



HAL
open science

Intérêt de la cytométrie en flux pour l'optimisation des conditions de fermentation alcoolique

Sarrah Ghorbal, Claire Saulou-Berion, Marielle Bouix

► To cite this version:

Sarrah Ghorbal, Claire Saulou-Berion, Marielle Bouix. Intérêt de la cytométrie en flux pour l'optimisation des conditions de fermentation alcoolique. *Microbes 2023 - 18ème congrès national de la SFM*, Oct 2023, Rennes, France. hal-04506044

HAL Id: hal-04506044

<https://agroparistech.hal.science/hal-04506044v1>

Submitted on 15 Mar 2024

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

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

Intérêt de la cytométrie en flux pour l'optimisation des conditions de fermentation alcoolique

Sarrah GHORBAL, Claire SAULOU-BERION, Marielle BOUIX
AgroParisTech-INRAE, UMR SAYFOOD, Université Pars-Saclay, 91120 - Palaiseau, France

Contexte & Objectifs

L'éthanol carburant fait partie de la stratégie d'utilisation des énergies renouvelables. Le prix faible de l'éthanol industriel impose d'avoir un procédé de production avec une productivité élevée. Pour augmenter la productivité, il faut accélérer la cinétique de production et (ou) avoir des concentrations plus importantes en fin de fermentation. La levure étant responsable de la fermentation alcoolique (FA), une amélioration de la productivité du procédé doit prendre en compte son état physiologique, qui dans un milieu donné, dépend de la température de fermentation, du pH et de la concentration en éthanol. La cytométrie en flux permet de mesurer des paramètres cellulaires en temps réel. Pour optimiser les conditions de température et de pH au cours de la FA, nous avons d'abord réalisé un plan d'expérience complet sur des fermentations en batch, et nous avons déterminé l'évolution de l'état physiologique de la levure par la mesure de 3 paramètres cellulaires par cytométrie en flux : le pourcentage de cellules viables/mortes, le potentiel trans-membranaire et la vitalité cellulaire. Nous avons ensuite réalisé des fermentations continues à 3 étages (se rapprochant des conditions industrielles) pour valider les valeurs de température et de pH ayant permis un état physiologique optimal aux concentrations en éthanol de chaque étage et nous avons calculé la productivité pour chaque condition du système. La fluidité membranaire est mesurée par cytométrie en flux pour évaluer l'effet des différentes conditions sur la membrane.

Matériels & méthodes

Souche et cultures

Souche : *Saccharomyces cerevisiae*: Lesaffre Ethanol Red®
Milieu : glucose 200g, (NH₄)₂SO₄ 2,5g, K₂HPO₄ 0,3g, KH₂PO₄ 0,5g, MgSO₄ 0,3g, YE 2,5g Eau qsp 1000mL

Plan d'expérience en batch : aération 0,5VVM

T° 36 36 36 32 32 32 28 28 28 32 32

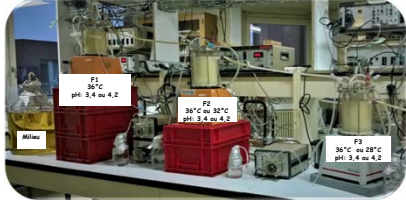
pH 3,4 3,8 4,2 3,4 3,8 4,2 3,4 3,8 4,2 3,8 3,8

Validation en fermentation continue 3 étages :

Etage 1: 36°C, pH 3,4 ou 4,2

Etage 2: 36°C ou 32°C, pH 3,4 ou 4,2

Etage 3: 36°C pH3,4 puis 36°C pH4,2, puis 28°C pH 4,2 puis 28°C pH 3,4



Marquages et analyses cytométriques

Vitalité-Activité

$\Delta IF_{15} (\%) = \frac{IF_{15} - IF_0}{IF_0} \cdot 100$
+ ΔIF_{15} est élevé,
+ les cellules sont actives (1)

Intégrité membranaire, viabilité, mortalité

Membranes intègres: cFDA+, PI-
Cellules viables
Membranes altérées: cFDA-, PI+
Cellules mortes

Potentiel de membrane

Membranes polarisées: DiBac -
Membranes dépolarisées: DiBac +

Fluidité membranaire

Marqueur fluorescent = DPH

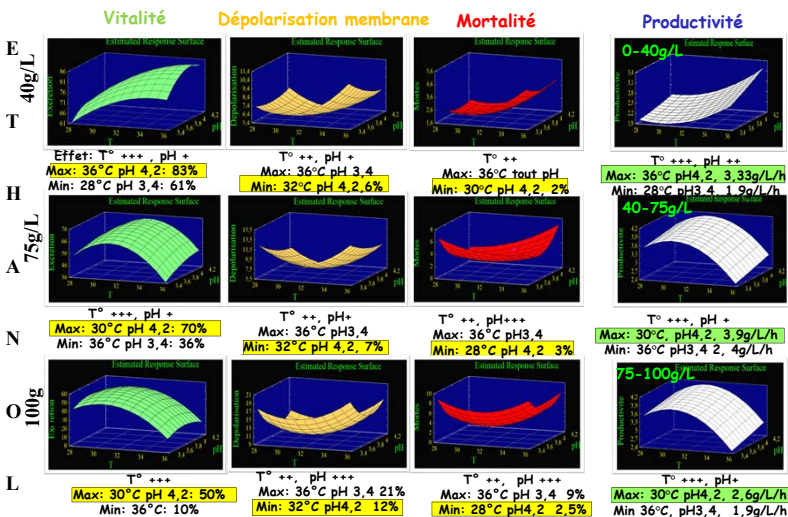
Visqueuse Rotation Partiellement empêchée
Fluide rotation libre

Les intensités de fluorescence des composantes verticale (IVV=mFL3) et horizontale (IVH=mFL4) de la lumière émise par le DPH permettent de calculer l'anisotropie de fluorescence :
 $r = \frac{(mFL3 - mFL4 \cdot G)}{(mFL3 + 2mFL4 \cdot G)}$ (avec G=1). Plus r est élevée, plus la membrane est rigide.

Résultats

Plan d'expérience en batch

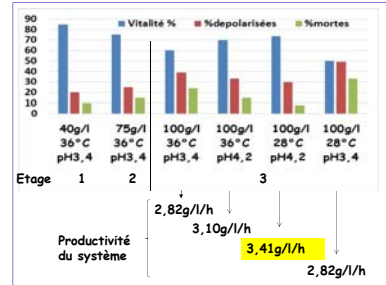
Effets du pH et de la température sur les paramètres cellulaires et sur la productivité en fonction de la concentration en éthanol



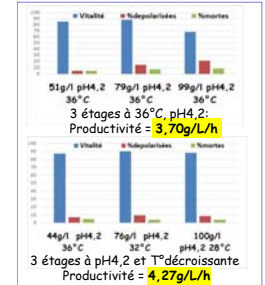
L'état cellulaire est toujours meilleur à pH4,2 qu'aux pH plus bas. La température altère l'état cellulaire d'autant plus que la concentration en éthanol augmente. La vitalité est le paramètre cellulaire le plus sensible aux conditions du milieu (T°, pH et éthanol) et est bien corrélée avec la productivité. Au début de la FA, quand la [éthanol] est faible, une température de 36°C permet une meilleure productivité, mais quand la [éthanol] augmente, les températures plus basses améliorent l'état cellulaire.

Fermentation continue à 3 étages

Effets du pH et de la T° sur les paramètres cellulaires et sur la productivité du 3^e étage



Effet de la T° des étages 2 et 3 sur la productivité



Les essais en continu confirment les résultats en batch : l'état physiologique (vitalité, % cellules mortes et dépolarisées) est amélioré par un pH plus élevé, quelle que soit la température, et une température décroissante quand la concentration en éthanol augmente. L'amélioration de la vitalité cellulaire se traduit par une augmentation de la productivité de la fermentation.

Fluidité membranaire

L'augmentation du pH fluidifie la membrane, mais la T° et la concentration en éthanol ont peu d'effet sur la fluidité membranaire. Ethanol Red® est donc capable d'adapter la composition lipidique de sa membrane pour conserver une fluidité compatible avec son activité au cours de la FA. Les levures capables de maintenir une membrane plus fluide présentent une meilleure résistance à l'éthanol (3). La souche de collection *S.cerevisiae* CLIB 334, qui peine

à terminer la FA dans les mêmes conditions (pH4,2, 28°C), présente une valeur d'anisotropie de 0,228 (plus rigide) à 100g/L d'éthanol avec 55% de cellules mortes.

Discussion Conclusion

Les essais ont été réalisés avec la levure *Lesaffre Ethanol Red®* qui a été sélectionnée pour sa résistance à l'éthanol et à une température élevée. Les résultats ont montré qu'un pH de 4,2 est plus favorable qu'un pH plus acide : la cellule dépense moins d'énergie à pH4,2 pour maintenir son pH intracellulaire qu'à un pH plus acide où l'acide acétique est plus dissocié (pKa=4,6). La productivité est améliorée par une baisse de la température de fermentation quand la concentration en éthanol augmente : sur une fermentation continue, on a donc intérêt à maintenir une température élevée (36°C) (vitesse de production plus élevée) dans le 1^{er} étage, puis à diminuer la température au cours de l'avancement de la FA pour avoir 28°C dans le dernier étage. Les mesures de fluidité membranaire ont confirmé que cette levure est capable d'adapter sa membrane, qui reste fluide au cours de la FA, propriété des levures résistantes à l'éthanol. La cytométrie en flux confirme son intérêt pour le suivi en temps réel de la FA, avec la mesure de paramètres cellulaires, en particulier la vitalité cellulaire qui reflète bien la productivité de la FA.

Références

- Bouix M., Ghorbal S., Saulou-Berion C. - 2022 - A rapid method for the assessment of the vitality of microorganisms using flow cytometry, *Cytometry Part A*, 101, 7, p.577-578
- Bouix M., Ghorbal S. - 2017. Assessment of bacterial membrane fluidity by flow cytometry, *Journal of Microbial Methods*, 143, p.50-5
- Lairon-Péris M., Rutledge S.J., Linney J.A., et al. 2021 Lipid composition analysis reveals mechanisms of ethanol tolerance in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87, 12, p.1-22