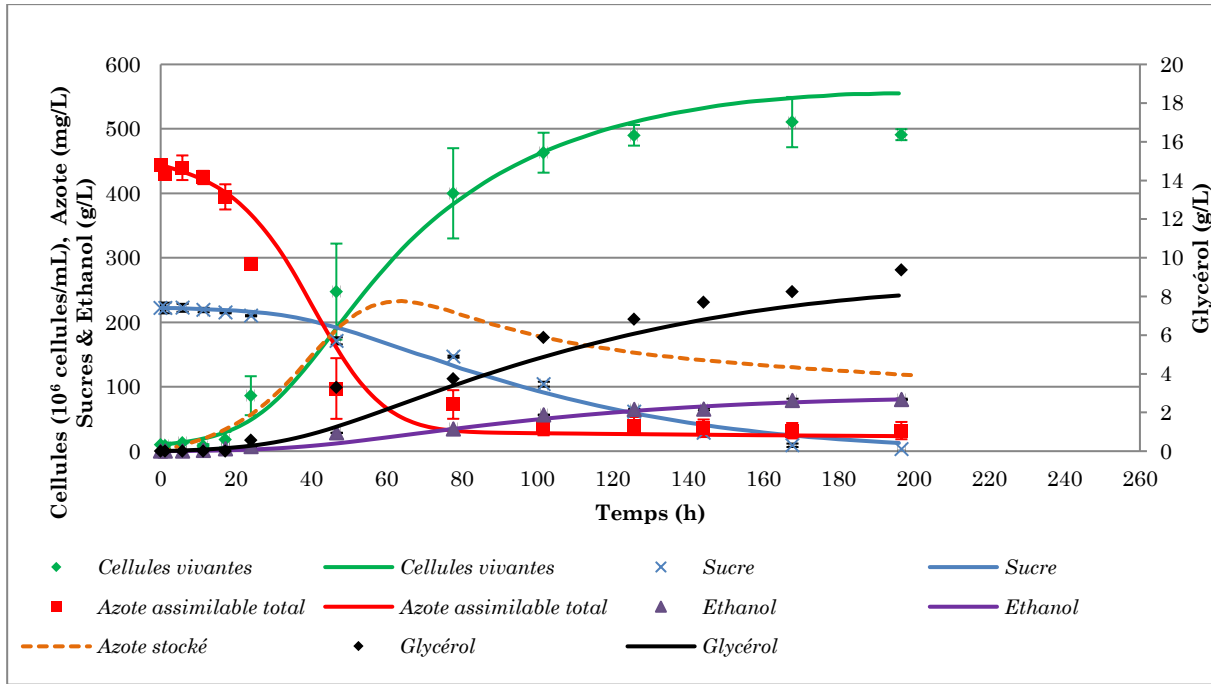


Figure 57 Confrontation du modèle avec la culture pure de *T. delbrueckii* en milieu MS300 en anaérobiose stricte.

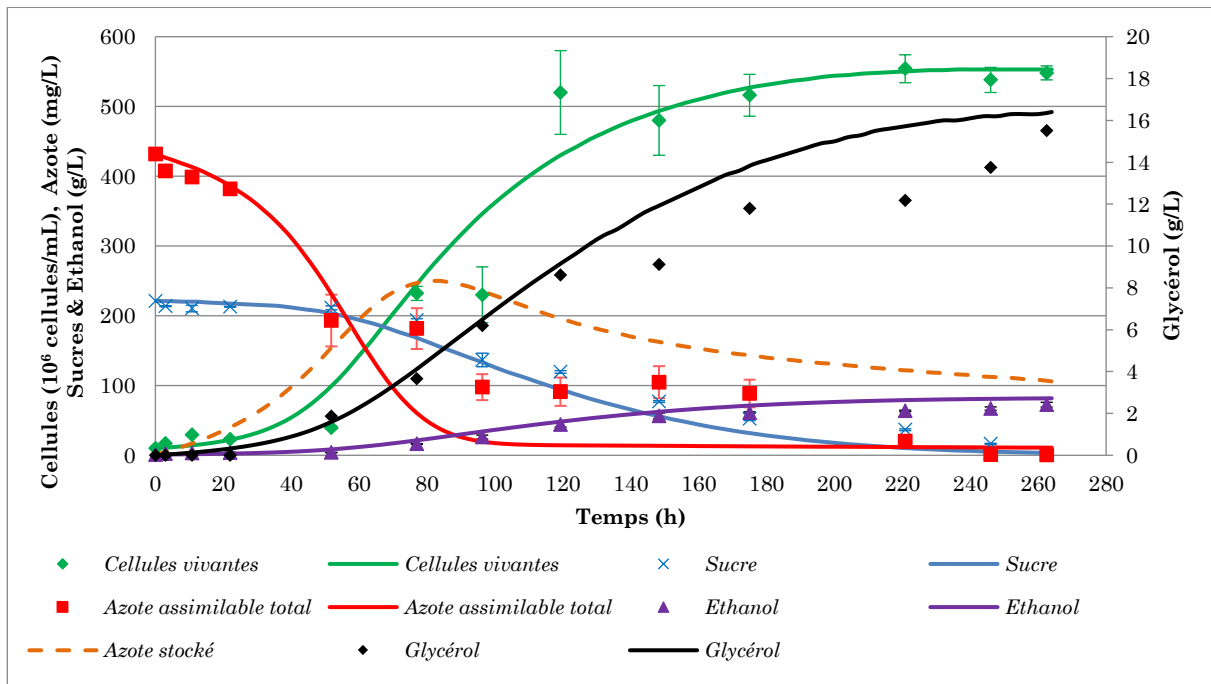


Figure 58 Confrontation du modèle avec la culture pure de *T. delbrueckii* en milieu MS300M en anaérobiose stricte.

L'ensemble des paramètres et incertitudes sont présentés dans le Tableau 24. Certains paramètres tels que  $\mu_{max}$ ,  $X_{max}$ ,  $g_l$ ,  $E_{lim}$  et  $k_s$  sont sensibles (incertitudes <20%). Ces paramètres étaient aussi les plus sensibles dans le modèle développé en anaérobiose non stricte. Les taux de croissance spécifique identifiés sont moins importants que ceux identifiés pour des expériences réalisées en anaérobiose non stricte. Le critère d'optimisation n'est pas sensible aux paramètres  $K_{NS}$ ,  $k_{FA}$ ,  $\mu_{crit}$  et  $K_X$ .

Tableau 24 Paramètres identifiés par le modèle en anaérobiose non stricte

<i>S. cerevisiae</i>		Paramètres	<i>T. delbrueckii</i>		Unités
Incertitudes	Valeurs		Valeurs	Incertitudes	
15%	0,026	$k_{\mu}$	0,021	14%	h <sup>-1</sup>
18%	306	$X_{max}$	585	14%	10 <sup>6</sup> cell/mL
2000%	1 10 <sup>-3</sup>	$K_X$	5 10 <sup>-4</sup>	2000%	μg N.10 <sup>-6</sup> cellules
708%	0,42	$g_l$	0,43	23%	(-)
79%	21	$K_E$	11	24%	g/L
1034%	74	$K_{FA}$	1	25%	mg/10 <sup>9</sup> cellules
44%	0,18	$k_s$	0,16	30%	h <sup>-1</sup>
224%	30	$K_S$	110	66%	g/L
241%	98	$K_{ES}$	33	112%	g/L
2000%	5 10 <sup>-6</sup>	$K_{NS}$	1 10 <sup>-3</sup>	1429%	μg N.10 <sup>-6</sup> cellules
347%	6,1	$k_N$	0,7	62%	L.mol <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
9%	166	$E_{lim}$	148	15%	g/L
338%	0,03	$k_G$	-		h <sup>-1</sup>
	-	$k_G'$	0,0005	391%	L.mg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
1272%	160	$K_{SG}$	50	1590%	g/L
959%	3,14	$K_{EG}$	20	1158%	g/L
	0	$\alpha$	0,005	753%	mg.L <sup>-1</sup>
2000%	4000	$k_{FA}$	4000	2000%	L.mol <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
	-	$k_{inc}$	0,015	223%	L.mol <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
	-	$\mu_{crit}$	0,004	2000%	h <sup>-1</sup>



## IV. Conclusion

La modélisation des cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* a été réalisée dans ce chapitre. L'évolution des données expérimentales, notamment celle de l'azote assimilable, a conduit au développement d'un modèle structuré. Dans ce dernier, la biomasse assimile l'azote du milieu et le répartit dans deux compartiments: le compartiment constitutif contenant une quantité minimale d'azote et le compartiment de stockage contenant les réserves d'azote.

La croissance des levures s'effectue sur la source d'azote stocké. La cinétique de croissance est inspirée du modèle logistique auquel des modifications ont été ajoutées pour tenir compte de l'inhibition par l'éthanol et de la limitation induite par le manque de réserves d'azote. En plus de l'assimilation d'azote et de la croissance le modèle proposé prend en compte la consommation de sucre et la production d'éthanol et de glycérol. Dans un premier temps, les paramètres permettant de décrire fidèlement les cinétiques expérimentales des cultures pures en anaérobiose non stricte ont été identifiés.

Pour décrire l'évolution des cultures pures en anaérobiose stricte, il a été nécessaire d'introduire des concepts supplémentaires pour prendre en compte l'arrêt de l'assimilation d'azote, l'influence des facteurs anaérobies sur la production de glycérol et la prolongation de la phase de latence observés lors des cultures pures de *T. delbrueckii*. De plus, une réaction biochimique supplémentaire a été introduite pour tenir compte des particularités du métabolisme carboné de *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte donnant lieu à la production d'un composé carboné indéterminé.

Ce modèle représente correctement l'ensemble des cinétiques expérimentales obtenues en anaérobioses stricte et non stricte. Avec les paramètres identifiés pour les cultures pures en anaérobiose, il constitue le socle de la modélisation des cultures mixtes de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* qui est exposée dans le chapitre suivant.



## CHAPITRE IV: MODELISATION DES CULTURES MIXTES DE LEVURES

---

"S'il n'existait qu'une seule vérité, on ne pourrait peindre  
des centaines de tableaux sur un même sujet."

*Pablo Picasso*

## I. Introduction

Les cultures mixtes de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont été réalisées en anaérobiose stricte dans un bioréacteur à membrane et dans les milieux de cultures MS300 et MS300M qui diffèrent par leur concentration initiale en facteurs anaérobies. Pour chaque milieu de culture, deux modalités ont été réalisées: compartimentée ou mélangée. Au cours d'une culture mixte compartimentée, les levures sont physiquement séparées par une membrane, ce qui limite leurs interactions à des phénomènes indirects. Lors d'une culture mixte mélangée, les levures sont en contact physique et les interactions sont indirectes et directes.

L'objectif de ce chapitre est de mettre en évidence les interactions entre les deux levures à travers un modèle décrivant l'évolution du milieu fermentaire des cultures mixtes. Ce travail de modélisation s'appuie sur le modèle conçu pour décrire l'évolution des cultures pures en anaérobiose stricte. Dans un premier temps, la modélisation d'un milieu dans lequel *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* sont en compétition uniquement pour les substrats sera réalisée. Les écarts entre les valeurs numériques et expérimentales seront alors le reflet de l'importance des interactions (autres que la compétition) non considérées au cours de ces simulations. Par la suite nous modéliserons les interactions indirectes qui se déroulent lorsque les deux levures sont séparées par une membrane. Enfin les interactions directes, se produisant lorsque les deux levures sont en contact physique, seront ajoutées au modèle.

L'approche globale est de modéliser l'ensemble des interactions entre les levures par une association contributive de plusieurs interactions : compétitions pour les substrats, interactions indirectes, interactions directes.

## II. Modélisation d'une compétition pour les substrats

En culture mixte, *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* sont en compétition pour consommer le sucre, l'azote assimilable et les facteurs anaérobies. La première étape consiste à modéliser l'évolution des deux levures en tenant compte uniquement de la compétition pour ces substrats. Ceci se fait en incorporant les vitesses de réactions décrites précédemment pour les cultures pures dans un système différentiel incluant l'évolution des deux levures dans le même milieu. On obtient ainsi l'ensemble des vitesses de réaction et le système différentiel suivant:

Vitesses de réaction:

$$\left\{ \begin{array}{l} r1_C = k_{\mu_C} \cdot X_{n_C} \cdot \left(1 - \frac{X_C}{X_{max_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_C}}{K_{E_C} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_C}/X_C}{N_{s_C}/X_C + K_{X_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{FAC}}{FA_{i_C}/X_C + K_{FAC}}\right) \\ r1_D = k_{\mu_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left(1 - \frac{X_D}{X_{max_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_D}}{K_{E_D} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_D}/X_D}{N_{s_D}/X_D + K_{X_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{FAD}}{FA_{i_D}/X_D + K_{FAD}}\right) \\ r2_C = k_{s_C} \cdot X_{n_C} \cdot \left(\frac{S}{S + K_{S_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_{S_C}}}{K_{E_{S_C}} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_C}/X_C}{N_{s_C}/X_C + K_{N_{S_C}}}\right) \\ r2_D = k_{s_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left(\frac{S}{S + K_{S_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_{S_D}}}{K_{E_{S_D}} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_D}/X_D}{N_{s_D}/X_D + K_{N_{S_D}}}\right) \\ r3_C = k_{N_C} \cdot X_{n_C} \cdot \left(N_{s_C} - \frac{a_C}{FA_{i_C}} N\right) \\ r3_D = k_{N_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left(N_{s_D} - \frac{a_D}{FA_{i_D}} N\right) \\ r4_C = X_{n_C} \cdot e^{\left(\frac{E - E_{lim_C}}{10}\right)} \\ r4_D = X_{n_D} \cdot e^{\left(\frac{E - E_{lim_D}}{10}\right)} \\ r5_C = k_G \cdot X_{n_C} \cdot \left(\frac{S}{S + K_{S_G_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_{G_C}}}{K_{E_{G_C}} + E}\right) \\ r5_D = k_G' \cdot X_{n_D} \cdot FA_{i_D} \cdot \left(\frac{S}{S + K_{S_G_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_{G_D}}}{K_{E_{G_D}} + E}\right) \\ r6_C = k_{FA} \cdot X_{n_C} \cdot FA \\ r6_D = k_{FA} \cdot X_{n_D} \cdot FA \end{array} \right.$$

Système différentiel:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX_C}{dt} = (g2_C * r1_C - r4_C) \\ \frac{dX_D}{dt} = (g2_D * r1_D - r4_D) \\ \frac{dS}{dt} = -(r1_C + r1_D + r2_C + r2_D + r5_C + r5_D) \\ \frac{dN}{dt} = -(r3_C + r3_D) \\ \frac{dN_{s_C}}{dt} = (r3_C - g1_C * r1_C) \\ \frac{dN_{s_D}}{dt} = (r3_D - g1_D * r1_D) \\ \frac{dE}{dt} = 2 * (r2_C + r2_D) \\ \frac{dG}{dt} = r5_C + r5_D \\ \frac{dFA}{dt} = -(r6_C + r6_D) \\ \frac{dFA_{i_D}}{dt} = r6_C \\ \frac{dFA_{i_D}}{dt} = r6_D \end{array} \right.$$

Les indices C et D désignent respectivement *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. La réaction r7 de production d'un métabolite organique inconnu a été observée uniquement lors de la culture pure de *T. delbrueckii*, elle n'est pas considérée au cours de la modélisation des cultures mixtes.

La compétition pour les substrats implique que chaque levure n'interagit avec sa compétitrice que par le biais des substrats considérés. Connaissant les valeurs expérimentales initiales, la simulation des cultures mixtes est réalisée en utilisant les paramètres identifiés pour les cultures pures. Les simulations de la compétition pour les substrats sont confrontées aux cinétiques expérimentales des cultures mixtes mélangées et compartimentées (Figure 59 et Figure 62).

La simulation sous-estime la croissance initiale de *T. delbrueckii* et ne représente pas la diminution de cellules vivantes de cette levure au cours de la culture compartimentée en milieu MS300 (Figure 59).

Au cours de la culture compartimentée en milieu MS300M, la simulation sous-évalue la croissance globale de *T. delbrueckii*, surévalue celle de *S. cerevisiae* tout en fournissant des cinétiques d'évolution de sucre, d'azote assimilable et d'éthanol proches des valeurs expérimentales (Figure 60). La seule prise en compte de la compétition pour les substrats ne permet donc pas de décrire l'évolution des cinétiques expérimentales des cultures mixtes compartimentées.

Au cours des cultures mixtes mélangées, la cinétique de croissance varie en fonction du milieu de culture. D'une part, une augmentation de la vitesse de croissance de *T. delbrueckii* ainsi qu'une réduction ultérieure du nombre de cellules vivantes de *T. delbrueckii* en milieu

MS300 sont observées. D'autre part, une augmentation de la croissance de *T. delbrueckii* et une limitation de celle de *S. cerevisiae* en milieu MS300M sont constatées. Bien que ces interactions n'aient pas le même impact selon la quantité initiale de facteurs anaérobies, elles ont tendance à induire une augmentation de la croissance initiale de *T. delbrueckii*. Tout comme les cultures compartimentées, la simulation ne représente pas fidèlement, l'évolution des cinétiques de croissance des levures en cultures mixtes mélangées (Figure 61Figure 62).

Par conséquent, il est nécessaire d'inclure des phénomènes supplémentaires dans le modèle pour décrire ces interactions supplémentaires entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*.

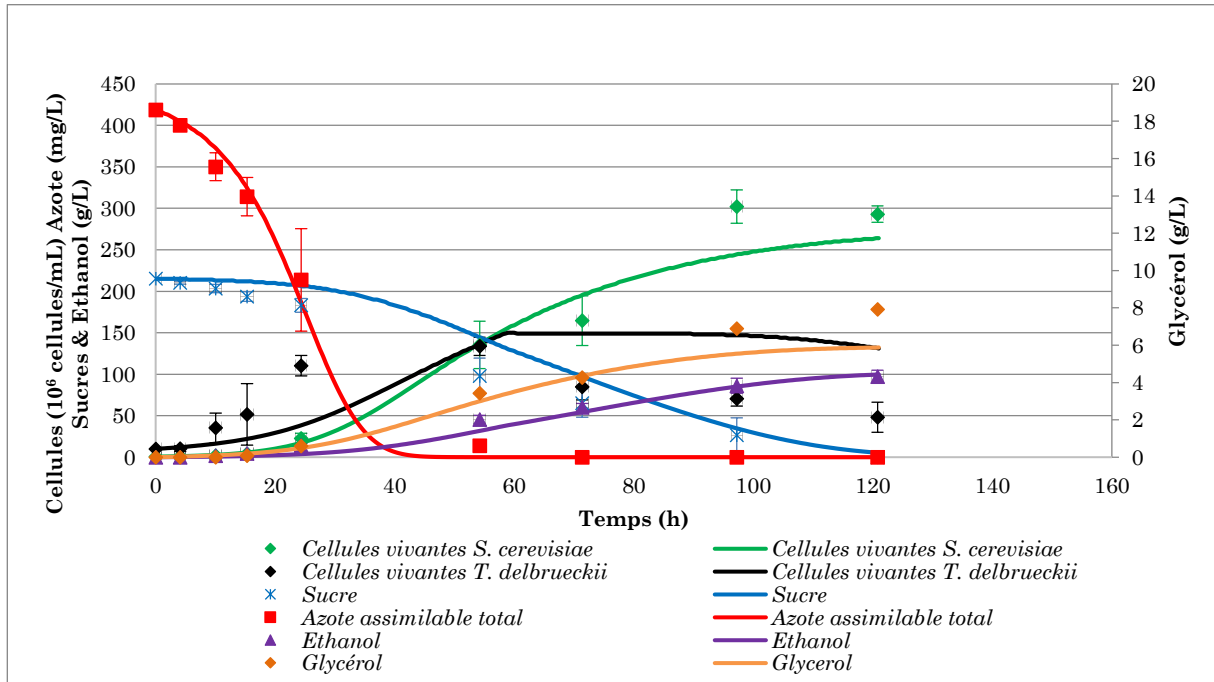


Figure 59 Simulation des cultures mixtes de levures en milieu MS300 en présence de membrane.

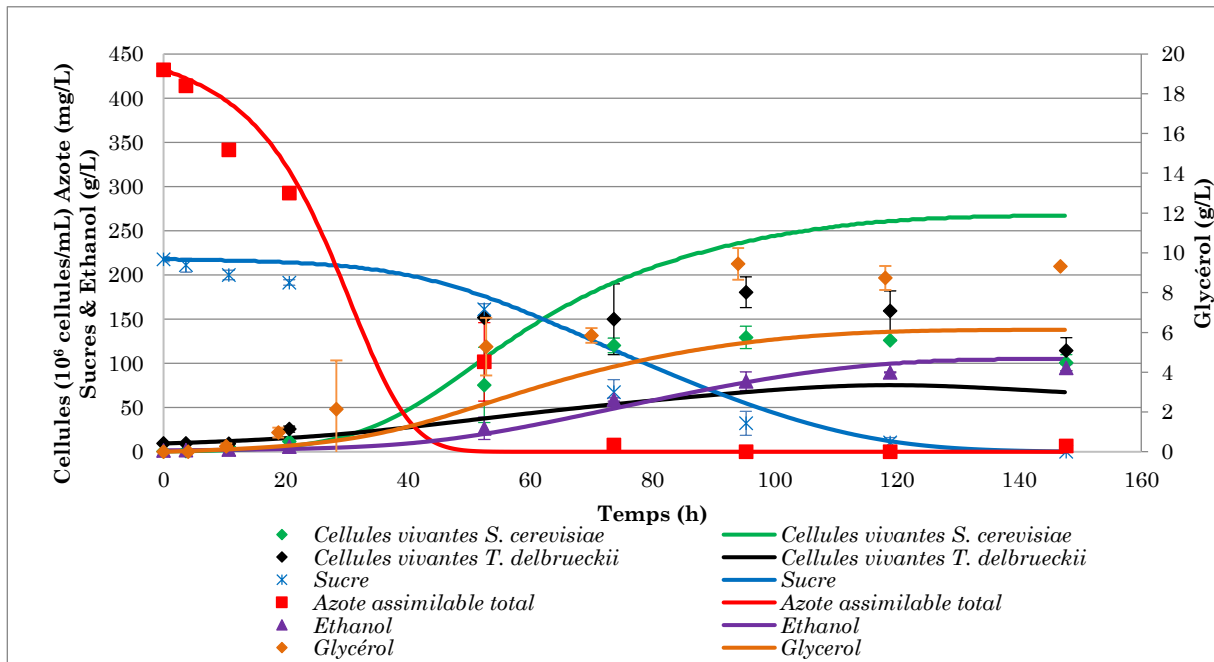


Figure 60 Simulation des cultures mixtes de levures en milieu MS300M en présence de membrane.

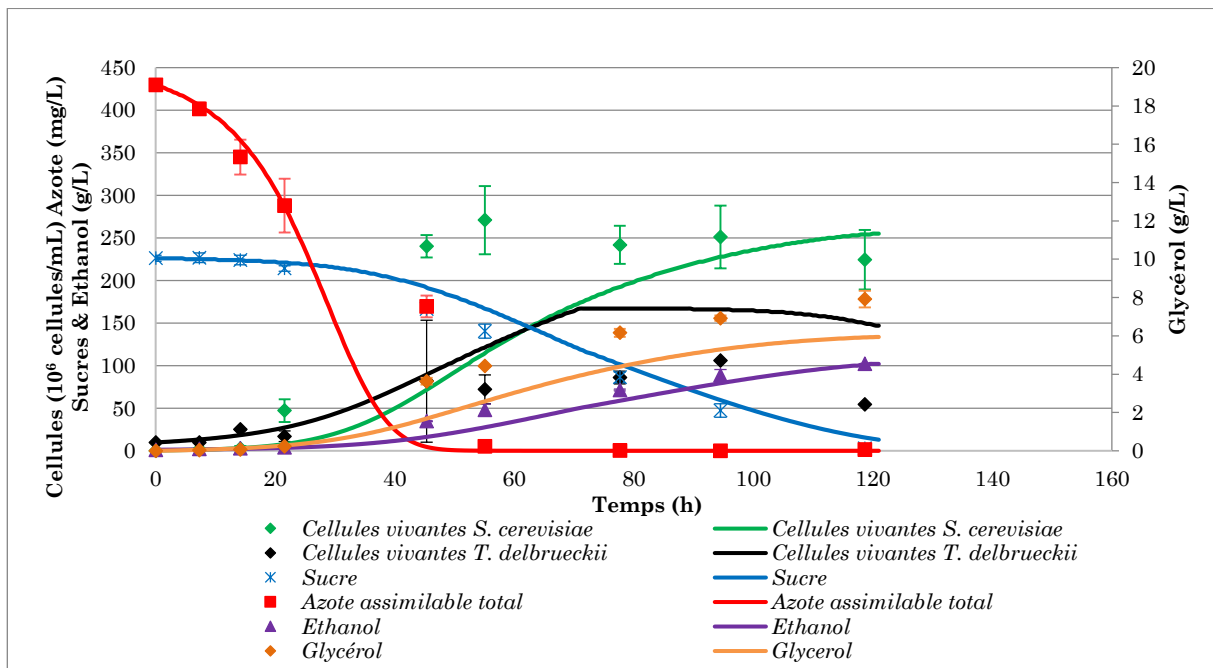


Figure 61 Simulation des cultures mixtes de levures en milieu MS300 en absence de membrane.

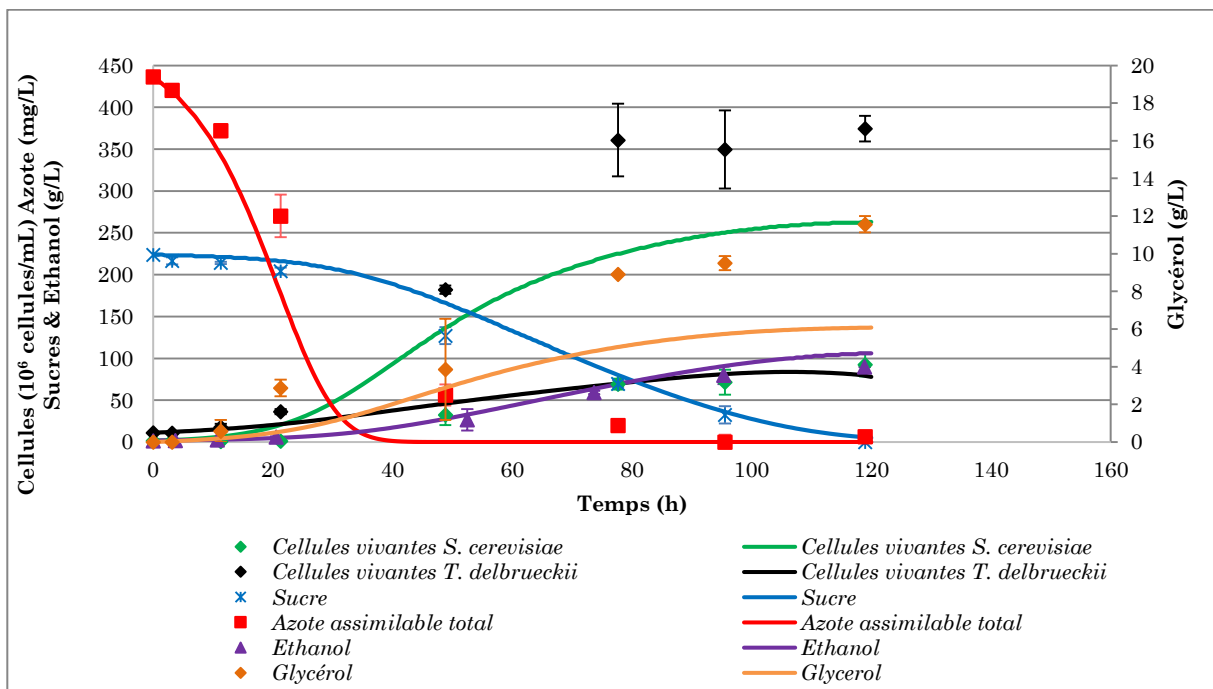


Figure 62 Simulation des cultures mixtes de levures en milieu MS300M en absence de membrane.



### III. Modélisation des interactions indirectes

Prendre en compte uniquement la compétition pour les substrats ne permet pas de décrire fidèlement l'évolution des cinétiques de populations. En effet, en plus de cette compétition pour les substrats, *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* interagissent par le biais d'autres mécanismes. Nous présentons dans ce paragraphe l'ensemble des phénomènes considérés lors de la modélisation des cultures mixtes en présence de membrane. Il s'agit donc des interactions indirectes par lesquelles chaque levure réagit à la présence de l'autre.

#### III.1. Accélération de la croissance

Les résultats expérimentaux montrent que, comparé à leur culture pure, la coculture de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* induit une stimulation réciproque de la croissance de chaque levure. Lors de la coculture de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*, Tronchoni *et al.*, 2017 ont observé que la croissance de chaque levure est stimulée par la présence de la levure compétitrice. Dans notre modèle, l'influence d'une levure sur la croissance de l'autre est prise en compte à l'aide des constantes positives  $\alpha$  et  $\beta$  (Equation 22(Equation 23)).

$$r1_C = k_{\mu_C} \cdot X_{n_C} \cdot \left(1 - \frac{X_C}{X_{max_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_C}}{K_{E_C} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_C}/X_C}{N_{s_C}/X_C + K_{X_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{FA_C}}{FA_{i_C}/X_C + K_{FA_C}}\right) \cdot (1 + \beta \cdot X_D)$$

(Equation 22)

$$r1_D = k_{\mu_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left(1 - \frac{X_D}{X_{max_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_D}}{K_{E_D} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_D}/X_D}{N_{s_D}/X_D + K_{X_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{FA_D}}{FA_{i_D}/X_D + K_{FA_D}}\right) \cdot (1 + \alpha \cdot X_C)$$

(Equation 23)

#### III.2. Compétition pour l'espace

Nissen et Arneborg (2003) ont observé qu'en culture mixte, chaque espèce arrête de croître en réponse à la densité cellulaire de l'autre espèce. Ce phénomène, observé au cours de la co-inoculation de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, est assimilé à une compétition des deux levures pour un espace disponible limité (Arneborg *et al.*, 2005). La croissance de *T. delbrueckii*, aussi bien que celle de *S. cerevisiae*, sont entravées par ce phénomène dont les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus.

Dans notre modèle, pour décrire la compétition pour l'espace, on introduit la variable numérique  $X_T$  qui correspond à la somme des cellules vivantes pondérées du bioréacteur (Equation 24). En effet, *T. delbrueckii* étant moins volumineuse que *S. cerevisiae*, on estime qu'une cellule de *S. cerevisiae* a une contribution dans la densité cellulaire totale plus importante qu'une cellule de *T. delbrueckii*. Le facteur de pondération  $(1 + b)$  atteste d'un

poids relatif de *S. cerevisiae* plus important. Lorsque la population totale pondérée atteint une valeur maximale  $X_{T_{max}}$ , la réaction de croissance de chaque levure devient nulle. On suppose que la compétition pour l'espace n'est pas affectée par la présence de la membrane.

$$X_T = (1 + b) X_C + X_D \quad (\text{Equation 24})$$

Au cours de la culture mixte compartimentée en milieu MS300M, les deux levures arrêtent de croître lorsque la population totale atteint  $300 \cdot 10^6$  cellules/mL (Figure 63). A cet instant, les cellules vivantes de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* sont respectivement de  $125$  et  $175 \cdot 10^6$  cellules/mL. Au cours de la culture mixte mélangée dans ce milieu MS300M, une population totale maximale de  $466 \cdot 10^6$  cellules/mL est atteinte en fin de fermentation. Cela suggère que la quantité d'azote assimilable disponible n'est pas limitante et que l'arrêt de la croissance observé en culture mixte compartimentée est probablement dû à la compétition pour l'espace. En passant d'une culture mixte compartimentée à une culture mixte mélangée, on observe une augmentation des cellules vivantes maximales de *T. delbrueckii* de  $195 \cdot 10^6$  cellules/mL et une diminution des cellules vivantes maximales de *S. cerevisiae* de  $31 \cdot 10^6$  cellules/mL. Le ratio des variations de cellules maximales précédemment citées est de 6,2. En milieu MS300M, le terme  $(1 + b)$  est donc supérieur ou égal à cette valeur.

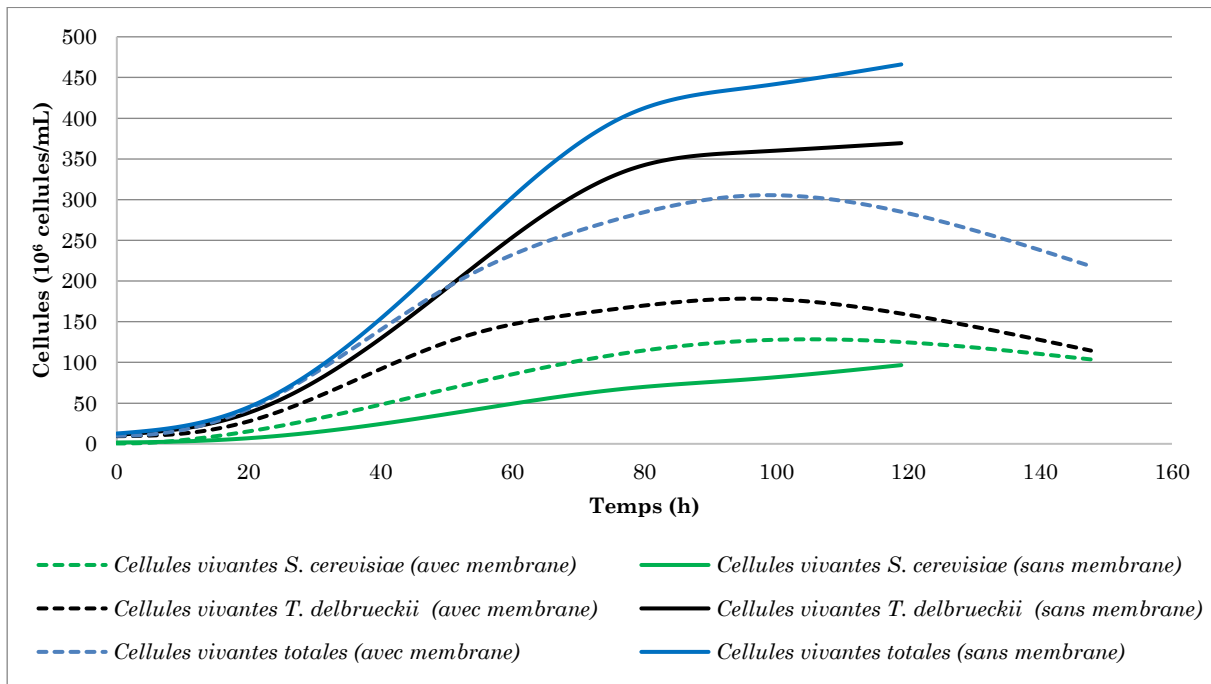


Figure 63 Profils de croissance observés lors des cultures mixtes en milieu MS300M.

Au cours de la culture mixte sans membrane en milieu MS300, les cellules vivantes maximales atteignent  $350 \cdot 10^6$  cellules/mL et sont constituées de  $270 \cdot 10^6$  cellules/mL de *S. cerevisiae* et de  $80 \cdot 10^6$  cellules/mL de *T. delbrueckii* (Figure 64). En comparant ces valeurs à celles observées en milieu MS300M lorsque la compétition pour l'espace est suspectée, on se rend compte que la culture mixte sans membrane en milieu MS300 contient  $145 \cdot 10^6$  cellules/mL de *S. cerevisiae* en plus et  $95 \cdot 10^6$  cellules/mL de *T. delbrueckii* en moins. La

valeur du terme  $(1 + b)$  est inférieure ou égale à 1,5. Les valeurs du terme  $(1 + b)$  déterminées en milieu MS300 et MS300M ne sont pas compatibles.

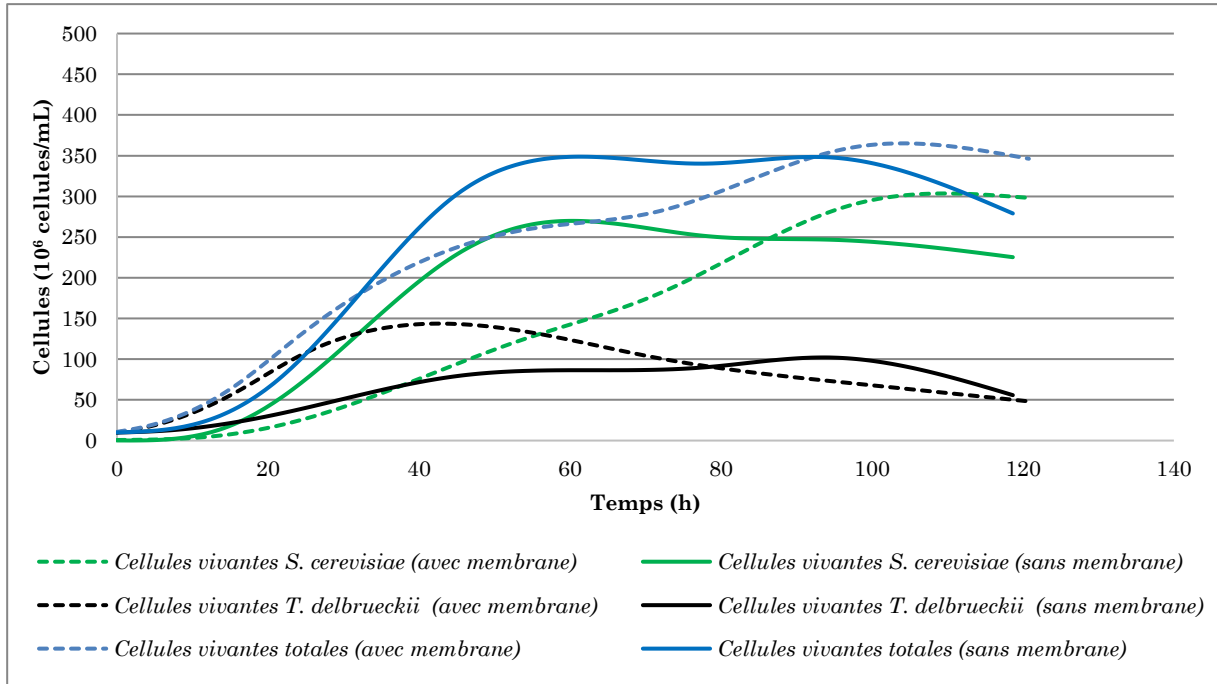


Figure 64 Profils de croissance observés lors des cultures mixtes en milieu MS300.

La compétition pour l'espace dans les milieux MS300 et MS300M ne peut être décrite avec le même jeu de paramètres  $b$  et  $X_{T_{max}}$ . De ce fait, les facteurs anaérobies interviennent dans l'expression numérique de la compétition pour l'espace. En posant  $X_{T_{max}}$  constante, il convient de déterminer une expression permettant de refléter l'influence des facteurs anaérobies sur le paramètre  $b$ . Les facteurs anaérobies sont épuisés durant les premières heures de la fermentation bien avant l'apparition de l'arrêt de la croissance induite par la compétition pour l'espace. Le poids relatif de *S. cerevisiae* par rapport à *T. delbrueckii* est plus important en milieu MS300M. Par ailleurs, la vitesse de consommation spécifique de facteurs anaérobies est supposée identique pour *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. La quantité relative de facteurs anaérobies absorbés par chaque levure dépend du ratio d'inoculation:

$$\frac{r_{6D}}{r_{6C}} = \frac{k_{FA} \cdot X_D \cdot FA}{k_{FA} \cdot X_C \cdot FA} = \frac{X_D}{X_C}$$

La ratio cible est de 20/1 (*T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*). Les valeurs expérimentales indiquent que le ratio d'inoculation est plus élevé au cours des cultures mixtes réalisées en milieu MS300M (Tableau 25). Par conséquent, le ratio  $\frac{FA_{iD}}{FA_{iC}}$  sera plus élevé dans ce milieu de culture.

Tableau 25 Valeurs expérimentales du ratio d'inoculation

Milieu de culture	MS300	MS300M
Culture mixte compartimentée	18,7	20,0
Culture mixte mélangée	19,6	22,2

En milieu MS300M, le ratio  $\frac{FA_{iD}}{FA_{iC}}$  et le terme  $(1 + b)$  sont donc plus importants qu'en milieu MS300. Ainsi, ce ratio est utilisé pour prendre en compte l'influence des facteurs anaérobies sur le poids relatif de *S. cerevisiae* (Equation 25).

$$X_T = \left(1 + \omega * \frac{FA_{iD}}{FA_{iC}}\right) X_C + X_D \quad (\text{Equation 25})$$

Il y a donc 2 paramètres à identifier pour tenir compte de la compétition pour l'espace:  $X_{T_{max}}$  et  $\omega$ .

### III.3. Toxines antimicrobiennes

Au cours de la culture mixte compartimentée réalisée en milieu MS300, on a observé une réduction significative de la quantité de cellules vivantes de *T. delbrueckii* entre 50 et 100h. Cette baisse du nombre de cellules vivantes de *T. delbrueckii* ne peut être expliquée par une compétition pour l'espace ou le substrat. Elle est due à une autre interaction indirecte avec *S. cerevisiae*.

De nombreuses études ont mise en avant la sécrétion par *S. cerevisiae* de toxines induisant la mort de levures non-*Saccharomyces* (Soares and Sato, 1999; Albergaria et al., 2010; Rodriguez-Cousino et al., 2011; Branco et al., 2014, 2015; Kemsawasd et al., 2015b; Branco et al., 2017b, 2017a). Ces travaux et nos observations nous amènent à adapter l'expression de la mortalité de *T. delbrueckii*. Celle-ci comporte un terme supplémentaire lié à l'action d'une toxine ( $T$ ) supposée sécrétée par *S. cerevisiae* (Equation 26). La quantité de cellules de *T. delbrueckii* tuées par cette action toxique est supposée suivre une loi cinétique du premier ordre par rapport à la quantité de toxine dans le milieu, ainsi que par rapport à la population de *T. delbrueckii* présente.

$$r_{4D} = X_D \cdot e^{\left(\frac{E-E_{limD}}{10}\right)} + \rho \cdot X_D \cdot T \quad (\text{Equation 26})$$

Les travaux d'Alfenore (1999) ont montré un couplage entre la vitesse de production de toxines killer par *S. cerevisiae* et la vitesse de croissance. Ce couplage s'exprime par une proportionnalité stricte entre les deux vitesses (production de toxines et production de levures). Pour minimiser le nombre de paramètres à identifier, nous assimilons la vitesse de production de toxines à la vitesse de croissance de *S. cerevisiae*. La consommation de la toxine est liée à la probabilité de rencontre entre une toxine et une cellule de *T. delbrueckii*. La vitesse de consommation de toxines suit une cinétique d'ordre 1 par rapport à la quantité de toxine et par rapport à quantité de cellules sensibles. L'évolution de la concentration de toxine dans le milieu est décrite par l'équation suivante:

$$\frac{dT}{dt} = r_{1C} - \sigma \cdot X_D \cdot T \quad (\text{Equation 27})$$

Au cours de la culture mixte compartimentée réalisée en milieu MS300M, l'évolution de la population de *T. delbrueckii* ne suggère aucune mortalité induite par la présence indirecte

de *S. cerevisiae*. Les facteurs anaérobies semblent jouer un rôle protecteur pour *T. delbrueckii*. On suppose qu'en augmentant la concentration initiale de facteurs anaérobies, la quantité de facteurs anaérobies absorbés par *T. delbrueckii* en culture mixte augmente. Ainsi la composition lipidique des membranes de *T. delbrueckii* ne serait pas identique entre les milieux de culture MS300 et MS300M. L'interaction entre les toxines et la membrane des cellules sensibles constitue la première étape de l'activité toxique (Harris *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2011). La composition lipidique de la membrane joue un rôle primordial dans cette interaction (Kagan *et al.*, 1994). En effet, les cellules résistantes à la lyse induite par des toxines antimicrobiennes ont une composition lipidique différente de celle des cellules sensibles (Izadpanah et Gallo, 2005). Pour tenir compte du rôle des facteurs anaérobies dans la mortalité induite par la présence de *S. cerevisiae*, on introduit le paramètre  $\left(\frac{FA_{iD}}{X_D}\right)_{seuil}$ . Il s'agit de la concentration spécifique en facteurs anaérobies à partir de laquelle les toxines de *S. cerevisiae* n'induisent pas la mort de *T. delbrueckii*:

$$\begin{cases} Si \frac{FA_{iD}}{X_D} \geq \left(\frac{FA_{iD}}{X_D}\right)_{seuil} & r_{4D} = X_D \cdot e^{\left(\frac{E-E_{limD}}{10}\right)} \\ Si \frac{FA_{iD}}{X_D} < \left(\frac{FA_{iD}}{X_D}\right)_{seuil} & r_{4D} = X_D \cdot e^{\left(\frac{E-E_{limD}}{10}\right)} + \rho \cdot X_D \cdot T \end{cases}$$

### III.4. Confrontation avec les données expérimentales

La prise en compte de l'ensemble des interactions indirectes permet d'aboutir aux vitesses de réaction et au système différentiel suivant :

Vitesses de réaction:

$$\left\{ \begin{array}{l}
 X_T = \left( 1 + \omega * \frac{FA_{iD}}{FA_{iC}} \right) X_C + X_D \\
 \text{Si } X_C + X_D < X_{Tmax}, \\
 r1_C = k_{\mu C} \cdot X_{n_C} \cdot \left( 1 - \frac{X_C}{X_{maxC}} \right) \cdot \left( \frac{K_{EC}}{K_{EC} + E} \right) \cdot \left( \frac{N_{sC}/X_C}{N_{sC}/X_C + K_{XC}} \right) \cdot \left( \frac{K_{FAC}}{FA_{iC}/X_C + K_{FAC}} \right) \cdot (1 + \beta \cdot X_D) \\
 r1_D = k_{\mu D} \cdot X_{n_D} \cdot \left( 1 - \frac{X_D}{X_{maxD}} \right) \cdot \left( \frac{K_{ED}}{K_{ED} + E} \right) \cdot \left( \frac{N_{sD}/X_D}{N_{sD}/X_D + K_{XD}} \right) \cdot \left( \frac{K_{FAD}}{FA_{iD}/X_D + K_{FAD}} \right) \cdot (1 + \alpha \cdot X_C) \\
 \text{Si } X_C + X_D > X_{Tmax}, \quad r1_C = 0 \text{ et } r1_D = 0 \\
 r2_C = k_{s_C} \cdot X_{n_C} \cdot \left( \frac{S}{S + K_{SC}} \right) \cdot \left( \frac{K_{ESC}}{K_{ESC} + E} \right) \cdot \left( \frac{N_{sC}/X_C}{N_{sC}/X_C + K_{NSC}} \right) \\
 r2_D = k_{s_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left( \frac{S}{S + K_{SD}} \right) \cdot \left( \frac{K_{ESD}}{K_{ESD} + E} \right) \cdot \left( \frac{N_{sD}/X_D}{N_{sD}/X_D + K_{NSD}} \right) \\
 r3_C = k_{N_C} \cdot X_{n_C} \cdot \left( N_{sC} - \frac{a_C}{FA_{iC}} N \right) \\
 r3_D = k_{N_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left( N_{sD} - \frac{a_D}{FA_{iD}} N \right) \\
 r4_C = X_{n_C} \cdot e^{\left( \frac{E - E_{limC}}{10} \right)} \\
 r4_D = X_{n_D} \cdot e^{\left( \frac{E - E_{limD}}{10} \right)} + \rho \cdot X_{n_D} \cdot T \\
 r5_C = k_G \cdot X_{n_C} \cdot \left( \frac{S}{S + K_{SGC}} \right) \cdot \left( \frac{K_{EGC}}{K_{EGC} + E} \right) \\
 r5_D = k_G' \cdot X_{n_D} \cdot FA_{iD} \cdot \left( \frac{S}{S + K_{SGD}} \right) \cdot \left( \frac{K_{EGD}}{K_{EGD} + E} \right) \\
 r6_C = k_{FA} \cdot X_{n_C} \cdot FA \\
 r6_D = k_{FA} \cdot X_{n_D} \cdot FA
 \end{array} \right.$$

Système différentiel:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX_C}{dt} = (g_{2C} * r_{1C} - r_{4C}) \\ \frac{dX_D}{dt} = (g_{2D} * r_{1D} - r_{4D}) \\ \frac{dS}{dt} = -(r_{1C} + r_{1D} + r_{2C} + r_{2D} + r_{5C} + r_{5D}) \\ \frac{dN}{dt} = -(r_{3C} + r_{3D}) \\ \frac{dN_{sC}}{dt} = (r_{3C} - g_{1C} * r_{1C}) \\ \frac{dN_{sD}}{dt} = (r_{3D} - g_{1D} * r_{1D}) \\ \frac{dE}{dt} = 2 * (r_{2C} + r_{2D}) \\ \frac{dG}{dt} = r_{5C} + r_{5D} \\ \frac{dFA}{dt} = -(r_{6C} + r_{6D}) \\ \frac{dFA_{iD}}{dt} = r_{6C} \\ \frac{dFA_{iD}}{dt} = r_{6D} \\ \frac{dT}{dt} = r_{1C} - \sigma * X_D * T \end{array} \right.$$

Les valeurs des paramètres identifiés sont présentées dans le Tableau 26. Ces paramètres ont été identifiés simultanément pour les cultures compartimentées en milieu MS300 et MS300M. En plus de la compétition pour les substrats, la prise en compte de l'accélération de la croissance, de la compétition pour l'espace et de la mortalité de *T. delbrueckii* liée à une toxine permet une représentation correcte des cultures mixtes compartimentées (Figure 65 et Figure 66). On constate néanmoins que le modèle sous-évalue la vitesse de consommation de sucre en milieu MS300M. Certes, considérer l'impact de chaque levure sur la vitesse de consommation spécifique des sucres de l'autre levure contribuerait à améliorer le modèle, mais cela induirait l'ajout de paramètres supplémentaires. Nous nous sommes donc limités aux trois phénomènes précédemment cités.

Tableau 26 Paramètre identifiés pour décrire la culture les cultures compartimentées

Paramètres	Valeurs	Incertitudes	Unités
$\alpha$	0,15	54%	mL/10 <sup>6</sup> cellules
$\beta$	0,005	96%	mL/10 <sup>6</sup> cellules
$X_{T_{max}}$	445	18%	10 <sup>6</sup> cellules/mL
$\omega$	0,09	83%	-
$\left(\frac{FA_{iD}}{X_D}\right)_{seuil}$	0,08	132%	µg/10 <sup>6</sup> cellules
$\rho$	9	58%	L/mol/h
$\sigma$	5,7	18%	L/mol/h

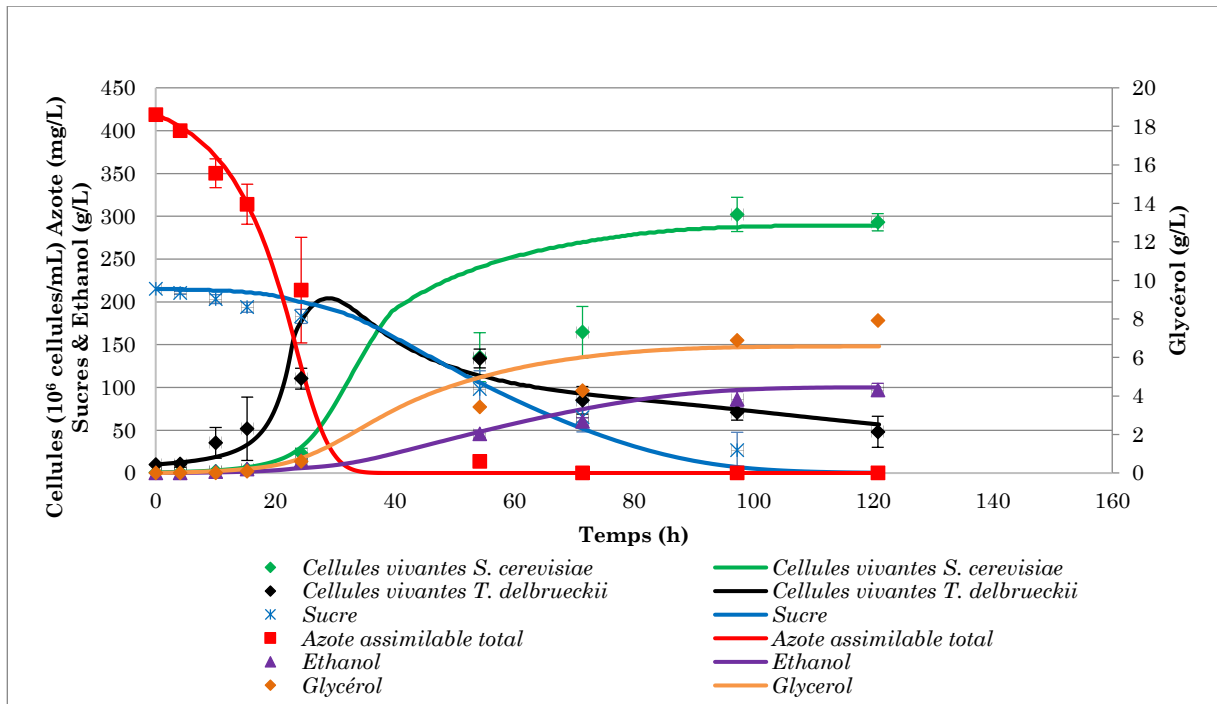


Figure 65 Confrontation du modèle avec la culture compartimentée de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en milieu MS300.

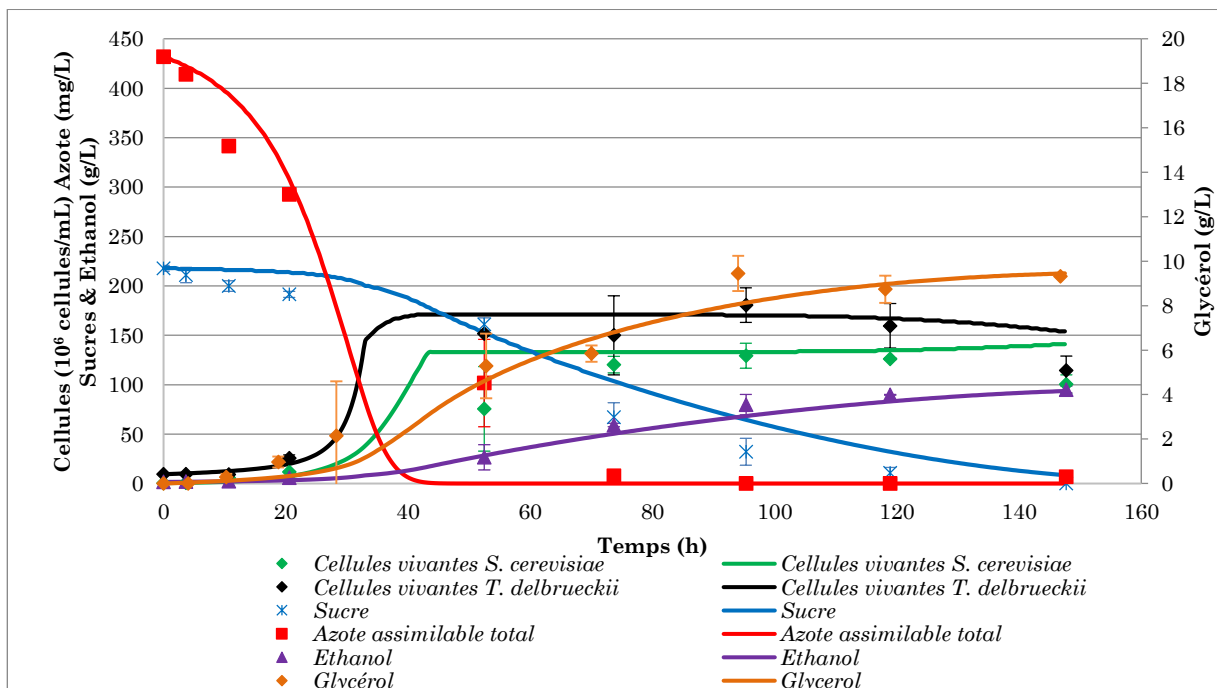


Figure 66 Confrontation du modèle avec la culture compartimentée de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en milieu MS300M.



## IV. Modélisation des interactions directes

Les cultures mixtes mélangées (sans membrane) ont été réalisées en milieu MS300 et MS300M. Selon la quantité initiale de facteurs anaérobies, le contact physique entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* n'a pas le même impact (cf.chapitre II). En effet, nous avons observé que *S. cerevisiae* domine la coculture compartimentée en milieu MS300 alors que *T. delbrueckii* domine lorsqu'on augmente la concentration initiale en facteurs anaérobies. L'introduction dans le modèle de mécanismes d'interactions directes est donc nécessaire.

### IV.1. Ratio de facteurs anaérobies absorbés

La cinétique d'absorption des facteurs anaérobies se déroule en quelques heures. Celle-ci est liée au ratio d'inoculation. Les ratios d'inoculation expérimentaux étaient de 19,6 et 22,2 respectivement en milieu MS300 et MS300M. Le ratio de facteurs anaérobies absorbés  $\frac{FA_{iC}}{FA_{iD}}$  est estimé à 0,087 et 0,076 respectivement pour les milieux MS300 et MS300M. Au cours des cultures mixtes mélangées, *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ont un comportement extrêmement différent lorsqu'on change la quantité initiale de facteurs anaérobies. Pour décrire le caractère abrupt du changement de comportement des levures en fonction du ratio de facteurs anaérobies absorbés, on introduit le paramètre  $\pi$ . Il correspond à un ratio de facteurs anaérobies absorbés à partir duquel les levures changent de comportement. Il est compris entre 0,076 et 0,087, par conséquent, le terme  $\left(\frac{FA_{iC}}{FA_{iD}} - \pi\right)$  aura un signe positif ou négatif selon le milieu de culture considéré.

### IV.2. Accélération de la croissance

L'influence d'une levure sur la croissance de sa compétitrice est prise en compte à l'aide des constantes positives  $\alpha_2$  et  $\beta_2$  (Equation 28 (Equation 29). Le terme  $\alpha_2$  permet de prendre en compte l'impact du contact physique sur la croissance de *T. delbrueckii*. Le terme  $\beta_2 \cdot \left(\frac{FA_{iC}}{FA_{iD}} - \pi\right)$  représente l'effet du contact physique sur la croissance de *S. cerevisiae*.

$$r_{1C} = X_C \cdot X_{n_C} \cdot \left(1 - \frac{X_C}{X_{max_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_C}}{K_{E_C} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_C}/X_C}{N_{s_C}/X_C + K_{X_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{FA_C}}{FA_{iC}/X_C + K_{FA_C}}\right) \cdot \left(1 + X_D \cdot \beta_2 \cdot \left(\frac{FA_{iC}}{FA_{iD}} - \pi\right)\right)$$

(Equation 28)

$$r_{1D} = X_D \cdot X_{n_D} \cdot \left(1 - \frac{X_D}{X_{max_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{E_D}}{K_{E_D} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_D}/X_D}{N_{s_D}/X_D + K_{X_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{FA_D}}{FA_{iD}/X_D + K_{FA_D}}\right) \cdot (1 + X_C \cdot \alpha_2)$$

(Equation 29)

### IV.3. Modification de l'absorption d'azote

Les capacités d'assimilation d'azote d'une levure peuvent être influencées par la présence d'une levure compétitrice dans un milieu de culture commun. En effet, Barbosa *et al.* (2015), ont observé que le contact physique avec *H. guilliermondii* entraînait une nette réduction de l'expression des gènes codant pour les transporteurs d'acides aminés et les perméases d'ammonium de *S. cerevisiae*. Les constantes  $\delta$  et  $\gamma$  permettent de décrire les effets du contact physique sur l'assimilation de l'azote par *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* respectivement (Equation 30(Equation 31)).

$$r_{3C} = k_{N_C} \cdot X_{n_C} \cdot \left( N_{s_C} - \frac{a_C}{FA_{i_C}} N \right) \cdot \left( 1 + \delta \cdot \left( \frac{FA_{i_C}}{FA_{i_D}} - \pi \right) \right) \quad (\text{Equation 30})$$

$$r_{3D} = k_{N_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left( N_{s_D} - \frac{a_D}{FA_{i_D}} N \right) \cdot \left( 1 + \gamma \cdot \left( \frac{FA_{i_C}}{FA_{i_D}} - \pi \right) \right) \quad (\text{Equation 31})$$

### IV.4. Stimulation de l'activité glycolytique

En culture pure, *S. cerevisiae* consomme le sucre plus vite que *T. delbrueckii*. Paradoxalement, en milieu MS300M, la culture mixte mélangée, dans laquelle *T. delbrueckii* était plus prépondérante, présentait une vitesse de consommation de sucre plus élevée qu'en culture mixte compartimentée (1,88 vs 1,47 g.L.h<sup>-1</sup>). Cette observation rappelle la stimulation de l'activité glycolytique de chaque levure observée par Tronchoni *et al.*, (2017) lorsque *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* sont en contact physique. Cette stimulation est due à une augmentation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse.

En milieu MS300M, *T. delbrueckii* domine les cultures mixtes. Lorsqu'on retire la membrane, on observe une augmentation de la vitesse moyenne de fermentation, suggérant une stimulation de l'activité glycolytique de *T. delbrueckii* induite par le contact physique. Les cultures mixtes réalisées en milieu MS300 ne suggèrent pas un tel phénomène. Ainsi, on suppose que les facteurs anaérobies jouent un rôle dans la stimulation de l'activité glycolytique de *T. delbrueckii*. La stimulation de l'activité glycolytique induit une augmentation des vitesses de production d'éthanol et de glycérol. Cette augmentation est reflétée par la constante  $\lambda$  (Equation 32(Equation 33)).

$$r_{2D} = k_{s_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left( \frac{S}{S + K_{s_D}} \right) \cdot \left( \frac{K_{ES_D}}{K_{ES_D} + E} \right) \cdot \left( \frac{N_{s_D}/X_D}{N_{s_D}/X_D + K_{NS_D}} \right) \cdot \left( 1 + \lambda \cdot \frac{FA_{i_D}}{FA_{i_C}} \right) \quad (\text{Equation 32})$$

$$r_{5D} = k'_G \cdot X_{n_D} \cdot FA_{i_D} \cdot \left( \frac{S}{S + K_{SG_D}} \right) \cdot \left( \frac{K_{EG_D}}{K_{EG_D} + E} \right) \cdot \left( 1 + \lambda \cdot \frac{FA_{i_D}}{FA_{i_C}} \right) \quad (\text{Equation 33})$$

### IV.5. Confrontation avec les données expérimentales

La prise en compte de l'ensemble des interactions indirectes et directes permet d'aboutir aux vitesses de réaction et au système différentiel suivant:

Vitesses de réaction:

$$\left\{ \begin{array}{l}
 \text{Si } X_C + X_D < X_{T_{max}}, \\
 r1_C = X_C \cdot X_{n_C} \cdot \left(1 - \frac{X_C}{X_{max_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{EC}}{K_{EC} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_C}/X_C}{N_{s_C}/X_C + K_{X_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{FAC}}{FA_{i_C}/X_C + K_{FAC}}\right) \cdot \left(1 + X_D \cdot \beta \cdot \beta_2 \cdot \left(\frac{FA_{i_C}}{FA_{i_D}} - \pi\right)\right) \\
 r1_D = X_D \cdot X_{n_D} \cdot \left(1 - \frac{X_D}{X_{max_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{ED}}{K_{ED} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_D}/X_D}{N_{s_D}/X_D + K_{X_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{FAD}}{FA_{i_D}/X_D + K_{FAD}}\right) \cdot (1 + X_C \cdot \alpha \cdot \alpha_2) \\
 \text{Si } X_C + X_D > X_{T_{max}}, \quad r1_C = 0 \text{ et } r1_D = 0 \\
 r2_C = k_{s_C} \cdot X_{n_C} \cdot \left(\frac{S}{S + K_{S_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{ESC}}{K_{ESC} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_C}/X_C}{N_{s_C}/X_C + K_{NS_C}}\right) \\
 r2_D = k_{s_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left(\frac{S}{S + K_{S_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{ESD}}{K_{ESD} + E}\right) \cdot \left(\frac{N_{s_D}/X_D}{N_{s_D}/X_D + K_{NS_D}}\right) \cdot \left(1 + \lambda \cdot \frac{FA_{i_D}}{FA_{i_C}}\right) \\
 r3_C = k_{N_C} \cdot X_{n_C} \cdot \left(N_{s_C} - \frac{a_C}{FA_{i_C}} N\right) \cdot \left(1 + \delta \cdot \left(\frac{FA_{i_C}}{FA_{i_D}} - \pi\right)\right) \\
 r3_D = k_{N_D} \cdot X_{n_D} \cdot \left(N_{s_D} - \frac{a_D}{FA_{i_D}} N\right) \cdot \left(1 + \gamma \cdot \left(\frac{FA_{i_C}}{FA_{i_D}} - \pi\right)\right) \\
 r4_C = X_{n_C} \cdot e^{\left(\frac{E - E_{lim_C}}{10}\right)} \\
 r4_D = X_{n_D} \cdot e^{\left(\frac{E - E_{lim_D}}{10}\right)} + \rho \cdot X_D \cdot T \\
 r5_C = k_G \cdot X_{n_C} \cdot \left(\frac{S}{S + K_{SG_C}}\right) \cdot \left(\frac{K_{EGC}}{K_{EGC} + E}\right) \\
 r5_D = k'_G \cdot X_{n_D} \cdot FA_{i_D} \cdot \left(\frac{S}{S + K_{SG_D}}\right) \cdot \left(\frac{K_{EGD}}{K_{EGD} + E}\right) \cdot \left(1 + \lambda \cdot \frac{FA_{i_D}}{FA_{i_C}}\right) \\
 r6_C = k_{FA} \cdot X_C \cdot FA \\
 r6_D = k_{FA} \cdot X_{n_D} \cdot FA
 \end{array} \right.$$

Systeme différentiel:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX_C}{dt} = (g2_C * r1_C - r4_C) \\ \frac{dX_D}{dt} = (g2_D * r1_D - r4_D) \\ \frac{dS}{dt} = -(r1_C + r1_D + r2_C + r2_D + r5_C + r5_D) \\ \frac{dN}{dt} = -(r3_C + r3_D) \\ \frac{dN_{S_C}}{dt} = (r3_C - g1_C * r1_C) \\ \frac{dN_{S_D}}{dt} = (r3_D - g1_D * r1_D) \\ \frac{dE}{dt} = 2 * (r2_C + r2_D) \\ \frac{dG}{dt} = r5_C + r5_D \\ \frac{dFA}{dt} = -(r6_C + r6_D) \\ \frac{dFA_{i_D}}{dt} = r6_C \\ \frac{dFA_{i_D}}{dt} = r6_D \\ \frac{dT}{dt} = r1_C - \sigma * X_D * T \end{array} \right.$$

Ce modèle est confronté aux résultats expérimentaux dans les Figure 67Figure 68. Le modèle représente bien l'inversion de domination qu'on a pu observer en changeant la concentration initiale de facteurs anaérobies. La population maximale atteinte par chaque levure est proches des valeurs expérimentales. Cependant il sous-estime la croissance initiale de *S. cerevisiae* en milieu MS300 et celle de *T. delbrueckii* en milieu MS300M. Les paramètres du modèle sont identifiés avec une faible sensibilité (Tableau 27).

Tableau 27 Paramètre identifiés pour décrire la culture les cultures compartimentées

Paramètres	Valeurs	Incertitudes	Unités
$\alpha_2$	0,29	2000%	-
$\beta_2$	190	2000%	-
$\pi$	0,08	2000%	-
$\lambda$	0,15	2000%	-
$\delta$	98	2000%	-
$\gamma$	-101	2000%	-

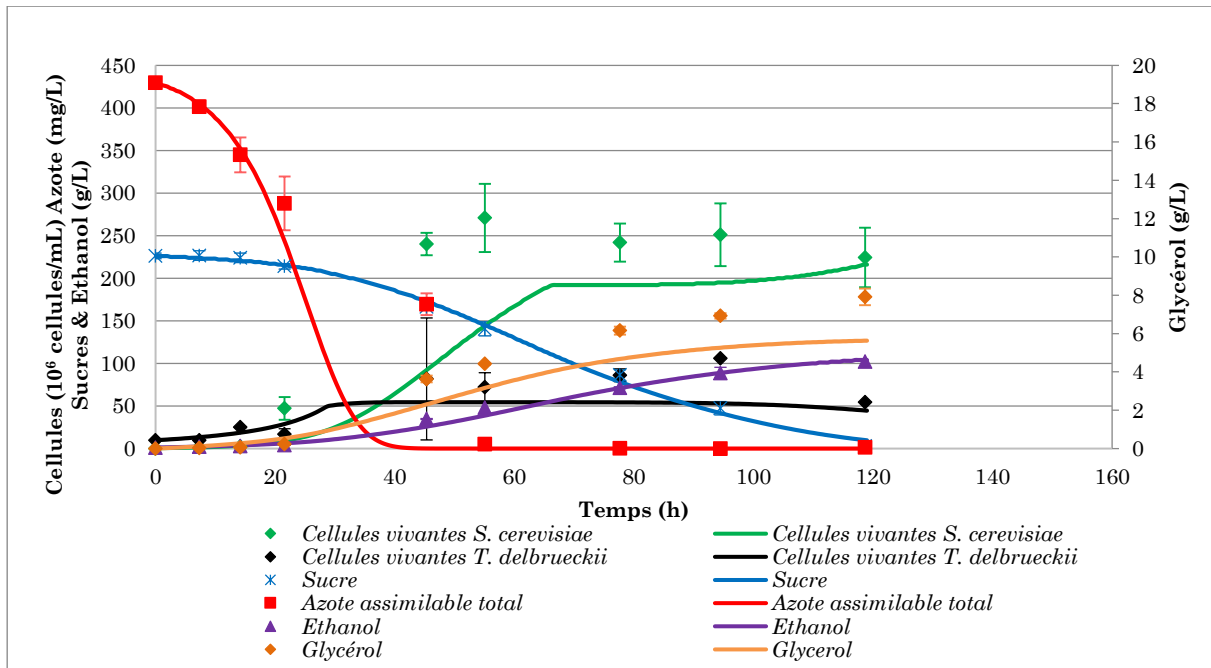


Figure 67 Confrontation du modèle avec la culture mélangée de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en milieu MS300.

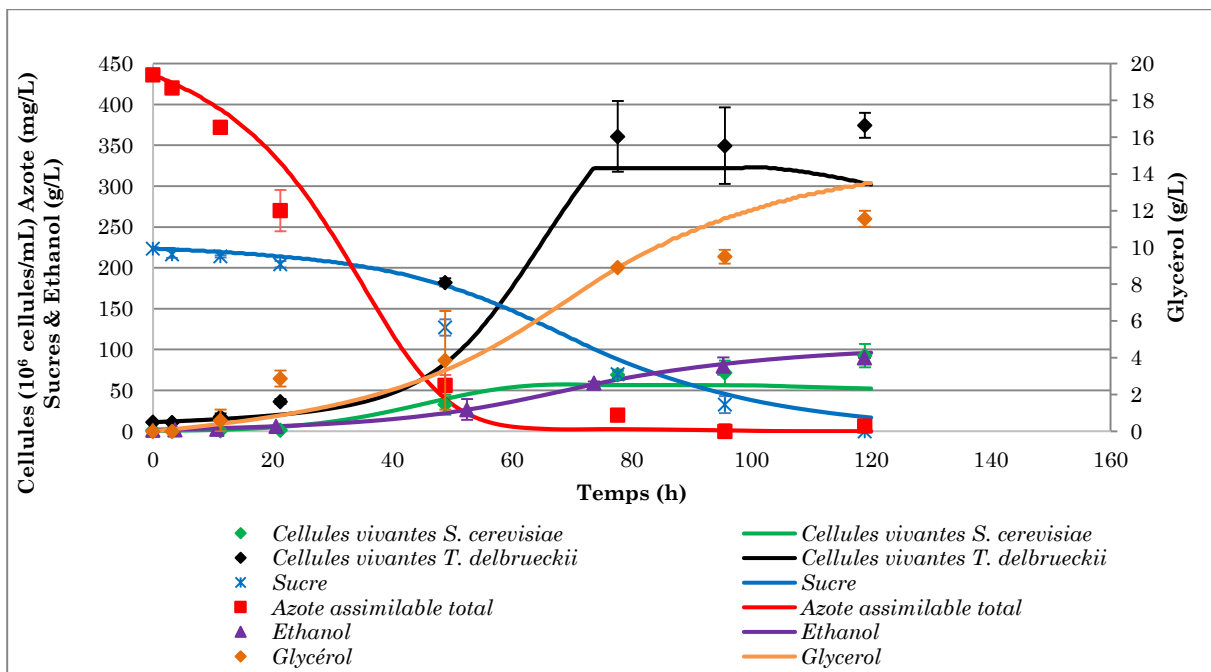


Figure 68 Confrontation du modèle avec la culture mélangée de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en milieu MS300M.

Bien que les paramètres soient obtenus avec de faibles sensibilités, ils ont un effet concret sur les variables du modèle. Pour illustration, en faisant varier le paramètre  $\pi$  de 10%, on obtient des cinétiques simulées visuellement différentes de celles du paramètre optimisé.

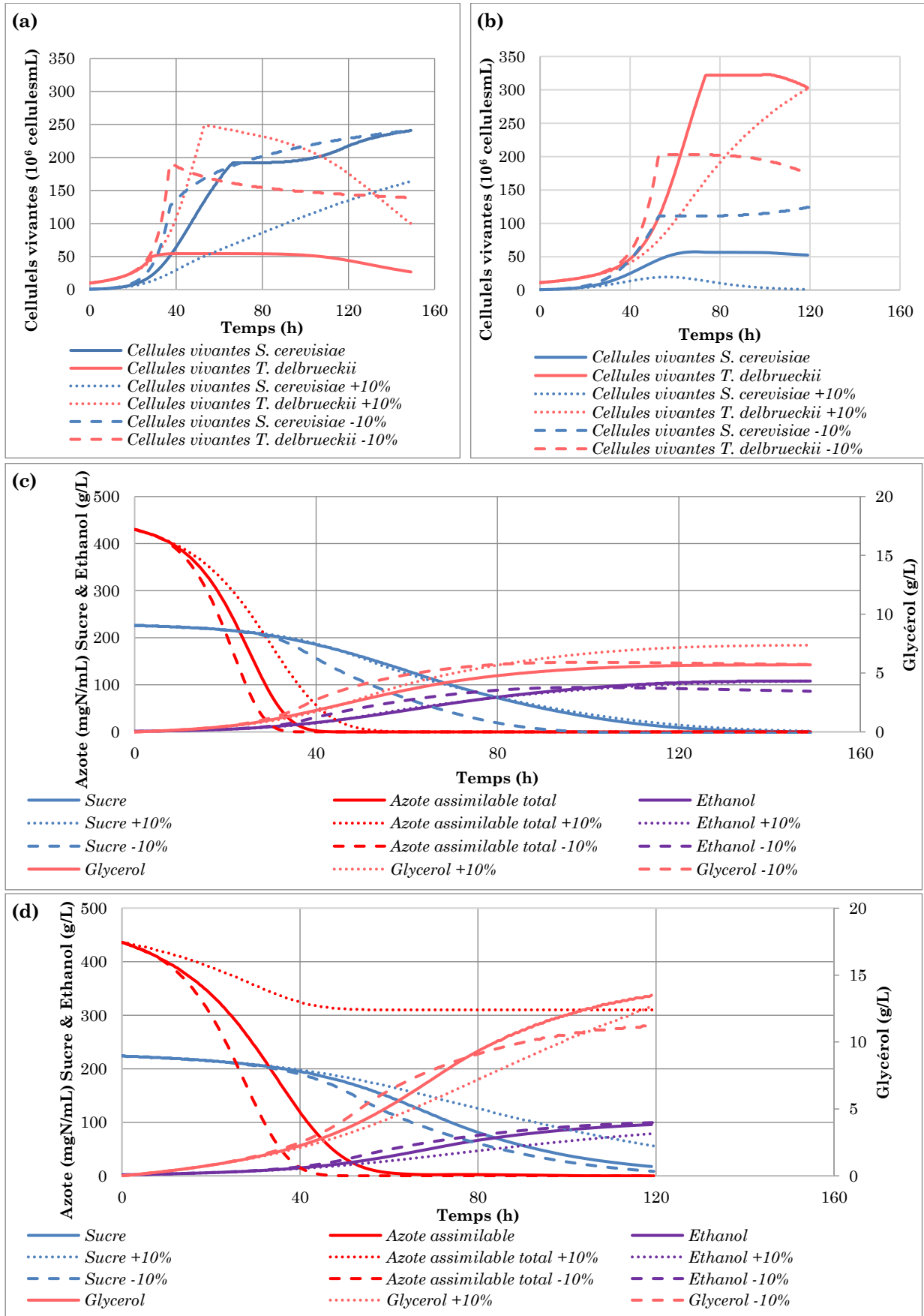


Figure 69. Influence de la variation du paramètre  $\pi$  sur le modèle en milieu MS300 (a et c) et MS300M (b et d).

## V. Conclusion

Dans ce chapitre, la modélisation de la dynamique des cultures mixtes de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* a été réalisée. Pour ce faire, on s'est appuyé sur les paramètres identifiés pour décrire les cultures pures et les données expérimentales concernant plusieurs cultures mixtes, compartimentées et mélangées.

Dans un premier temps, un modèle représentant l'évolution des cultures mixtes de levure en tenant compte uniquement de la compétition pour les substrats a été développé. Le sucre, l'azote assimilable et les facteurs anaérobies étaient considérés comme les substrats. Pour toutes les cultures mixtes réalisées, ce modèle ne représentait pas fidèlement les cinétiques observées expérimentalement. Nous avons conclu qu'il existait des phénomènes supplémentaires à inclure dans le modèle pour décrire les interactions entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*.

Les cultures mixtes compartimentées ont permis d'étudier les interactions indirectes en s'affranchissant des interactions directes. Trois types de mécanismes ont dû être modélisés afin de représenter correctement les données expérimentales : la stimulation réciproque de la vitesse de croissance des deux levures, la compétition pour l'espace pour les populations finales atteintes et l'augmentation de la mortalité de *T. delbrueckii* en raison de la production supposée de toxines antimicrobiennes par *S. cerevisiae*. La prise en compte de ces phénomènes a permis une meilleure représentation des cinétiques expérimentales.

Enfin, les cultures mixtes mélangées ont permis de mettre en évidence les interactions directes supplémentaires existant entre ces deux levures. La modélisation s'est faite selon une démarche d'association contributive selon laquelle les effets des interactions directes s'associent à ceux des interactions indirectes pour obtenir l'effet global de culture mixte. Trois autres mécanismes d'interactions directes ont été pris en compte pour modéliser le contact physique : l'accélération supplémentaire de la vitesse de croissance, la modification de l'absorption d'azote et la stimulation de l'activité glycolytique.

Pour plusieurs de ces phénomènes, la quantité initiale de facteurs anaérobies modifie considérablement les mécanismes et des termes mathématiques représentant leur influence ont été parfois nécessaires. Elle intervient aussi bien dans la compétition pour l'espace, dans l'action des toxines antimicrobiennes et dans l'ensemble des interactions directes. Au final, le modèle reproduit correctement l'inversion de domination observée lorsqu'on augmente le ratio de facteurs anaérobies. Cependant, il sous-estime la croissance initiale de *S. cerevisiae* en milieu MS300 et celle de *T. delbrueckii* en milieu MS300M. Un approfondissement de ce travail de modélisation passe par la quantification de la concentration de facteurs anaérobies absorbés et non absorbés à chaque prise d'échantillon au cours du suivi des fermentations. Tester des concentrations initiales de facteurs anaérobies comprises entre les valeurs des expériences de notre étude permettrait d'investiguer le lien entre la domination et la quantité de facteurs anaérobies absorbés.

Nous avons conscience de la complexité du modèle final proposé, avec un nombre de paramètres importants et parfois (souvent) une sens purement mathématique de ces paramètres. L'intérêt de cette démarche de modélisation consiste essentiellement à démontrer l'existence de très nombreux mécanismes dans ces cultures mixtes :

compétitions, interactions indirectes positives et négatives, interactions directes positives et négatives. Seul ce travail de recherche de représentation mathématique des phénomènes permet l'approfondissement de l'analyse des données expérimentales. Et si les équations proposées reposent parfois sur des hypothèses non vérifiées, si des paramètres sans aucun sens physique doivent être ajoutés pour arriver à représenter une observation expérimentale sans explication métabolique ou physique, cela permet tout de même de montrer la complexité du système et de mettre en évidence les facteurs prépondérants à explorer.



## **CONCLUSIONS & PERSPECTIVES**

---

Comme cela a été mentionné dans l'étude bibliographique, les systèmes utilisant de multiples micro-organismes sont très utilisés notamment dans le domaine agroalimentaire, le traitement des eaux et la chimie fine. Cependant, contrairement aux cultures pures, les cultures mixtes de micro-organismes font rarement l'objet de modélisation. L'objet de notre étude était de développer la modélisation des interactions entre micro-organismes pour mieux comprendre ces mécanismes et aider à la conception des bioprocédés.

Premièrement, l'influence de trois paramètres opératoires sur les cultures pures de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* a été quantifiée. Il s'agit de la concentration initiale en azote assimilable, du passage d'un environnement anaérobique non strict à un environnement anaérobique strict et de la concentration initiale en facteurs anaérobies. L'azote assimilable, en favorisant la croissance cellulaire, en améliorant les vitesses d'absorption des sucres et de production d'éthanol, a des effets semblables sur les deux espèces. L'impact de l'anaérobiose stricte et des facteurs anaérobies sont inhérents à chaque espèce. En effet l'anaérobiose stricte induit une diminution de la vitesse de consommation du sucre de *S. cerevisiae* alors qu'elle entraîne une diminution importante de la quantité d'éthanol produite par *T. delbrueckii* ainsi qu'une consommation incomplète de l'azote assimilable. En anaérobiose stricte, l'augmentation de facteurs anaérobies n'a pas d'influence sur le comportement de *S. cerevisiae*. En revanche, elle induit la prolongation de la phase de latence de *T. delbrueckii* ainsi qu'une consommation complète de l'azote assimilable disponible. Globalement, selon les modifications des paramètres opératoires *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* réagissent différemment.

Cette première étape expérimentale a permis d'acquérir des données sur les cinétiques de croissance, de consommation de substrats et de production de métabolites en culture pure. En anaérobiose stricte, 75 à 80% des sucres consommés par *T. delbrueckii* sont utilisés pour produire de la biomasse du glycérol et de l'éthanol. Une partie importante du métabolisme carboné de *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte demeure inexplicée. L'investigation des réactions métaboliques sous-jacentes de *T. delbrueckii* en anaérobiose stricte constitue une perspective de ce travail de thèse. Observer l'activité des mitochondries pourrait être une première piste de réflexion. En effet, les résultats de Šubík *et al.*, (1972) et de Gbelska *et al.*, (1983) suggèrent qu'en conditions anaérobies l'énergie nécessaire aux réactions mitochondriales est satisfaite par l'importation d'ATP cytoplasmique.

Dans un second temps, l'influence des facteurs anaérobies sur les cultures mixtes de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en conditions strictement anaérobiques a été étudiée. Les cultures mixtes ont été réalisées en présence et en absence de membrane de séparation permettant ainsi d'observer les effets du contact physique sur l'évolution des cocultures. Le contact physique influence la dynamique des populations. *S. cerevisiae* domine les cultures mixtes en milieu MS300. En effet, la présence de *S. cerevisiae* induit indirectement une diminution du nombre de cellules vivantes de *T. delbrueckii* et le contact physique avec *T. delbrueckii* stimule la croissance de *S. cerevisiae*. Une augmentation de la concentration initiale de facteurs anaérobies inverse complètement cette domination. En effet, en milieu MS300M, *T. delbrueckii* domine la fermentation. La croissance de *S. cerevisiae* n'est plus stimulée par le contact physique et l'on n'observe pas de diminution du nombre de cellules vivantes de *T. delbrueckii*. Au cours de la fermentation, les levures incorporent des lipides exogènes qui influencent probablement leur réponse à la présence d'une levure compétitrice.

Une augmentation des facteurs anaérobies a probablement entraîné une modification de la composition lipidique des membranes de *T. delbrueckii*, ce qui entraverait leur interaction avec les peptides antimicrobiens produits par *S. cerevisiae* réduisant ainsi l'amensalisme exercé par *S. cerevisiae*. La concentration initiale en facteurs anaérobies influence grandement la dynamique des populations lors des cocultures, mettant ainsi en évidence un nouveau moyen de contrôler l'évolution des populations et, éventuellement, les propriétés organoleptiques du vin.

L'azote est un élément essentiel pour la croissance des levures. Néanmoins, les résultats expérimentaux acquis lors de l'étude des cultures pures montrent que les levures continuent à croître après l'épuisement de l'azote. Cette observation a conduit à aborder la modélisation en introduisant une source d'azote intracellulaire pour décrire mathématiquement les cinétiques de croissance des micro-organismes étudiés. Ainsi, nous avons proposé un modèle structuré dans lequel l'azote assimilé par la levure se répartit en deux compartiments: le compartiment constitutif et le compartiment de stockage. Le modèle stœchio-cinétique proposé a permis une représentation fidèle des cinétiques de croissance, de consommation de sucre, d'assimilation d'azote, de production d'éthanol et de glycérol de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* en culture pure.

La modélisation de la dynamique des cultures mixtes de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* a été abordée en s'appuyant sur les paramètres identifiés pour décrire les cultures pures. La simulation de ces deux levures cohabitant dans le même milieu de culture, donc en compétition pour les substrats, n'a pas permis de représenter fidèlement les cultures mixtes expérimentales. Par conséquent, il est nécessaire de prendre en compte des types d'interactions supplémentaires pour pouvoir décrire l'évolution des cultures mixtes de levures. L'approche globale est de modéliser l'ensemble des interactions entre les levures par une association contributive de plusieurs interactions: compétitions pour les substrats, interactions indirectes, interactions directes. Trois types de mécanismes d'interactions indirectes ont été considérés afin de représenter les données expérimentales des cultures mixtes compartimentées: la stimulation réciproque de la vitesse de croissance des deux levures, la compétition pour l'espace et l'augmentation de la mortalité de *T. delbrueckii* en raison de la production supposée de toxines antimicrobiennes par *S. cerevisiae*. La prise en compte de ces phénomènes a permis une meilleure représentation des cinétiques expérimentales des cultures mixtes compartimentées. Les cultures mixtes mélangées ont permis de mettre en évidence les interactions directes supplémentaires existant entre ces deux levures. Trois mécanismes d'interactions directes ont été pris en compte pour modéliser le contact physique: l'accélération supplémentaire de la vitesse de croissance, la modification de l'absorption d'azote et la stimulation de l'activité glycolytique.

Un approfondissement de ce travail de modélisation passe par la quantification de la concentration de facteurs anaérobies absorbés et non absorbés à chaque prise d'échantillon au cours du suivi des fermentations. Tester des concentrations initiales de facteurs anaérobies comprises entre les valeurs des expériences de notre étude permettrait d'investiguer le lien entre la domination et la quantité de facteurs anaérobies absorbés. Le travail de modélisation s'est concentré sur la description de l'évolution des populations microbiennes, des substrats et des métabolites majoritaires. En perspective, prendre en

compte des métabolites minoritaires tels que les composés aromatiques permettrait de simuler les propriétés organoleptiques du vin.

## **BIBLIOGRAPHIE**

---

- Aborhey, S., and Williamson, D. (1978). State and parameter estimation of microbial growth processes. *Automatica* *14*, 493–498.
- Adams, C., and van Vuuren, H.J.J. (2010). Effect of Timing of Diammonium Phosphate Addition to Fermenting Grape Must on the Production of Ethyl Carbamate in Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* *61*, 125.
- Aiba, S., and Shoda, M. (1969). Reassessment of product inhibition in alcohol fermentation. *J. Ferment. Technol.* *47*, 790.
- Aiba, S., Shoda, M., and Nagatani, M. (1968). Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* *10*, 845–864.
- Albasi, C., Gourgue, F., and Riba, J.P. (1998). Homogenizing two liquids in bioreactor operation using two vessels, one for e.g. sampling, measurement and nutrient introduction, one for culturing, with flow alternating between them through filter maintaining sterility.
- Albasi, C., Tataridis, P., Salgado Manjarrez, E., and Taillandier, P. (2001). A New Tool for the Quantification of Microorganism Interaction Dynamics. *Ind. Eng. Chem. Res.* *40*, 5222–5227.
- Albergaria, H., and Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 2035–2046.
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., and Gírio, F. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *86*, 965–972.
- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., and Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 3187–3195.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., and Charpentier, C. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* *124*, 17–22.
- Alexandre, H., Heintz, D., Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Charpentier, C., and Feuillat, M. (2001). Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *26*, 235–240.
- Alfenore, S. (1999). Interaction de type «killer» chez *Saccharomyces cerevisiae*. Etudes physiologiques et cinétiques. Quantification et modélisation. Thèse INP Toulouse, France, 169 p.
- Alves-Araújo, C., Pacheco, A., Almeida, M., Spencer-Martins, I., Leão, C., and Sousa, M. (2007). Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. *Microbiology* *153*, 898–904.
- Amerine, M.A., and Joslyn, M.A. (1970). *Table Wines: The Technology of Their Production* (University of California Press).

- Amrane, A., and Prigent, Y. (1994). Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: Model development and simulation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* *60*, 241–246.
- Anderson, R.G., and Kirsop, B.H. (1974). The control of volatile ester synthesis during the fermentation of wort of high specific gravity. *J. Inst. Brew.* *80*, 48–55.
- Andreasen, A.A., and Stier, T.J.B. (1953). Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Physiol.* *41*, 23–36.
- Andreasen, A.A., and Stier, T.J.B. (1954). Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty and requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* *43*, 271–281.
- Andrews, J.F. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol. Bioeng.* *10*, 707–723.
- Anfang, N., Brajkovich, M., and Goddard, M.R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* *15*, 1–8.
- Aranda, A., Matallana, E., and del Olmo, M. í (2011). *Saccharomyces* Yeasts I: Primary Fermentation. In *Molecular Wine Microbiology*, A.V. Carrascosa Santiago, R. Muñoz, and R. González Garcia, eds. (Amsterdam ; Boston: Academic Press), p.
- Arias-Gil, M., Garde-Cerdán, T., and Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. *Food Chem.* *103*, 1312–1318.
- Arneborg, N., Siegumfeldt, H., Andersen, G.H., Nissen, P., Daria, V.R., Rodrigo, P.J., and Glückstad, J. (2005). Interactive optical trapping shows that confinement is a determinant of growth in a mixed yeast culture. *FEMS Microbiol. Lett.* *245*, 155–159.
- Atkinson, S., and Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface* *6*, 959–978.
- Aubrey, A.D. (2008). Amino acid biosignatures-Implications for the detection of extinct or extant microbial communities on Mars (University of California, San Diego).
- Avbelj, M., Zupan, J., Kranjc, L., and Raspor, P. (2015). Quorum-Sensing Kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* : A Symphony of *ARO* Genes and Aromatic Alcohols. *J. Agric. Food Chem.* *63*, 8544–8550.
- Avbelj, M., Zupan, J., and Raspor, P. (2016). Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 7841–7852.
- Avery, S.V., Lloyd, D., and Harwood, J.L. (1995). Temperature-dependent changes in plasma-membrane lipid order and the phagocytotic activity of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* are closely correlated. *Biochem. J.* *312*, 811–816.
- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., and Zapparoli, G. (2012). Effects of *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *Eur. Food Res. Technol.* *235*, 303–313.

- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., and Zapparoli, G. (2015). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulasporea delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *31*, 277–293.
- Bajpai, R.K., and Reuß, M. (1981). Evaluation of feeding strategies in carbon-regulated secondary metabolite production through mathematical modeling. *Biotechnol. Bioeng.* *23*, 717–738.
- Bakker, B.M., Overkamp, K.M., van Maris, A.J.A., Kötter, P., Luttik, M.A.H., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* *25*, 15–37.
- Baranyi, J., and Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* *23*, 277–294.
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., and Mendes-Ferreira, A. (2012). The nitrogen source impacts major volatile compounds released by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* *160*, 87–93.
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., Lage, P., Mira, N.P., and Mendes-Ferreira, A. (2015). Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microb. Cell Factories* *14*, 124.
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.-M., Salmon, J.-M., and Barre, P. (1996). Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *J. Ferment. Bioeng.* *82*, 145–150.
- Bazua, C.D., and Wilke, C.R. (1977). Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* *7*, 105–118.
- Béal, C., Deschamps, N., Juillard, V., de Roissart, H., Richard, J., and Saraux, B. (1994). Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. *Bact. Lact. Asp. Fondam. Technol.*
- Beaven, M.J., Charpentier, C., and Rose, A.H. (1982). Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-acyl Composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Microbiology* *128*, 1447–1455.
- Bell, S.-J., and Henschke, P.A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* *11*, 242–295.
- Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., and Guillamon, J. (2004). Nitrogen catabolite repression in during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* *4*, 625–632.
- Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillamon, J.-M., Mas, A., François, J., and Rozes, N. (2006). Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res.* *6*, 1167–1183.
- Belviso, S., Bardi, L., Bartolini, A.B., and Marzona, M. (2004). Lipid nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *Can. J. Microbiol.* *50*, 669–674.



- Bely, M., Sablayrolles, J., and Barre, P. (1990). Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies during Alcoholic Fermentation in Oenological Conditions. *Journal of fermentation and bioengineering* *70*, 246–252.
- Bely, M., Salmon, J.M., and Barre, P. (1994). Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. *J. Inst. Brew.* *100*, 279–282.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., and Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* *122*, 312–320.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.-M., and Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *90*, 1193–1206.
- Bergdahl, B., Heer, D., Sauer, U., Hahn-Hägerdal, B., and van Niel, E.W. (2012). Dynamic metabolomics differentiates between carbon and energy starvation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermenting xylose. *Biotechnol. Biofuels* *5*, 34.
- Berthels, N., Cordero, R., Bauer, F., Thevelein, J., and Pretorius, I. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* *4*, 683–689.
- Bisson, L.F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* *50*, 107.
- Blateyron, L., Agüera, E., Dubois, C., Gerland, C., and Sablayrolles, J.M. (1998). Control of oxygen additions during alcoholic fermentations. *Wein-Wiss.* *53*, 131–135.
- Blomberg, A., and Adler, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *171*, 1087–1092.
- Blomberg, A., and Adler, L. (1992). Physiology of Osmotolerance in Fungi. In *Advances in Microbial Physiology*, (Elsevier), pp. 145–212.
- Blumberg, A.A. (1968). Logistic growth rate functions. *J. Theor. Biol.* *21*, 42–44.
- Bona, R., and Moser, A. (1997). Modelling L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Acta Biotechnol.* *17*, 327–337.
- Boulton, R. (1980). The Prediction of Fermentation Behavior by a Kinetic Model. *Am. J. Enol. Vitic.* *31*, 40–45.
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M.G., Caldeira, J., and Albergaria, H. (2014). Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 843–853.
- Branco, P., Viana, T., Albergaria, H., and Arneborg, N. (2015). Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *Int. J. Food Microbiol.* *205*, 112–118.

- Branco, P., Kemsawasd, V., Santos, L., Diniz, M., Caldeira, J., Almeida, M.G., Arneborg, N., and Albergaria, H. (2017a). *Saccharomyces cerevisiae* accumulates GAPDH-derived peptides on its cell surface that induce death of non-*Saccharomyces* yeasts by cell-to-cell contact. *FEMS Microbiol. Ecol.*
- Branco, P., Francisco, D., Monteiro, M., Almeida, M.G., Caldeira, J., Arneborg, N., Prista, C., and Albergaria, H. (2017b). Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *101*, 159–171.
- Brandam, C., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., and Taillandier, P. (2013). Influence of Oxygen on Alcoholic Fermentation by a Wine Strain of *Torulaspora delbrueckii*: Kinetics and Carbon Mass Balance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *77*, 1848–1853.
- Brandam, C., Fahimi, N., and Taillandier, P. (2016). Mixed cultures of *Oenococcus oeni* strains: A mathematical model to test interaction on malolactic fermentation in winemaking. *LWT - Food Sci. Technol.* *69*, 211–216.
- Brody, S., Oh, C., Hoja, U., and Schweizer, E. (1997). Mitochondrial acyl carrier protein is involved in lipoic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *408*, 217–220.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 238.
- Brou, P., Taillandier, P., Beaufort, S., and Brandam, C. (2018). Mixed culture fermentation using *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* with direct and indirect contact: impact of anaerobic growth factors. *Eur. Food Res. Technol.* 1–12.
- Buchanan, R.E. (1918). Life Phases in a Bacterial Culture. *J. Infect. Dis.* *23*, 109–125.
- Cabrera, M.J., Moreno, J., Ortega, J.M., and Medina, M. (1988). Formation of Ethanol, Higher Alcohols, Esters, and Terpenes by Five Yeast Strains in Musts from Pedro Ximénez Grapes in Various Degrees of Ripeness. *Am. J. Enol. Vitic.* *39*, 283.
- Calabretti, A., Cara, F.L., Sorrentino, A., Stasio, M.D., Santomauro, F., Rastrelli, L., Gabrielli, L., Limone, F., and Volpe, M.G. (2012). Characterization of volatile fraction of typical Irpinian wines fermented with a new starter yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *28*, 1433–1442.
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., and Ciani, M. (2016). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiol.* *56*, 45–51.
- Canonico, L., Comitini, F., and Ciani, M. (2017). *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* *259*, 7–13.
- Capriotti, A. (1957). *Torulaspora nilssonii* nov. spec.: A new yeast from Swedish soils. *Arch. Für Mikrobiol.* *28*, 247–254.
- Caro, I., Pérez, L., and Cantero, D. (1991). Development of a kinetic model for the alcoholic fermentation of must. *Biotechnol. Bioeng.* *38*, 742–748.

- Carrau, F.M., Neirotti, E., and Gioia, O. (1993). Stuck wine fermentations: effect of killer/sensitive yeast interactions. *J. Ferment. Bioeng.* *76*, 67–69.
- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P.A., and Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* *8*, 1196–1207.
- Casalta, E., Cervi, M.F., Salmon, J.M., and Sablayrolles, J.M. (2013). White wine fermentation: interaction of assimilable nitrogen and grape solids: Interaction of assimilable nitrogen and grape solids on alcoholic fermentation under oenological conditions. *Aust. J. Grape Wine Res.* *19*, 47–52.
- Casey, G.P., and Ingledew, W.M.M. (1986). Ethanol Tolerance in Yeasts. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* *13*, 219–280.
- Casey, G.P., Magnus, C.A., and Ingledew, W.M. (1984). High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Appl. Environ. Microbiol.* *48*, 639–646.
- Castela, P., Mesias, J., and Maynar, J. (1985). Evolution of amounts of total, neutral and polar lipids in Macabeo grapes (*Vitis vinifera*) throughout their vegetative cycle. *Sci. Aliments Fr.*
- Castelli, T. (1954). Les Agents de la Fermentation Vinaire. *Arch. Für Mikrobiol.* *20*, 323–342.
- del Castillo Agudo, L. (1992). Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *37*, 647–651.
- Certik, M., and Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* *87*, 1–14.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., and Todd, B.E.N.. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* *3*, 2–8.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., and Henschke, P.A. (1998). Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* *49*, 283.
- Chasseriaud, L., Coulon, J., Marullo, P., Albertin, W., and Bely, M. (2018). New oenological practice to promote non-*Saccharomyces* species of interest: saturating grape juice with carbon dioxide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Cherry, J.M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R.K., et al. (1997). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *387*, 67–73.
- Chi, Z., and Arneborg, N. (1999). Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* *86*, 1047–1052.
- Ciani, M., and Comitini, F. (2011). Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol.* *61*, 25–32.

- Ciani, M., and Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Curr. Opin. Food Sci.* *1*, 1–6.
- Ciani, M., and Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *14*, 199–203.
- Ciani, M., and Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol. Lett.* *17*, 1247–1250.
- Ciani, M., Beco, L., and Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* *108*, 239–245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* *10*, 123–133.
- Cloutier, M., Bouchard-Marchand, E., Perrier, M., and Jolicoeur, M. (2008). A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots. *Biotechnol. Bioeng.* *99*, 189–200.
- Coleman, M.C., and Block, D.E. (2006). Bayesian parameter estimation with informative priors for nonlinear systems. *AIChE J.* *52*, 651–667.
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., Martinez, C., and Catania, C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *J. Appl. Microbiol.* *98*, 1055–1061.
- Comitini, F., and Ciani, M. (2010). The zymocidal activity of *Tetrapisispora phaffii* in the control of *Hanseniaspora uvarum* during the early stages of winemaking: *Tetrapisispora phaffii* killer toxin in winemaking. *Lett. Appl. Microbiol.* *50*, 50–56.
- Comitini, F., Ingeniis, J., Pepe, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2004). Corrigendum to “*Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts”. *FEMS Microbiol. Lett.* *241*, 127–127.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* *28*, 873–882.
- Contois, D.E. (1959). Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures. *J. Gen. Microbiol.* *21*, 40–50.
- Contreras, A., Curtin, C., and Varela, C. (2015). Yeast population dynamics reveal a potential ‘collaboration’ between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *99*, 1885–1895.
- Cooper, T.G. (1982). Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Yeast Saccharomyces Metab. Gene Expr.* *2*, 39–99.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J.M., Gil-Díaz, M., and Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* *236*, 193–207.

- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* *108*, 130–135.
- Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* *23*, 536–545.
- Cramer, A.C., Vlassides, S., and Block, D.E. (2002). Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* *77*, 49–60.
- Crepin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2012). Sequential Use of Nitrogen Compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: a Model Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 8102–8111.
- Crépin, L., Sanchez, I., Nidelet, T., Dequin, S., and Camarasa, C. (2014). Efficient ammonium uptake and mobilization of vacuolar arginine by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during wine fermentation. *Microb. Cell Factories* *13*, 109.
- Curiel, J.A., Morales, P., Gonzalez, R., and Tronchoni, J. (2017). Different Non-*Saccharomyces* Yeast Species Stimulate Nutrient Consumption in *S. cerevisiae* Mixed Cultures. *Front. Microbiol.* *8*.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., and Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 1471–1510.
- De Koker, S.S. (2015). Nitrogen utilisation of selected non-*Saccharomyces* yeasts and the impact on volatile compound production. Stellenbosch University.
- Deckwer, W.-D., Yuan, J.-Q., Bellgardt, K.-H., and Jiang, W.-S. (1991). A dynamic cell cycling model for growth of baker's yeast and its application in profit optimization. *Bioprocess Eng.* *6*, 265–272.
- Delgenes, J.P., Moletta, R., and Navarro, J.M. (1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.* *19*, 220–225.
- Deytieux, C., Mussard, L., Biron, M.-J., and Salmon, J.-M. (2005). Fine measurement of ergosterol requirements for growth of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *68*, 266–271.
- van Dijken, J.P., and Scheffers, W.A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* *1*, 199–224.
- Dizy, M., and Bisson, L.F. (2000). Proteolytic Activity of Yeast Strains During Grape Juice Fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* *51*, 155–167.
- Dormand, J.R., and Prince, P.J. (1980). A family of embedded Runge-Kutta formulae. *J. Comput. Appl. Math.* *6*, 19–26.
- Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., and Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution* *66*, 2961–2968.

- Duteurtre, B., Bourgeois, C., and Chollot, B. (1971). Study of the assimilation of proline by brewing yeasts. *J. Inst. Brew.* *77*, 28–35.
- Edwards, V.H. (1970). The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* *12*, 679–712.
- Egli, C.M., Edinger, W.D., Mittrakul, C.M., and Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* *85*, 779–789.
- Ejiofor, A.O., Chisti, Y., and Moo-Young, M. (1996a). Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking-quality yeast. *Enzyme Microb. Technol.* *18*, 519–525.
- Ejiofor, A.O., Chisti, Y., and Moo-Young, M. (1996b). Fed-batch production of baker's yeast using millet (*Pennisetum typhoides*) flour hydrolysate as the carbon source. *J. Ind. Microbiol.* *16*, 102–109.
- Fleet, G., Prakitchaiwattana, C., Beh, A., and Heard, G. (2002). The yeast ecology of wine grapes. *Biodivers. Biotechnol. Wine Yeasts Res. Signpost Kerala India* *95*, 1–17.
- Fornairon-Bonnefond, C., Demaretz, V., Rosenfeld, E., and Salmon, J.-M. (2002). Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* *93*, 176–182.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* *176*, 269–275.
- Gaber, R.F., Copple, D.M., Kennedy, B.K., Vidal, M., and Bard, M. (1989). The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 3447–3456.
- Gallo, M., and Katz, E. (1972). Regulation of Secondary Metabolite Biosynthesis: Catabolite Repression of Phenoxazinone Synthase and Actinomycin Formation by Glucose. *J. Bacteriol.* *109*, 659–667.
- Garde-Cerdán, T., and Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Sci. Technol.* *41*, 501–510.
- Gbelska, Y., Šubik, J., Svoboda, A., Goffeau, A., and Kovac, L. (1983). Intramitochondrial ATP and cell functions: yeast cells depleted of intramitochondrial ATP lose the ability to grow and multiply. *Eur. J. Biochem.* *130*, 281–286.
- Gelmi, C., Pérez-Correa, R., and Agosin, E. (2002). Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA3 production in solid-state fermentation. *Process Biochem.* *37*, 1033–1040.
- Ghareib, M., Youssef, K.A., and Khalil, A.A. (1988). Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. *Folia Microbiol. (Praha)* *33*, 447–452.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and

sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* *33*, 271–281.

Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., and Alexandre, H. (2017). Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Front. Microbiol.* *8*.

Gomez, N.A., Sánchez, C.P., and Quintero, J.C. (2013). Phenomenological Model of the Clavulanic Acid production, inhibitor of the enzymes lactamases using a method of multiple regression analysis nonlinear. In *Health Care Exchanges (PAHCE), 2013 Pan American*, pp. 1–4.

Gompertz, B. (1825). On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life Contingencies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* *115*, 513–583.

Gutiérrez, A.R., Epifanio, S., Garijo, P., López, R., and Santamaría, P. (2001). Killer Yeasts: Incidence in the Ecology of Spontaneous Fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* *52*, 352–356.

Han, K., and Levenspiel, O. (1988). Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* *32*, 430–447.

Hanl, L., Sommer, P., and Arneborg, N. (2005). The effect of decreasing oxygen feed rates on growth and metabolism of *Torulaspora delbrueckii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *67*, 113–118.

Hanly, T.J., Urello, M., and Henson, M.A. (2012). Dynamic flux balance modeling of *S. cerevisiae* and *E. coli* co-cultures for efficient consumption of glucose/xylose mixtures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *93*, 2529–2541.

Hanson, T.P., and Tsao, G.T. (1972). Kinetic studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Bioeng.* *14*, 233–252.

Harris, F., Dennison, S., and Phoenix, D. (2009). Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* *10*, 585–606.

Hartwell, L.H., and Unger, M.W. (1977). Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. *J. Cell Biol.* *75*, 422–435.

Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., and Dickinson, J.R. (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 2259–2266.

Heard, G.M., and Fleet, G.H. (1987). Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* *53*, 2171–2174.

Henschke, and Jiranek, V. (1993). Yeasts – Metabolism of nitrogen compounds. *Wine Microbiol Biotechnol* 77–164.

Hernández-López, M.J., Pallotti, C., Andreu, P., Aguilera, J., Prieto, J.A., and Randez-Gil, F. (2007). Characterization of a *Torulaspora delbrueckii* diploid strain with optimized performance in sweet and frozen sweet dough. *Int. J. Food Microbiol.* *116*, 103–110.

- Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garciamoruno, E., and Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem.* *107*, 1064–1077.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., and Cabezudo, M.D. (1990). The Influence of the Yeast and Type of Culture on the Volatile Composition of Wines Fermented Without Sulfur Dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* *41*, 313.
- Hinshelwood, C.N. (1946). *The Chemical Kinetics Of The Bacterial Cell* (Oxford).
- Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., and Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* *91*, 541–547.
- Holzberg, I., Finn, R.K., and Steinkraus, K.H. (1967). A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. *Biotechnol. Bioeng.* *9*, 413–427.
- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., and Nickerson, K.W. (2001). Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 2982–2992.
- Ibeas, J.I., and Jimenez, J. (1997). Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 7–12.
- Ingledeew, W.M., and Kunkee, R.E. (1985). Factors Influencing Sluggish Fermentations of Grape Juice. *Am. J. Enol. Vitic.* *36*, 65.
- Ingledeew, W.M., Magnus, C.A., and Sosulski, F.W. (1987). Influence of oxygen on proline utilization during the wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* January *38*, 246–248.
- Ishizaki, A., and Ohta, T. (1989). Batch culture kinetics of l-lactate fermentation employing *Streptococcus* sp. IO-1. *J. Ferment. Bioeng.* *67*, 46–51.
- Ishizaki, A., Ohta, T., and Kobayashi, G. (1989). Batch culture growth model for lactate fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* *68*, 123–130.
- Izadpanah, A., and Gallo, R.L. (2005). Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* *52*, 381–390.
- Izquierdo Cañas, P., Palacios Garcia, A., and Garcia Romero, E. (2011). Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspora*) and *Saccharomyces* yeast starter. *vitis* *177*–182.
- Jacobs, C.J., and Vuuren, H.J.J.V. (1991). Effects of Different Killer Yeasts on Wine Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* *42*, 295–300.
- Jauniaux, J.-C., Vandenbol, M., Vissers, S., Broman, K., and Grenson, M. (1987). Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* *164*, 601–606.
- Jimenez, R.R., and Ladha, J.K. (1993). Automated elemental analysis: A rapid and reliable but expensive measurement of total carbon and nitrogen in plant and soil samples. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* *24*, 1897–1924.



- Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and del Olmo, M. I. (2007). The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* *92*, 61–75.
- Jiranek, V., Langridge, P., and Henschke, P.A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* *46*, 75–83.
- Jolly, J., Augustyn, O.P.H., and Pretorius, I.S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South Afr. J. Enol. Vitic.* *27*, 15.
- Jolly, N.P., Varela, C., and Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* *14*, 215–237.
- Kagan, B.L., Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1994). Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* *87*, 131–149.
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., and Arneborg, N. (2015a). Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M.G., Caldeira, J., Albergaria, H., and Arneborg, N. (2015b). Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* *362*.
- Kishimoto, M., Sawano, T., Yoshida, T., and Taguchi, H. (1983). Optimization of a fed-batch culture by statistical data analysis. In *Modelling and Control of Biotechnical Processes*, A. Halme, ed. (Pergamon), pp. 161–168.
- Kiviharju, K., Salonen, K., Leisola, M., and Eerikäinen, T. (2006). Modeling and simulation of *Streptomyces peucetius* var. *caesius* N47 cultivation and  $\epsilon$ -rhodomycinone production with kinetic equations and neural networks. *J. Biotechnol.* *126*, 365–373.
- Kjeldsen, T., Brandt, J., Andersen, A.S., Egel-Mitani, M., Hach, M., Pettersson, A.F., and Vad, K. (1996). A removable spacer peptide in an  $\alpha$ -factor-leader/insulin precursor fusion protein improves processing and concomitant yield of the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *170*, 107–112.
- Kohlwein, S.D., Eder, S., Oh, C.-S., Martin, C.E., Gable, K., Bacikova, D., and Dunn, T. (2001). Tsc13p Is Required for Fatty Acid Elongation and Localizes to a Novel Structure at the Nuclear-Vacuolar Interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 109–125.
- Lagunas, R., and Gancedo, J.M. (1973). Reduced Pyridine-Nucleotides Balance in Glucose-Growing *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* *37*, 90–94.
- Lai, Q.P. (2010). Utilisation de levures non *Saccharomyces* en oenologie: études des interactions entre *Torulaspora delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes.
- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., and Mannazzu, I. (2008). ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1780*, 892–898.

- Landolfo, S., Zara, G., Zara, S., Budroni, M., Ciani, M., and Mannazzu, I. (2010). Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* *141*, 229–235.
- Lange, H., Bavouzet, J.M., Taillandier, P., and Delorme, C. (1993). Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. *Biotechnol. Tech.* *7*, 223–228.
- Large, P.J. (1986). Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* *2*, 1–34.
- Larue, F., Lafon-Lafourcade, S., and Ribereau-Gayon, P. (1980). Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.* *39*, 808–811.
- Le Fur, Y., Hory, C., Bard, M.-H., and Olsson, A. (1994). Evolution of phytosterols in Chardonnay grape berry skins during last stages of ripening. *Vitis* *33*, 127–131.
- Leber, A., Hrastnik, C., and Daum, G. (1995). Phospholipid-synthesizing enzymes in Golgi membranes of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *377*, 271–274.
- Leh, M.B., and Charles, M. (1989). Lactic acid production by batch fermentation of whey permeate: A mathematical model. *J. Ind. Microbiol.* *4*, 65–70.
- Lenas, P., and Pavlou, S. (1994). Periodic, quasi-periodic, and chaotic coexistence of two competing microbial populations in a periodically operated chemostat. *Math. Biosci.* *121*, 61–110.
- Levenspiel, O. (1980). The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnol. Bioeng.* *22*, 1671–1687.
- Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., and Sicard, D. (2016). Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiol.* *53*, 41–50.
- Lichtenstein, A., Ganz, T., Selsted, M.E., and Lehrer, R.I. (1986). In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* *68*, 1407–1410.
- Limtong, S., and Koowadjanakul, N. (2012). Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *28*, 3323–3335.
- Liu, J., Arneborg, N., Toldam-Andersen, T.B., Zhang, S., Petersen, M.A., and Bredie, W.L.P. (2017). Impact of sequential co-culture fermentations on flavour characters of Solaris wines. *Eur. Food Res. Technol.* *243*, 437–445.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., and Darnell, J. (2005). *Biologie moléculaire de la cellule*. Boeck Supér. Ed.
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M.A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., and Suárez-Lepe, J.A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Sci. Technol.* *59*, 915–922.

- Lopez, C.L.F., Beaufort, S., Brandam, C., and Taillandier, P. (2014). Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type medium fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *30*, 2223–2229.
- Lord, P.G., and Wheals, A.E. (1980). Asymmetrical division of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *142*, 808–818.
- Loretan, T., Mostert, J.F., and Viljoen, B.C. (2003). Microbial flora associated with South African household kefir. *South Afr. J. Sci.* *99*, 92–94.
- Lotka, A.J. (1920). Analytical Note on Certain Rhythmic Relations in Organic Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *6*, 410–415.
- Loustaunau, C. (2015). Modélisation de la croissance et de la production de thiolutine par *Saccharothrix algeriensis* en fermenteur batch.
- Lowes, K.F., Shearman, C.A., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D.B., Merry, R.J., and Gasson, M.J. (2000). Prevention of Yeast Spoilage in Feed and Food by the Yeast Mycocin HMK. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 1066–1076.
- Luedeking, R., and Piret, E.L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* *1*, 393–412.
- Luong, J.H.T. (1985). Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* *27*, 280–285.
- Luong, J.H.T. (1987). Generalization of monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* *29*, 242–248.
- Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Julien, A., and Salmon, J.-M. (2004). Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *65*.
- Malthus, T.R. (1798). *An essay on the principle of population* (London: Johnson).
- Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G.A., Goffrini, P., Lodi, T., Marzona, M., and Bardi, L. (2008). Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int. J. Food Microbiol.* *121*, 84–91.
- Marín, M.R. (1999). Alcoholic Fermentation Modelling: Current State and Perspectives. *Am. J. Enol. Vitic.* *50*, 166–178.
- Martini, A., Ciani, M., and scorzetti, G. (1996). Direct Enumeration and Isolation of Wine Yeasts from Grape Surfaces. *47*, 6.
- Mauricio, J.C., Arroyo, M., Millán, C., and Ortega, J.M. (1990). Relationship between the phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*, and their permanence during the fermentation of musts from grapes of the Pedro Ximenez variety. *Biotechnol. Lett.* *12*, 265–270.

- Mauricio, J.C., Guijo, S., and Ortega, J.M. (1991). Relationship Between Phospholipid and Sterol Contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* and their Fermentation Activity in Grape Musts. *Am. J. Enol. Vitic.* *42*, 301.
- Mauricio, J.C., Millán, C., and Ortega, J.M. (1998). Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *14*, 405–410.
- Mehlomakulu, N.N., Setati, M.E., and Divol, B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int. J. Food Microbiol.* *188*, 83–91.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and Leao, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *J. Appl. Microbiol.* *97*, 540–545.
- Merico, A., Sulo, P., Piškur, J., and Compagno, C. (2007). Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J.* *274*, 976–989.
- Messenguy, F., Colin, D., and Have, J.-P.T. (1980). Regulation of Compartmentation of Amino Acid Pools in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Effects on Metabolic Control. *Eur. J. Biochem.* *108*, 439–447.
- Miller, A.C., Wolff, S.R., Bisson, L.F., and Ebeler, S.E. (2007). Yeast Strain and Nitrogen Supplementation: Dynamics of Volatile Ester Production in Chardonnay Juice Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* *58*, 470.
- Mishra, P., and Kaur, S. (1991). Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *34*.
- Monod, J. (1941). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. thèse de docteur en sciences naturelles, n°2847.
- Monteiro, F.F., and Bisson, L.F. (1991). Amino Acid Utilization and Urea Formation During Vinification Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* *42*, 199.
- Moreno, J.J., Millán, C., Ortega, J.M., and Medina, M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Ind. Microbiol.* *7*, 181–189.
- Moser, H. (1958). The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. *614*, 136.
- Moser, A., and Schneider, H. (1989). Modeling secondary metabolite production – case Pleuromulin. In *Computer Applications in Fermentation Technology: Modelling and Control of Biotechnological Processes*, (London), p.
- Myers, D.K., Lawlor, D.T., and Atfield, P.V. (1997). Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 145–150.
- Nagodawithana, T.W., and Steinkraus, K.H. (1976). Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.* *31*, 158–162.

- Nehme, N. (2008). Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni*: impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes.
- Nehme, N., Mathieu, F., and Taillandier, P. (2010). Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction. *Food Microbiol.* *27*, 150–157.
- Nelder, J.A. (1961). The Fitting of a Generalization of the Logistic Curve. *Biometric* *17*, 89–110.
- Nelson, R.R., Acree, T.E., and Butts, R.M. (1978). Isolation and identification of volatiles from Catawba wine. *J. Agric. Food Chem.* *26*, 1188–1190.
- Nguyen, N.H., Suh, S.-O., and Blackwell, M. (2007). Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycologia* *99*, 842–858.
- Nissen, P., and Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* *180*, 257–263.
- Nissen, P., Nielsen, D., and Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* *20*, 331–341.
- Nissen, P., Nielsen, D., and Arneborg, N. (2004). The relative glucose uptake abilities of non-*Saccharomyces* yeasts play a role in their coexistence with *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *64*, 543–550.
- Nordstöm, K. (1968). Yeast growth and glycerol formation II. Carbon and redox balances. *J Inst Brew* *74*, 429–432.
- Novak, M., Strehaiano, P., Moreno, M., and Goma, G. (1981). Alcoholic fermentation: On the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* *23*, 201–211.
- Ohara, H., Hiyama, K., and Yoshida, T. (1992). Non-competitive product inhibition in lactic acid fermentation from glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *36*, 773–776.
- OIV (2017). *Eléments de conjonture mondiale*.
- Ough, C.S., and Amerine, M.A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines* (New York: J. Wiley).
- Oura, E. (1977). Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem.*
- Pacheco, A., Santos, J., Chaves, S., Almeida, J., Leo, C., and Joo, M. (2012). The Emerging Role of the Yeast *Torulaspora delbrueckii* in Bread and Wine Production: Using Genetic Manipulation to Study Molecular Basis of Physiological Responses. In *Structure and Function of Food Engineering*, A. Amer Eissa, ed. (InTech), p.
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., and Forstová, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* *390*, 37398.

- Pandey, B.K., Srivastava, S., Singh, M., and Ghosh, J.K. (2011). Inducing toxicity by introducing a leucine-zipper-like motif in frog antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochem. J.* *436*, 609–620.
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J.C., Amores, F., Daniel, H.-M., and De Vuyst, L. (2011). Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional Ecuadorian Spontaneous Cocoa Bean Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 7698–7714.
- Parks, L.W., and Adams, B.G. (1978). Metabolism of Sterols in Yeast. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* *6*, 301–341.
- Parks, L.W., and Casey, W.M. (1995). Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* *49*, 95–116.
- Pattey, E., and de Jong, R. (1998). Biological Systems Modelling Workshop/Atelier sur la modélisation des systèmes biologiques. *Can. J. Soil Sci.* *78*, 407–408.
- Patton, J.L., and Lester, R.L. (1991). The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J. Bacteriol.* *173*, 3101–3108.
- Pearl, R. (1927). The Growth of Populations. *Q. Rev. Biol.* *2*, 532–548.
- Pérez-Torrado, R., Rantsiou, K., Perrone, B., Navarro-Tapia, E., Querol, A., and Cocolin, L. (2017). Ecological interactions among *Saccharomyces cerevisiae* strains: insight into the dominance phenomenon. *Sci. Rep.* *7*, 43603.
- Pfeiffer, P., and Radler, F. (1984). Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Arch. Microbiol.* *137*, 357–361.
- Pfisterer, E., Hancock, I., and Garrison, I. (1977). Effects of fermentation environment on yeast lipid synthesis. *J Am Soc Brew Chem* *35*, 49–54.
- Philliskirk, G., and Young, T.W. (1975). The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie Van Leeuwenhoek* *41*, 147–151.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J.A., and Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* *21*, 439–447.
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J.C., and Ortega, J.M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* *20*, 217–224.
- Pommier, S. (2003). Dynamique de populations microbiennes en culture mixte: étude expérimentale en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez *Saccharomyces cerevisiae*.
- Pommier, S., Strehaiano, P., and Delia, M. (2005). Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: a case of amensalism. *Int. J. Food Microbiol.* *100*, 131–139.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* *16*, 675–729.

- Pretorius, I.S., Augustyn, O., and Jolly, N. (2003). The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South Afr. J. Enol. Vitic.* *24*, 35–42.
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., and Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *Int. J. Food Microbiol.* *181*, 85–91.
- Racine, J.S. (2012). RStudio: A Platform-Independent IDE for R and Sweave. *J. Appl. Econom.* *27*, 167–172.
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñeiro, A., and Ribas, J.C. (2015). A new wine *Torulasporea delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Front. Microbiol.* *6*, 983.
- Ramkrishna, D., Fredrickson, A.G., and Tsuchiya, H.M. (1967). Dynamics of microbial propagation: Models considering inhibitors and variable cell composition. *Biotechnol. Bioeng.* *9*, 129–170.
- Ramon-Portugal (1995). Interactions de type killer entre levures: analyses cinétiques, co-culture et modélisation. Thèse INP Toulouse, France, 1995, 169 p.
- Ramon-Portugal, F., Delia, M.L., Strehaiano, P., and Riba, J.P. (1997). Mixed culture of killer and sensitive *Saccharomyces cerevisiae* strains in batch and continuous fermentations. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *14*, 83–87.
- Rattray, J.B., Schibeci, A., and Kidby, D.K. (1975). Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* *39*, 197–231.
- Raucourt, A. de, Girard, D., Prigent, Y., and Boyaval, P. (1989). Lactose continuous fermentation with cells recycled by ultrafiltration and lactate separation by electro dialysis: modelling and simulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *30*, 521–527.
- Ravaz, N. (1992). Croissance de populations levuriennes mixtes : effet Killer : analyse et modélisation. Toulouse, INPT.
- Redón, M., Guillamón, J.M., Mas, A., and Rozès, N. (2009). Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature. *Eur. Food Res. Technol.* *228*, 833–840.
- Réglementation européenne (1999). Règlement (CE) N° 1493/1999 conseil portant organisation commune du marché vitivinicole.
- Reinsch, C.H. (1967). Smoothing by spline functions. *Numer. Math.* *10*, 177–183.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., and Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* *134*, 201–210.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.-C., and Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int. J. Food Microbiol.* *207*, 40–48.

- Renault, P., Coulon, J., Moine, V., Thibon, C., and Bely, M. (2016). Enhanced 3-Sulfanylhexan-1-ol Production in Sequential Mixed Fermentation with *Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Situation of Synergistic Interaction between Two Industrial Strains. *Front. Microbiol.* *7*.
- Renault, P.E., Albertin, W., and Bely, M. (2013). An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *97*, 4105–4119.
- Renouf, V. (2006). Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres – relation avec la qualité du vin.
- Ribéreau-Gayon, P. (1991). *Le vin* (Paris: Presses Universitaires de France).
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., and Donèche, B. (2006). *Handbook of enology* (Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: John Wiley).
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., and Maujean, A. (2012). *Traité d'œnologie*. 2, 2, (Paris: Dunod : La Vigne).
- Richards, F.J. (1959). A Flexible Growth Function for Empirical Use. *J. Exp. Bot.* *10*, 290–301.
- Riezman, H. (2006). Organization and functions of sphingolipid biosynthesis in yeast. *3*.
- Rivero, D., Berná, L., Stefanini, I., Baruffini, E., Bergerat, A., Csikász-Nagy, A., De Filippo, C., and Cavalieri, D. (2015). Hsp12p and PAU genes are involved in ecological interactions between natural yeast strains: Natural yeast interactions. *Environ. Microbiol.* *17*, 3069–3081.
- Rizk, Z., El Rayess, Y., Ghanem, C., Mathieu, F., Taillandier, P., and Nehme, N. (2016). Impact of inhibitory peptides released by *Saccharomyces cerevisiae* BDX on the malolactic fermentation performed by *Oenococcus oeni* Vitilactic F. *Int. J. Food Microbiol.* *233*, 90–96.
- Rodicio, R., and Heinisch, J.J. (2009). Sugar Metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Yeasts. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, H. König, G. Uden, and J. Fröhlich, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), p.
- Rodriguez, R.J., Low, C., Bottema, C.D., and Parks, L.W. (1985). Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Lipids Lipid Metab.* *837*, 336–343.
- Rodriguez-Cousino, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., and Ramírez, M. (2011). A New Wine *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin (Klus), Encoded by a Double-Stranded RNA Virus, with Broad Antifungal Activity Is Evolutionarily Related to a Chromosomal Host Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 1822–1832.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., and Maifreni, M. (1997). Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* *82*, 615–618.
- Rozès, N. (1992). Contribution à l'étude du métabolisme lipidique de *Saccharomyces Cerevisiae*: application à la différenciation des levures du vin.



Sabate, Cano, Querol, and Guillamon (1998). Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* *26*, 452–455.

Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., and Alexandre, H. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol.* *32*, 243–253.

Sajbidor, J., and Grego, J. (1992). Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiol. Lett.* *93*, 13–16.

Salgado, M.E., Albasi, C., and Riba, J.-P. (2000). A two-reservoir, hollow-fiber bioreactor for the study of mixed-population dynamics: Design aspects and validation of the approach. *Biotechnol Bioeng* 401–408.

Salgado Manjarrez (1999). Conception et mise en oeuvre d'un bioréacteur à membranes pour l'étude de la dynamique de populations mixtes de micro-organismes. Thèse INP Toulouse, France, 141 p.

Salmon, J.-M. (1998). La levure de fermentation alcoolique. Chap 1: Relations levures-milieu. In *Œnologie fondements scientifiques et technologiques*, (Londres; Paris; New York: Tec & doc-Lavoisier), p. 1311.

Salmon, J.-M., and Barre, P. (1998). Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 3831–3837.

Salmon, J.M., Vincent, O., Mauricio, J.C., Bely, M., and Barre, P. (1993). Sugar Transport Inhibition and Apparent Loss of Activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a Major Limiting Factor of Enological Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* *44*, 56.

Salmon, J.-M., Fornairon, C., and Barre, P. (1998). Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* *86*, 154–163.

Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., and Guillamón, J.M. (2011). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* *28*, 1155–1161.

Santos, A., and Marquina, D. (2004). Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* *150*, 2527–2534.

Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., and Marquina, D. (2009). PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* *155*, 624–634.

Seo, J.-K., Lee, M.J., Go, H.-J., Park, T.H., and Park, N.G. (2012). Purification and characterization of YFGAP, a GAPDH-related novel antimicrobial peptide, from the skin of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. *Fish Shellfish Immunol.* *33*, 743–752.

- Shampine, L.F., and Reichelt, M.W. (1997). The MATLAB ODE Suite. *SIAM J. Sci. Comput.* *18*, 1–22.
- Shinohara, T., Kubodera, S., and Yanagida, F. (2000). Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* *90*, 90–97.
- Siewewerts, S., de Bok, F.A.M., Hugenholtz, J., and van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2008). Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 4997–5007.
- Silva, A., Almeida, B., Sampaio-Marques, B., Reis, M.I.R., Ohlmeier, S., Rodrigues, F., Vale, A. do, and Ludovico, P. (2011). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a specific substrate of yeast metacaspase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1813*, 2044–2049.
- Sirover, M.A. (2005). New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* *95*, 45–52.
- Smith, F.E. (1963). Population dynamics in *Daphnia magna* and a new model for population growth. *Ecology* *44*, 651–663.
- Soares, G.A.M., and Sato, H.H. (1999). Killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against Fleischmann and Itaiquara commercial brands of yeast. *Rev. Microbiol.* *30*, 253–257.
- Soubeyrand, V., Luparia, V., Williams, P., Doco, T., Vernhet, A., Ortiz-Julien, A., and Salmon, J.-M. (2005). Formation of Micella Containing Solubilized Sterols during Rehydration of Active Dry Yeasts Improves Their Fermenting Capacity. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 8025–8032.
- Souza, C.M., and Pichler, H. (2007). Lipid requirements for endocytosis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1771*, 442–454.
- Stoll, A., and Duncan, J.R. (1996). Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.* *18*, 1209–1212.
- Strehaiano, P., Nehme, N., Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., Mathieu, F., and Taillandier, P. (2008). Microbial interaction in winemaking. In *Current Topics on Bioprocesses in Food Industry*, (Asiatech), p. 518.
- Šubík, J., Kolarov, J., and Kováč, L. (1972). Obligatory requirement of intramitochondrial ATP for normal functioning of the eukaryotic cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *49*, 192–198.
- Sumrada, R.A., and Cooper, T.G. (1982). Isolation of the CAR1 Gene from *Saccharomyces cerevisiae* and Analysis of Its Expression. *Mol. Cell. Biol.* *2*, 1514–1523.
- Taillandier, P., Ramonportugal, F., Fuster, A., and Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiol.* *24*, 95–100.
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., and Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *30*, 1959–1967.

- Takamatsu, T., Shioya, S., Chikatani, H., and Dairaku, K. (1985). Comparison of simple population models in a baker's yeast fed-batch culture. *Chem. Eng. Sci.* *40*, 499–507.
- Taniguchi, M., Kotani, N., and Kobayashi, T. (1987). High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross-flow filtration. *J. Ferment. Technol.* *65*, 179–184.
- Tataridis, P. (2001). Etude des interactions entre micro-organismes du vin: du qualitatif au quantitatif. Thèse INP Toulouse, France, 270p.
- Tataridis, P., Kanelis, A., Logotetis, S., and Nerancis, E. (2013). Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Zb. Matice Srp. Za Prir. Nauke* 415–426.
- Tayeb, J., Bouillanne, C., and Desmazeaud, M.J. (1984). Computerized control of growth with temperature in a mixed culture of lactic acid bacteria. *J. Ferment. Technol.* *62*, 461–470.
- Tessier, G. (1942). Croissance des populations bactériennes et quantité d'aliment disponible. *Rev. Sci. Paris* *3208*, 209–214.
- Thomas, D.S., Hossack, J.A., and Rose, A.H. (1978). Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* *117*, 239–245.
- Toh, D.W.K., Chua, J.Y., and Liu, S.Q. (2018). Impact of simultaneous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* on volatile and non-volatile constituents in beer. *LWT* *91*, 26–33.
- Tohyama, M., Patarinska, T., Qian, Z., and Shimizu, K. (2002). Modeling of the mixed culture and periodic control for PHB production. *Biochem Eng J* *10* 2002157-173.
- Tokuoka, K., Ishitani, T., Goto, S., and Komagata, K. (1985). Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* *31*, 411–427.
- Tronchoni, J., Curiel, J.A., Morales, P., Torres-Pérez, R., and Gonzalez, R. (2017). Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *Int. J. Food Microbiol.* *241*, 60–68.
- Tsao, G.T., and Hanson, T.P. (1975). Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. *Biotechnol. Bioeng.* *17*, 1591–1598.
- Tsoularis, A., and Wallace, J. (2002). Analysis of logistic growth models. *Math. Biosci.* *179*, 21–55.
- Tsuchiya, H.M., Drake, J.F., Jost, J.L., and Fredrickson, A.G. (1972). Predator-Prey Interactions of *Dictyostelium discoideum* and *Escherichia coli* in Continuous Culture. *J. Bacteriol.* *110*, 1147–1153.
- Turner Jr., M.E., Bradley Jr., E.L., Kirk, K.A., and Pruitt, K.M. (1976). A theory of growth. *Math. Biosci.* *29*, 367–373.
- van Uden, N. (1985). Ethanol Toxicity and Ethanol Tolerance in Yeasts. In *Annual Reports on Fermentation Processes*, (Elsevier), pp. 11–58.

- Ugliano, M., Henschke, P.A., Herderich, M.J., and Pretorius, I.S. (2007). Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Wine Ind. J.* **22**, 24–30.
- Vadasz, A.S., Franken, D.B., Govender, B.L., Jagganath, D.B., Govender, P., Ariatti, M., Pretorius, I.S., and Gupthar, A.S. (2002). Properties of a wine yeast antagonist, *Saccharomyces cerevisiae* T206. a review.
- Van der Rest, M., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **59**, 304–322.
- Veglio, F., and Beolchini, F. (1997). Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* **44**, 301–316.
- Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M.L., Hernández, L.M., and Ramírez, M. (2015). Effects of new *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Front. Microbiol.* **6**, 1222.
- Vereecken, K.M., Dens, E.J., and Van impe, J.F. (2000). Predictive Modeling of Mixed Microbial Populations in Food Products: Evaluation of Two-species Models. *J. Theor. Biol.* **205**, 53–72.
- Verhulst, P.F. (1838). Notice sur la loi que suit la population dans son accroissement. *10*, 113–120.
- Viegas, C.A., Rosa, M.F., Sá-Correia, I., and Novais, J.M. (1989). Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 21–28.
- Vigh, L., Maresca, B., and Harwood, J.L. (1998). Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem. Sci.* **23**, 369–374.
- Villalba, M.L., Susana Sáez, J., del Monaco, S., Lopes, C.A., and Sangorrín, M.P. (2016). TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **217**, 94–100.
- Visser, W., Scheffers, W.A., Batenburg-van der Vegte, W.H., and van Dijken, J.P. (1990). Oxygen requirements of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3785–3792.
- Vo-Van, Q.-B. (2015). Exploration fonctionnelle de la réponse au stress chez des micro-organismes d'intérêt technologique : Dynamique de la réponse membranaire suite au stress éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae*.
- Wagener, J., Schneider, J.J., Baxmann, S., Kalbacher, H., Borelli, C., Nuding, S., Kuchler, R., Wehkamp, J., Kaeser, M.D., Mailänder-Sanchez, D., et al. (2013). A Peptide Derived from the Highly Conserved Protein GAPDH Is Involved in Tissue Protection by Different Antifungal Strategies and Epithelial Immunomodulation. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 144–153.
- Wang, N., and Stephanopoulos, G. (1984). A New Approach to Bioprocess Identification and Modeling. *Biotechnol. Bioeng.* **635–656**.
- Wang, Y., and Dohlman, H.G. (2004). Pheromone Signaling Mechanisms in Yeast: A Prototypical Sex Machine. *Science* **306**, 1508–1509.

- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., and Moo-Young, M. (2008). Kinetic Modeling of Cell Growth and Product Formation in Submerged Culture of Recombinant *Aspergillus Niger*. *Chem. Eng. Commun.* *196*, 481–490.
- Wang, Z., Lauwerijssen, M.J.C., and Yuan, J. (2005). Combined age and segregated kinetic model for industrial-scale penicillin fed-batch cultivation. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* *10*, 142–148.
- Wayman, M., and Tseng, M.C. (1976). Inhibition-threshold substrate concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* *18*, 383–387.
- Webb, J.L. (1963). *Enzyme and metabolic inhibitors* (London).
- Wells, G., and Lester, R. (1983). The isolation and characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that requires a long chain base for growth and for synthesis of phosphosphingolipids. *J. Biol. Chem.* *258*, 10200–10203.
- Welthagen, J. (1998). Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* *41*, 185–194.
- Wheals, A.E. (1981). The timing of events in the *saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In *Advances in Biotechnology*, (Pergamon), pp. 549–554.
- Wiemken, A., and Dürr, M. (1974). Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* *101*, 45–57.
- Wiemken, A., and Nurse, P. (1973). Isolation and characterization of the amino-acid pools located within the cytoplasm and vacuoles of *Candida utilis*. *Planta* *109*, 293–306.
- Williams, F.M. (1967). A model of cell growth dynamics. *J. Theor. Biol.* *15*, 190–207.
- Williams, K.M., Liu, P., and Fay, J.C. (2015). Evolution of ecological dominance of yeast species in high-sugar environments: evolution of yeast dominance. *Evolution* *69*, 2079–2093.
- Woods, D.R., and Bevan, E.A. (1968). Studies on the Nature of the Killer Factor Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* *51*, 115–126.
- Wuster, A., and Babu, M.M. (2008). Chemical Molecules that Regulate Transcription and Facilitate Cell-to-Cell Communication. In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p.
- Yano, T., and Koga, S. (1969). Dynamic behavior of the chemostat subject to substrate inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* *11*, 139–153.
- Yeh, P.L.-H., Bajpai, R.K., and Iannotti, E.L. (1991). An improved kinetic model for lactic acid fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* *71*, 75–77.
- You, K.M., Rosenfield, C.-L., and Knipple, D.C. (2003). Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 1499–1503.
- Yuan, J.-Q., Bellgardt, K.-H., Deckwer, W.-D., and Jiang, W.-S. (1993). Modification and verification of the dynamic cell cycling model for baker's yeast. *Bioprocess Eng.* *9*, 173–182.

Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C., Fasch, E.-V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *173*, 2026–2034.

Zupan, J., Avbelj, M., Butinar, B., Kosel, J., Šergan, M., and Raspor, P. (2013). Monitoring of Quorum-Sensing Molecules during Minifermentation Studies in Wine Yeast. *J. Agric. Food Chem.* *61*, 2496–2505.

## **ANNEXE**

---

## Annexe 1 : Description du ralentissement de la croissance

Des aménagements de la loi logistique permettent de mieux prendre en compte la phase de ralentissement (Tableau 28). Certains modèles s'appuient sur une limitation par le substrat (Tableau 29). D'autres modèles tiennent compte d'une limitation et d'une inhibition par le substrat (Tableau 30). Il existe des modèles basés sur une action inhibitrice d'un ou plusieurs métabolites (Tableau 31). Enfin certains modèles tiennent compte de multiples inhibitions et limitations (Tableau 32). Ces tableaux s'appuient sur les travaux de synthèse de Marín (1999), de Ramon-Portugal (1995) et de (Loustau, 2015).

Tableau 28 Modèles dérivés de la loi logistique ( $\mu_{max}$ : taux de croissance maximal,  $X$ : biomasse,  $K$ : biomasse maximale)

Modèle	Remarque	Référence
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \ln\left(\frac{K}{X}\right)$		Gompertz, 1825
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left(1 - \left(\frac{X}{K}\right)^{1/n}\right)$	n: constante strictement positive	Richards, 1959 Nelder, 1961
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left(\frac{K - X}{K + \frac{\mu_{max}}{c}X}\right)$	c: taux de maintenance pendant la phase stationnaire	Smith, 1963
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X^a(K - X)^b$	a et b: constantes strictement positives	Blumberg, 1968
$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max}}{K^n} X^{1-np} (K^n - X^n)^{1+p}$	n et p: constantes telles que : $n > 0$ $-1 < p < 1/n$	Turner Jr. <i>et al.</i> , 1976
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{1}{1 + \frac{ae^{bt}}{\mu_{max} - a}}$	a et b: constantes t: temps	Amrane et Prigent, 1994
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X^\alpha \left(1 - \left(\frac{X}{K}\right)^\beta\right)^\gamma$	$\alpha, \beta$ et $\gamma$ : constantes positives	Tsoularis et Wallace, 2002



Tableau 29 Modèles exprimant la dépendance de la croissance à une limitation en substrat ( $\mu_{max}$ : taux de croissance maximal,  $X$ : biomasse,  $S$ : concentration en substrat,  $K_S$ : constante de saturation du modèle de Monod)

Modèle	Remarque	Référence
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S}$		Monod, 1941
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left(1 - e^{-S/K}\right)$	K: constante cinétique	Tessier, 1942
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S^n}{S^n + K_S}$	n: constante strictement positive	Moser, 1958
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left( \frac{E_1}{K_{E1} + E_1} \right) \dots \left( \frac{E_n}{K_{En} + E_n} \right)$ $\mu_{max} = \left( k_0 + \frac{k_1 S_1}{K_{S1} + S_1} + \dots + \frac{k_m S_m}{K_m + S_{Sm}} \right)$	E: substrats essentiels à la croissance (par exemple source C et N...) n: nombre de substrat essentiel à la croissance K <sub>E</sub> : constante de saturation du modèle de Monod S: substrats permettant d'améliorer la croissance (par exemple facteur de croissance) m: nombre de substrats améliorant la croissance k: constantes cinétiques K <sub>S</sub> : constantes basées sur la constante du modèle de Monod	Tsao et Hanson, 1975
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{K_S - S}$		Hanson et Tsao, 1972
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \prod_i^n \left(1 - e^{-K(S_i - S_{i_{lim}})}\right)$	$S_{i_{lim}}$ : Concentration minimale de substrat nécessaire pour la croissance K: constante cinétique	Cloutier <i>et al.</i> , 2008

Tableau 30 Modèles exprimant la dépendance de la croissance à une limitation et une inhibition par le substrat ( $\mu_{max}$  : taux de croissance maximal,  $X$  : biomasse,  $S$  : concentration en substrat,  $K_S$  : constante de saturation du modèle de Monod)

Modèle	Remarque	Référence
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_i}} \left(1 + \frac{S}{K}\right)$	$K_i$ : constante d'inhibition $K$ : constante (signification non précisée)	Webb, 1963 Edwards, 1970
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{(S + K_S) \left(1 + \frac{S}{K_i}\right)}$	$K_i$ : constante d'inhibition	Andrews, 1968
$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max}X}{(K_S/S) + 1 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{S}{K_i}\right)^i}$	$K_i$ : constante d'inhibition	Yano et Koga, 1969
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left(e^{-S/K_i} - e^{-S/K_S}\right)$	$K_i$ : constante d'inhibition	Edwards, 1970
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_i} \left(1 + \frac{S}{K}\right)}$	$K_i$ : constante d'inhibition $K$ : constante (signification non précisée)	Edwards, 1970
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} e^{-S/K_i}$	$K_i$ : constante d'inhibition	Edwards, 1970
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S}, \quad \text{when } S < S_c$ $\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} - K_i(S - S_c), \quad \text{when } S > S_c$	$K_i$ : constante d'inhibition $S_c$ : concentration critique en substrat	Wayman et Tseng, 1976
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{S}{S_c}\right)^n$	$S_c$ : concentration critique en substrat $n$ : constante strictement positive	Luong, 1987
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left(1 - \frac{S}{S_c}\right)^n \frac{S}{S + K_S \left(1 - S/S_c\right)^m}$	$S_c$ : concentration critique en substrat $n$ et $m$ : constante strictement positive	Han et Levenspiel, 1988

Tableau 31 Modèles exprimant la dépendance de la croissance à une inhibition par le substrat ( $\mu_{max}$ : taux de croissance maximal, X: biomasse)

Modèle	Remarque	Référence
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X(1 - a(P - b))$	a et b: constantes empiriques	Holzberg <i>et al.</i> , 1967
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X\left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^n$	P <sub>c</sub> : concentration critique en produit n : constante strictement positive	Levenspiel, 1980
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{K_P}{P + K_P}$	K <sub>P</sub> : constante d'inhibition	Tayeb <i>et al.</i> , 1984
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}Xe^{(-aP+b)}$	P: concentration en produit a et b: constantes empiriques	Taniguchi <i>et al.</i> , 1987
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{1}{1 + \frac{ae^{bP}}{\mu_{max} - a}}$	a et b : constantes P : concentration en produit	Amrane et Prigent, 1994

Tableau 32 Modèles exprimant une dépendance de la croissance à de multiples inhibitions et limitations ( $\mu_{max}$  : taux de croissance maximal, X: biomasse, S: concentration en substrat, K<sub>s</sub>: constante de saturation du modèle de Monod, P: concentration en produit)

Modèle	Remarque	Référence
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + BX}$	B: constante (signification non précisée)	Contois, 1959
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} (1 - K_P P)$	K <sub>P</sub> : constante d'inhibition	Hinshelwood, 1946
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} (1 - K_P P)$	K <sub>P</sub> : constante d'inhibition	Ramkrishna <i>et al.</i> , 1967
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} e^{-K_P P}$	K <sub>P</sub> : constante d'inhibition	Aiba <i>et al.</i> , 1968
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} \frac{K_P}{K_P + P}$	K <sub>P</sub> : constante d'inhibition	(Aiba et Shoda, 1969) Novak <i>et al.</i> , 1981
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^{0,5}$	P <sub>c</sub> : concentration critique en produit	Bazua et Wilke, 1977
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} - \left(\frac{aP}{b - P}\right)$	a et b: constante strictement positive	Bazua et Wilke, 1977
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \frac{S}{S + K_S} \frac{K_P}{S + K_P P}$	K <sub>P</sub> : constante d'inhibition	(Aborhey et Williamson, 1978)

Modèle (suite)	Remarque (suite)	Référence (suite)
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^n$	P <sub>c</sub> : concentration critique en produit n: constante strictement positive	Levenspiel, 1980
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^n \frac{S}{S + K_S \left(1 - P/P_c\right)^m}$	P <sub>c</sub> : concentration critique en produit n et m: constante strictement positive	Han et Levenspiel, 1988
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \left(\frac{P}{P_c}\right)^n\right)$	P <sub>c</sub> : concentration critique en produit n: constante strictement positive	Luong, 1985
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \frac{S}{S + K_S} \frac{1}{1 + P^2}$		Kishimoto <i>et al.</i> , 1983
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \frac{S}{S + K_S \left(\frac{P}{K_P} + 1\right)^2}$	K <sub>p</sub> : constante d'inhibition	Leh et Charles, 1989
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \frac{S}{S + K_S + SPK_P}$	K <sub>p</sub> : constante d'inhibition	(Ishizaki <i>et al.</i> , 1989)
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \frac{S}{K_S + S \left(1 + P/K_P\right)}$	K <sub>p</sub> : constante d'inhibition	Ishizaki et Ohta, 1989
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \frac{S}{K_S + S + \frac{SP^2}{K_P}}$	K <sub>p</sub> : constante d'inhibition	Béal <i>et al.</i> , 1994
$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \frac{S}{S + K_S}, \quad \text{when } P < P_c$ $\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \frac{S}{S + K_S} e^{(-k(P-P_c))},$ $\text{when } P > P_c$	P <sub>c</sub> : concentration critique en produit k: constante empirique	Yeh <i>et al.</i> , 1991

## Annexe 2 : Modèles décrivant la production de métabolites

Certains modèles utilisés pour décrire la production de métabolites sont inspirés du modèle de Luedeking-Piret (Tableau 33), d'autres ne le sont pas (Tableau 34). Ces tableaux s'appuient sur le travail de synthèse de Loustaunau (2015).

Tableau 33 Modèles, basés sur le modèle de Luedeking-Piret, exprimant la vitesse spécifique de production d'un métabolite ( $\mu$ : taux de croissance)

Modèle	Remarque	Référence
$\frac{dP}{dt} = a \ln \frac{X}{\mu} - b - cP$	a, b et c : constantes empiriques X: biomasse P: concentration en substrat	Holzberg <i>et al.</i> , 1967
$v = 2f \left( \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \mu + mY_{P/S} \right)$	f: fraction en substrat consommé pour la fermentation (dépend de la température) Y <sub>P/S</sub> : rendement en produit par rapport au substrat Y <sub>X/S</sub> : rendement en biomasse par rapport au substrat m: coefficient de maintenance	Boulton, 1980 Caro <i>et al.</i> , 1991
$v = a\mu + b(1 - e^{-c\mu})$	a, b et c: constantes empiriques	Raucourt <i>et al.</i> , 1989 Amrane et Prigent, 1994
$v = Y_{P/X}\mu$	Y <sub>P/S</sub> : rendement en produit par rapport à la biomasse	Coleman et Block, 2006
$v = (\alpha\mu + \beta) \frac{K_i}{K_i + S}$	$\alpha$ et $\beta$ : constante du modèle de Luedeking-Piret K <sub>i</sub> : constante d'inhibition S: concentration en substrat	Wang <i>et al.</i> , 2008
$v = Y_{P/X} \frac{\mu_{max} S}{S + K_S} + \alpha$	$\mu_{max}$ : taux de croissance maximal S: concentration en substrat K <sub>S</sub> : constante de saturation Y <sub>P/S</sub> : rendement en produit par rapport à la biomasse $\alpha$ : constante (signification non spécifiée)	Gomez <i>et al.</i> , 2013

Tableau 34 : Modèle exprimant la vitesse spécifique de production d'un métabolite ( $v_m$  : vitesse maximale de production,  $S$  : concentration en substrat,  $P$  : concentration en produit)

Modèle	Remarque	Référence
$v = v_m e^{(-KP)}$	K: constante empirique	Aiba <i>et al.</i> , 1968
$v = aS$	a: constante cinétique	Hanson et Tsao, 1972
$v = v_m \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \left(\frac{P}{P_c}\right)^n\right)$	K <sub>S</sub> : constante de saturation P <sub>C</sub> : concentration en produit au-dessus de laquelle les cellules ne produisent plus n: constante strictement positive	Luong, 1985
$v = v_m \frac{S}{K_P + S \left(1 + S/K_i\right)} - kP$	K <sub>P</sub> : constante de saturation K <sub>i</sub> : constante d'inhibition k: constante de dégradation du produit	Bajpai et Reuß, 1981 Moser et Schneider, 1989
$v = v_m \frac{S}{S + K_S}$ , when $P < P_c$ $v = v_m \frac{S}{S + K_S} e^{(-k(P-P_c))}$ , when $P > P_c$	K <sub>S</sub> : constante de saturation P <sub>C</sub> : concentration critique en produit k: constante empirique	Yeh <i>et al.</i> , 1991
$v = v_m \frac{S}{S + K_S} \frac{K_P}{K_P + P}$	K <sub>S</sub> : constante de saturation K <sub>P</sub> : constante d'inhibition	Ohara <i>et al.</i> , 1992
$v = v_m \left(1 - e^{-t/t_m}\right)$	t: temps t <sub>m</sub> : temps de début de production	Bona et Moser, 1997
$v = \frac{v_m S}{S + K_S}$	K <sub>S</sub> : constante de saturation	Cramer <i>et al.</i> , 2002
$v = v_m \frac{1}{1 + K_I S} - kP$	K <sub>i</sub> : constante d'inhibition k: constante de dégradation du produit	Gelmi <i>et al.</i> , 2002
$v = v_m \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)$	P <sub>C</sub> : concentration critique en produit	Kiviharju <i>et al.</i> , 2006

## Annexe 3 : Synthèse des résultats obtenus en culture pure

Tableau 35 Récapitulatif des cultures pures de *S. cerevisiae*

Culture pure <i>S. cerevisiae</i>				
Anaérobiose	Non stricte		Stricte	
Milieu	MS170	MS300	MS300	MS300M
Maximum de cellules vivantes (10 <sup>6</sup> cellules/mL)	240 ± 10	281 ± 13	262 ± 27	286 ± 19
Sucres initiaux (g/L)	221 ± 3	222 ± 1	225 ± 4	225 ± 3
Ethanol final (g/L)	101,7 ± 2,6	108,0 ± 1,3	107,7 ± 1,3	98,6 ± 2,1
Rendement éthanol/sucres (g/g)	0,46 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,44 ± 0,01
Temps de fermentation (h)	197 ± 11	117 ± 7	142 ± 7	149 ± 8
Vitesse moyenne de consommation de sucre (g/L/h)	1,13 ± 0,04	1,90 ± 0,02	1,58 ± 0,03	1,51 ± 0,02
Azote assimilable résiduel (mg N/L)	0	0	0	0
Glycérol (g/L)	6,8 ± 0,3	8,3 ± 0,4	7,9 ± 0,3	8,2 ± 0,3
Fraction de carbone non identifiée en fin de fermentation	3 %	0 %	1 %	10 %
Fraction d'azote dans la biomasse en fin de fermentation	5,2 %	6,9 %	-	-
Viabilité finale	86 %	97 %	97 %	91 %

Moyenne de deux expériences ± écart-type

Tableau 36 Récapitulatif des cultures pures de *T. delbrueckii*

Culture pure <i>T. delbrueckii</i>				
Anaérobiose	Non stricte		Stricte	
Milieu	MS170	MS300	MS300	MS300M
Maximum de cellules vivantes (10 <sup>6</sup> cellules/mL)	420 ± 20	542 ± 53	510 ± 9	554 ± 20
Sucres initiaux (g/L)	218 ± 1	222 ± 2	222 ± 4	221 ± 1
Ethanol final (g/L)	96,4 ± 2,6	107,6 ± 1,1	80,2 ± 1,2	72,6 ± 3,4
Rendement éthanol/sucres (g/g)	0,44 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,32 ± 0,02
Temps de fermentation (h)	245 ± 11	218 ± 7	197 ± 10	263 ± 8
Vitesse moyenne de consommation de sucre (g/L/h)	0,91 ± 0,02	1,01 ± 0,01	1,12 ± 0,02	0,84 ± 0,01
Azote assimilable résiduel (mg N/L)	0	8,7 ± 2,5	22,3 ± 10,1	0
Glycérol (g/L)	12,4 ± 0,4	10,3 ± 0,1	9,4 ± 0,2	15,5 ± 0,4
Fraction de carbone non identifiée en fin de fermentation	6 %	0 %	20 %	25 %
Fraction d'azote en fin de fermentation	6,1 %	7,3 %	-	-
Viabilité finale	89 %	76 %	92 %	89 %

Moyenne de deux expériences ± écart-type