

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
GEMBLoux AGRO-BIO TECH

Modélisation et étude expérimentale du
comportement de *Saccharomyces cerevisiae*
(*boulardii*) lors de l'extrapolation du procédé à
des bioréacteurs de volume industriel

Annick LEJEUNE

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
agronomiques et Ingénierie biologique

Promoteurs: Thonart Philippe
Delvigne Frank

2014

Copyright – Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et de ses modifications ultérieures.

Lejeune Annick (2014). Modélisation et étude expérimentale du comportement de *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* lors de l'extrapolation du procédé à des bioréacteurs de volume industriel (Thèse de doctorat). Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech, p 119, tabl 4, fig 46.

Résumé : L'extrapolation de la production d'un microorganisme est un problème complexe qui prend en compte de nombreux paramètres. En effet, les paramètres opératoires induisent des conditions environnementales qui peuvent être dommageables pour les cellules se développant dans le réacteur. Il est donc important de prendre en compte le côté génie chimique pour comprendre quelles sont les conditions hydrodynamiques présentes dans le réacteur et ensuite s'attacher à étudier la réponse des cellules vis-à-vis de ces conditions. Ce travail se place dans le cas particulier de la production de biomasse de *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*. Dans ce cas, le point critique est l'ajout de la solution concentrée de substrat dans le réacteur. L'utilisation de réacteurs *scale-down* a permis d'étudier différents cas de conditions hydrodynamiques défavorables, ainsi que leurs impacts sur différents paramètres. Dans un premier temps, l'étude des paramètres ségrégués (concentration en biomasse, en co-produits...) a montré, notamment, une diminution du rendement et une augmentation de la concentration en éthanol. Ensuite, l'étude s'est placée au niveau cellulaire avec l'utilisation de souches exprimant une protéine recombinante fluorescente et de marqueurs cellulaires fluorescents, couplée à la cytométrie en flux. Ces techniques ont permis de mettre en évidence la présence de différentes sous-populations cellulaires, ainsi que l'apparition du phénomène de résistance cellulaire aux stress lors de la production en réacteurs *scale-down*. L'importance du choix de la méthode de traitement des données cytométriques a également été débattue. Ce travail a abordé différents domaines pour tenter de mieux comprendre la réponse cellulaire aux fluctuations des conditions environnementales ressenties par *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* lors de productions en réacteurs mimant les conditions hydrodynamiques des réacteurs de grands volumes.

Lejeune Annick (2014). Modeling and experimental study of *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* culture during scale-up process (Thèse de doctorat). Gembloux, Belgium, University of Liège – Gembloux Agro-Bio Tech, p 119, tabl 4, fig 46.

Summary: Scaling-up a production of a microorganism is a complex problem that takes into account many parameters. Operating parameters induce environmental conditions that may be problematic for the cells growing in the reactor. It is therefore important to take into account the chemical engineering side to understand what kind of hydrodynamic conditions are present in the reactor and then seek to study the response of cells towards these conditions. This work concerns the particular case of the production of *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* biomass. In this case, the critical point is the addition of concentrated substrate in the reactor. Scale-down reactor was used to study several cases of hydrodynamic conditions and their impacts on different parameters. First, the study of segregated parameters (biomass concentration, by-products...) showed a yield drop or an increase in ethanol concentration, for example. After that, the study was placed at the cellular level thanks to the use of strains expressing a fluorescent protein and cellular staining with fluorescent dyes, coupled with flow cytometry. These techniques have permitted to bring out different cell subpopulations and the emergence of the cell resistance phenomenon to stress during the production in scale-down reactors. The importance of the treatment method of the cytometric data was also discussed. This work has addressed various areas to try to better understand the cellular response to variable environmental conditions experienced by *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* during production in reactors that mimic the hydrodynamic conditions of large volumes reactors.

*I still find each day too short
For all the thoughts I want to think,
All the walks I want to take,
All the books I want to read,
And all the friends I want to see.*

John Burroughs

REMERCIEMENTS

Une thèse de doctorat est un travail long et laborieux, qui dans mon cas, s'est révélé un peu plus long encore... Si j'écris que j'ai eu les larmes aux yeux en rédigeant ces remerciements, ça n'étonnera sans doute pas grand monde. Je suis réellement reconnaissante de toute l'aide, le soutien et les encouragements reçus des personnes citées ci-dessous.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier Mr Philippe Thonart, co-promoteur de cette thèse. Durant toutes ces années, Mr Thonart m'a permis de poursuivre mes travaux au sein du service de Bio-Industries. Il a su m'offrir l'opportunité de travailler sur des projets variés et de m'impliquer dans la vie du laboratoire.

Ensuite, mes remerciements vont à Mr Frank Delvigne. Depuis le début de notre collaboration, Frank a su me motiver pour atteindre enfin la publication et la défense de cette thèse. Il n'est parfois pas facile à suivre, tant ses idées sont nombreuses mais il n'est jamais avare d'explications et de conseils. Merci pour tout ce temps passé à expliquer, conseiller, corriger mes textes,...

Je remercie également les autres membres du jury de cette thèse : Mme Jacqueline Destain, Mme Marie-France Destain, Mme Marianne Sindic, Mr Frédérick Debaste, Mr Michel Crine et Mr François Bera. Merci pour le temps passé à lire et critiquer ce travail. Un merci particulier aux rapporteurs. Merci pour vos critiques et suggestions d'amélioration de mon travail.

De manière générale, je remercie tous les membres du service de Bio-Industries pour la bonne ambiance de travail et les échanges toujours plus riches de la diversité des personnes rencontrées. Merci à Jacqueline pour les diverses collaborations et discussions. Merci à Marguerite et Marina. Merci à Martine, Pascale, Cathy, Annik et Danielle pour leur aide pour les journées portes ouvertes, les accueils d'étudiants, les manipulations de biologie moléculaire,... Un merci particulier à Martine pour son aide précieuse sur les programmes de recherche WALAID et Insectech. Je souhaiterais également remercier Samuel et Benoit qui m'ont aidée à réaliser tous les essais de fermentation. J'ai vécu à la salle fermenteur de nombreuses heures ! Merci aux étudiants que j'ai pu suivre pour les collaborations fructueuses que nous avons pu avoir. Merci aux membres du bureau du 2272, et particulièrement à Christophe T pour son aide précieuse dans de nombreux domaines. Je terminerai ce paragraphe par un petit mot d'encouragement à Cédric ! Dernière ligne droite ! ;-)

J'ai commencé mes études à Gembloux il y a 15 ans, presque jour pour jour. Tout au long de mon parcours dans ces « vieux murs », j'ai eu la chance de rencontrer des amis formidables ! Merci à Julie, Odile, Maud, Nadège, Valérie, Muriel, Lilla, Sandrine, Florian, Omer, Thomas, Jean-François, Jean-Go, Jérémy, Cédric.

Je pense ensuite à ma famille. Mes grands-parents, même s'ils sont partis. Ils sont toujours bien présents, avec moi. Mes parents qui ont toujours soutenu mes entreprises ! Merci de toujours répondre présent ! Ma sœur et mon beau-frère même s'ils ont cru longtemps que je goûtais des yaourts pour Danone ! Finalement, ce n'est pas très important ! ;-) Merci à eux, tout simplement !

Merci à Benoît. Que dire de plus ? Toujours là, prévenant, attentionné. Je t'en ai fait voir ces derniers temps ! Merci à Eline, toujours plus souriante chaque jour !

Je terminerai par un petit mot pour mes petits loulous : Manon, Arthur, Alexandre, Mathias, Pierre, Eline, Elise et Gilles ! Une fois maman, trois fois marraine, deux fois Tata Yoyo ! Merci à vous pour tous les rayons de soleil que vous faites entrer dans ma vie et merci à vos parents pour la confiance qu'ils nous ont témoignée à Ben et moi.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE ET PRÉSENTATION DE LA STRATÉGIE SCIENTIFIQUE 1

1.1. CONTEXTE DU TRAVAIL	2
1.2. STRATÉGIE SCIENTIFIQUE	3
1.3. APERÇU DE LA STRUCTURE DE LA THÈSE	5
1.3.1. DESCRIPTION DU PREMIER AXE DE RECHERCHE.....	5
1.3.1.1. INTITULÉ	5
1.3.1.2. BREF DESCRIPTIF DES TRAVAUX EFFECTUÉS.....	5
1.3.2. DESCRIPTION DU DEUXIEME AXE DE RECHERCHE.....	6
1.3.2.1. INTITULÉ	6
1.3.2.2. BREF DESCRIPTIF DES TRAVAUX EFFECTUÉS.....	6
1.3.3. DESCRIPTION DU TROISIEME AXE DE RECHERCHE.....	7
1.3.3.1. INTITULÉ	7
1.3.3.2. BREF DESCRIPTIF DES TRAVAUX EFFECTUÉS.....	7

CHAPITRE 2 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT L'ÉVALUATION DU STRESS MICROBIEN DANS LES BIO-RÉACTEURS INDUSTRIELS 9

2.1. RÉSUMÉ.....	10
2.2. INTRODUCTION	10
2.3. CARACTÉRISATION DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES DES RÉACTEURS INDUSTRIELS : ENVIRONNEMENT PERÇU À L'ÉCHELLE DU MICROORGANISME....	13
2.3.1. CONFIGURATION DES BIOREACTEURS INDUSTRIELS UTILISES POUR LA CULTURE DE LA LEVURE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	13
2.3.2. ETUDES DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES DES REACTEURS MECANIQUEMENT AGITES	15
2.3.2.1. SCALE-UP ET HÉTÉROGÉNÉITÉS DE MÉLANGE.....	15
2.3.2.2. LE TEMPS DE MÉLANGE, ESTIMATION DE L'EFFICACITÉ DU MÉLANGE.....	16
2.3.2.3. TRANSFERT D'OXYGÈNE.....	19
2.3.2.4. MODÉLISATION DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES DES RÉACTEURS MÉCANIQUEMENT AGITÉS	20

2.4. RÉACTEURS DE LABORATOIRE COMME OUTIL PRÉDICTIF DE L'EXTRAPOLATION DES BIOPROCÉDÉS : APPROCHE <i>SCALE-DOWN</i>	25
2.5. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PARAMÈTRES PHYSIQUES ET PHYSIOLOGIQUES EN COURS DE PRODUCTION : VERS DES PROCÉDURES D'EXTRAPOLATION BASÉES SUR LA PHYSIOLOGIE	27
2.5.1. CAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	28
2.5.2. MESURE DE PARAMETRES PHYSIQUES	30
2.5.3. MESURE DE PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES	31
2.6. CONCLUSION	36
2.7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	36
CHAPITRE 3 : MISE EN ŒUVRE D'UN RÉACTEUR FACILITANT L'EXTRAPOLATION DES BIOPROCÉDÉS : APPROCHE <i>SCALE-DOWN</i>	42
3.1. ABSTRACT	43
3.2. INTRODUCTION	43
3.3. MATERIAL AND METHODS	45
3.3.1. CULTURE OF <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> IN SCALE-DOWN REACTORS (SDR)	45
3.3.2. FERMENTATION FOLLOW-UP	46
3.3.3. MIXING TIME MEASUREMENT	47
3.3.4. HYDRODYNAMIC MODELLING	47
3.3.4.1. SUB-MODEL 1: FLUID MIXING	48
3.3.4.2. SUB-MODEL 2: CIRCULATION OF PARTICLES.....	49
3.3.4.3. SUPERIMPOSITION OF THE TWO SUB-MODELS	49
3.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	49
3.4.1. FERMENTATION TESTS IN SCALE-DOWN REACTOR.....	49
3.4.2. MIXING EFFICIENCY OF SCALE-DOWN REACTORS	53
3.4.3. HYDRODYNAMIC MODELLING OF SCALE-DOWN REACTORS	55
3.5. CONCLUSION AND PERSPECTIVES	59
3.6. ACKNOWLEDGEMENT	60
3.7. REFERENCES.....	60

**CHAPITRE 4 : ETUDE DE TRACEURS PHYSIOLOGIQUES DES
CONDITIONS DE STRESS EN BIO-RÉACTEURS : PARAMÈTRES NON
SÉGRÉGÉS.....63**

4.1. ABSTRACT	64
4.2. INTRODUCTION	64
4.3. MATERIAL AND METHODS	66
4.3.1. CULTURE OF <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> IN SCALE-DOWN REACTORS (SDR)	66
4.3.2. CULTURE OF <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (GFP) IN MINI-BIOREACTORS	67
4.3.3. FERMENTATION FOLLOW-UP	68
4.3.4. TREHALOSE ANALYSIS	68
4.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	69
4.5. CONCLUSION	72
4.6. REFERENCES.....	72

**CHAPITRE 5 : ETUDE DE TRACEURS PHYSIOLOGIQUES DES
CONDITIONS DE STRESS EN BIO-RÉACTEURS : PARAMÈTRES
SÉGRÉGÉS.....74**

**CHAPITRE 5.1. UTILISATION DE MARQUEURS CELLULAIRES POUR
L'ANALYSE EN LIGNE DE LA VIABILITÉ MICROBIENNE EN COURS DE
PROCÉDÉ.....75**

5.1.1. ABSTRACT	75
5.1.2. INTRODUCTION	75
5.1.3. MATERIAL AND METHODS	77
5.1.3.1. YEAST STRAIN AND CULTIVATION MEDIA.....	77
5.1.3.2. BIOREACTOR SET-UP AND RELATED ANALYTICS.....	77
5.1.3.3. ON-LINE FLOW CYTOMETRY PROTOCOL	78
5.1.3.4. CELL SORTING AND CONFOCAL MICROSCOPY	79
5.1.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	79
5.1.4.1. ON-LINE PROFILING OF YEAST POPULATION BY AUTOMATED FLOW CYTOMETRY: OVERALL TRENDS FOR BATCH TO CHEMOSTAT TRANSITION AT TWO NUTRITIONAL STATES (RICH OR MINIMAL MEDIUM)	79
5.1.4.2. BIOLOGICAL VERIFICATION OF DIFFERENT YEAST PHENOTYPIC SUB-POPULATIONS	81

5.1.4.3. MATHEMATICAL METHODS FOR REAL-TIME QUANTIFICATION OF THE DEGREE OF HETEROGENEITY	82
5.1.4.4. IMPACT OF PROCESS PERTURBATIONS ON YEAST POPULATION HETEROGENEITY....	85
5.1.5. CONCLUSIONS	90
5.1.6. ACKNOWLEDGEMENT	91
5.1.7. REFERENCES.....	91
CHAPITRE 5.2. UTILISATION DE SOUCHES DE LEVURES EXPRIMANT UNE PROTÉINE FLUORESCENTE	93
5.2.1. ABSTRACT.....	93
5.2.2. INTRODUCTION.....	93
5.2.3. MATERIAL AND METHODS	96
5.2.3.1. FERMENTATION IN MINI-BIOREACTORS AND STRAINS DESCRIPTIONS.....	96
5.2.3.2. FERMENTATION FOLLOW-UP	97
5.2.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	97
5.2.4.1. MINI-BIOREACTOR PERFORMANCES	97
5.2.4.2. STUDY OF PHYSIOLOGICAL PARAMETERS	99
5.2.5. CONCLUSION	101
5.2.6. REFERENCES.....	101
CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	103
6.1. PRÉAMBULE.....	104
6.2. UTILISATION DE RÉACTEURS <i>SCALE-DOWN</i> COMME OUTIL D'EXTRAPOLATION	105
6.3. MODÉLISATION DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES DES BIORÉACTEURS	107
6.4. PROPOSITION DE BIO-MARQUEURS POUR LE SUIVI DE L'IMPACT DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LES CELLULES	107
6.5. CONCLUSION	110
6.6. PERSPECTIVES	112
6.7. RÉFÉRENCES.....	113

CHAPITRE 7 : RAPPORT DE PUBLICATIONS.....115

7.1. PUBLICATIONS 116

 7.1.1. EN PREMIER AUTEUR : 116

 7.1.2. EN SECOND AUTEUR : 116

 7.1.3. AUTRES 116

7.2. ABSTRACTS DE COLLOQUES 117

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Schématisation d'un gradient de concentration (en glucose par exemple) présent dans un réacteur industriel et représentation de ce même gradient dans un réacteur *scale-down*

Figure 1.2 : Représentation des axes 2 et 3 de la stratégie scientifique de ce travail. A : paramètres non ségrégués, B : paramètres ségrégués

Figure 2.1 : Schéma général des paramètres physiques et physiologiques à prendre en compte pour la réalisation de l'extrapolation d'une culture de microorganismes en bioréacteur de volume industriel et des techniques permettant le suivi de ces paramètres

Figure 2.2 : Représentation de trois grands types de réacteurs utilisés à l'échelle industrielle : a) colonne à bulles, b) réacteur air-lift avec tube de conduite interne, c) réacteur mécaniquement agité pouvant comprendre plusieurs étages d'agitation (ici, un seul étage a été représenté)

Figure 2.3 : Courbe de traceur, représentant la capacité du système à revenir à l'état d'équilibre, pour un réacteur *scale-down* composé d'un réacteur agité de 20 litres et d'une partie non agitée de 1 litre, à des vitesses de recirculation de 18 l/h et 39 l/h [31]

Figure 2.4 : Décomposition de la cuve en zones homogènes interconnectées par les flux de circulation (les flux de turbulence ne sont pas représentés) : cas d'un réacteur muni d'un axe avec deux agitateurs

Figure 2.5 : Schéma de différents types de système *scale-down* : A) Couplage de 2 réacteurs agités, B) Couplage d'un réacteur agité avec une partie non agitée, C) Réacteur agité seul dans lequel les conditions opératoires varient

Figure 2.6 : Temps de relaxation de différentes étapes du métabolisme des microorganismes et de leur environnement dans le réacteur (adapté de [20])

Figure 2.7 : Représentation de la capacité respiratoire de la levure et du by-pass entre fermentation et respiration

Figure 2.8 : Exemple de photos prises au microscope confocal d'un échantillon de *Saccharomyces cerevisiae* (produite en chemostat) exprimant une GFP et marqué à l'iodure de propidium : A) photo prise avec un filtre permettant de voir la fluorescence rouge (marquage PI), B) photo prise avec un filtre permettant de voir la fluorescence verte (expression de la GFP), C) Superposition des images A et B et d'une photo prise en inversion de phase et D) Exemple de cytogramme pouvant être obtenu à partir de ces photos

Figure 2.9 : Cytogrammes obtenus au cours d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae*, exprimant une GFP et marqué au PI (culture *batch* suivie d'un chemostat après 7H) montrant le phénomène de régénération

Figure 3.1: Description of the scale-down reactors tested

Figure 3.2: Structure of the compartment model used to run stochastic simulations. In the case of the SDR type A, the non-mixed part comprises 3 compartments.

Figure 3.3: Evolution of biomass concentration for the three types of scale-down reactor. The reference reactor is represented by the solid line. A) Scale-down reactors type A, with $Q_r=18$ l/h, 30 l/h and 39 l/h; B) Scale-down reactors type B, with $Q_r=18$ l/h, 39 l/h and 52 l/h; C) Scale-down reactors type C, with $Q_r=5$ l/h, 12 l/h and 18 l/h.

Figure 3.4: Evolution of ethanol concentration for the different fermentation tests realized. A) Scale-down reactors type A, with $Q_r=18$ l/h, 30 l/h and 39 l/h; B) Scale-down reactors type B, with $Q_r=18$ l/h, 39 l/h and 52 l/h; C) Scale-down reactors type C, with $Q_r=5$ l/h, 12 l/h and 18 l/h.

Figure 3.5: Evolution of trehalose concentration for the different fermentation tests realized. A) Scale-down reactor type A, with $Q_r=30$ l/h; B) Scale-down reactor type B, with $Q_r=52$ l/h; C) Scale-down reactor type C, with $Q_r=5$ l/h and D) Scale-down reactor type C, with $Q_r=12$ l/h.

Figure 3.6: Comparison of the biomass yield between the scale-down reactors tested.

Figure 3.7: Variation of relative conductivity when a pulse of saline solution is injected into the non-mixed part of the reactor. A) Scale-down reactors type A, with $Q_r=18$ l/h (full line), 30 l/h (dashed line) and 39 l/h (dotted line); B) Scale-down reactors type B, with $Q_r=18$ l/h (full line), 39 l/h (dashed line) and 52 l/h (dotted line); C) Scale-down reactors type C, with $Q_r=5$ l/h (full line), 12 l/h (dashed line) and 18 l/h (dotted line)

Figure 3.8: Relationship between mixing time and biomass yield

Figure 3.9: Frequency distributions for scale-down reactors type A, a) $Q_r = 18$ l/h, b) $Q_r = 30$ l/h and c) $Q_r = 39$ l/h

Figure 3.10: Frequency distributions for scale-down reactors type B, a) $Q_r = 18$ l/h, b) $Q_r = 39$ l/h and c) $Q_r = 52$ l/h

Figure 3.11: Frequency distributions for scale-down reactors type A, a) $Q_r = 5$ l/h, b) $Q_r = 12$ l/h and c) $Q_r = 18$ l/h

Figure 4.1 : Trehalose biosynthesis in the cytosol

Figure 4.2 : Experimental material: scale-down reactor with the three types of non-mixing parts

Figure 4.3 : Biomass yield (%) of the scale-down tests: circle: scale-down reactor type A, square: scale-down reactor type B, triangle: scale-down reactor type C, solid line: reference reactor

Figure 4.4 : Evolution of intracellular trehalose concentration (mg g⁻¹) during the fermentation in scale-down reactor type A (A), type B (B) and type C (C) (Q =recirculation flow rate (l h⁻¹))

Figure 4.5: Evolution of biomass and glucose concentration for two tests in mini-bioreactor, solid line: test with glucose excess, dashed line: test with no glucose excess

Figure 4.6: Evolution of the fluorescence intensity of the TPS2 – GFP gene, solid line: test with glucose excess, dashed line: test with no glucose excess

Figure 5.1: Evolution of A) GFP synthesis under the control of the rpl22a ribosomal promoter and B) PI uptake during a batch culture followed by a chemostat at $D = 0.25$ h⁻¹. The chemostat was started after 8 hours and 6 hours for the minimal (Verduyn) and rich (YPD) medium, respectively. Samples were taken each 15 minutes by an automated system and sent for analysis to an on-line flow cytometer. Only mean values for GFP and PI uptake distribution are displayed in the figure.

Figure 5.2: Relationship between microbial growth and GFP synthesis under the control of a ribosomal promoter. The number of events per μ L is directly displayed on the FC software and is in accordance with optical density measurements (results not shown), as well as the mean green fluorescence (FL1 channel). These parameters were recorded every 15 minutes on the basis of at least 40,000 yeast cells. The cultivation displayed here correspond to a batch culture on Verduyn medium followed by a chemostat phase at $D = 0.25$ h⁻¹ on the same medium

Figure 5.3: Flow cytometry and confocal microscopy analyses of *S. cerevisiae* cultivated A) in minimal medium (Verduyn) and B) in rich medium (YPD). Samples were taken at the beginning of the cultivation (after one hour during the initial batch phase). Flow cytometry results are displayed in dotplots with FL1 channel corresponding to GFP synthesis and FL3 channel corresponding to PI uptake. Only the regions corresponding to the PI-GFP+ subpopulation and PI-GFP- subpopulation are displayed

Figure 5.4: A) Dotplot expressing the GFP fluorescence intensity (FL1 channel) in function of PI-uptake related fluorescence (FL3 channel). FC analysis performed after 2 h of cultivation in batch bioreactor on minimal medium. B) Histogram showing the distribution of PI-uptake related fluorescence among the yeast population. C) Histogram showing the distribution of GFP fluorescence among the yeast population. For each histogram, a boxplot is shown. The box represents the interquartile range, the whiskers represent the range, the bar represents the median and the dot represents the mean.

Figure 5.5: Evolution of the boxplot parameters (box : interquartile range ; bar : mean; dot : median; whiskers : extreme values) for the yeast population cultivated on minimal medium (Verduyn). The transition from the batch phase to the chemostat phase at a dilution rate of 0.25 h⁻¹ occurs after 8 hours of culture. A) evolution of the GFP synthesis distribution as function of time. B) evolution of the PI-uptake related fluorescence distribution as function of time. For each case, samples were automatically taken each 15 minutes and were analyzed by on-line FC. Representative frequency distribution are shown for some time points

Figure 5.6: Evolution of the boxplot parameters (box : interquartile range ; bar : mean; dot : median; whiskers : extreme values) for the yeast population cultivated on rich medium (YPD). The transition from the batch phase to the chemostat phase at a dilution rate of 0.25 h⁻¹ occurs after 8 hours of culture. A) evolution of the GFP synthesis distribution in function of time. B) evolution of the PI-uptake related fluorescence distribution in function of time. For each case, samples were automatically taken each 15 minutes and were analyzed by on-line FC

Figure 5.7: Evolution of the mean-to-median ratio (MMR) for GFP synthesis and PI uptake during the cultivation of yeast carried out either in minimal or in rich medium. In theory, when the mean and the median of a distribution are close (MMR close to one), the population can be considered as homogeneous. However, this rule does not apply for GFP distribution of the yeast population at the beginning of the batch phase on minimal medium

Figure 5.8: Evolution of A) the mean GFP fluorescence intensity under the *rpl22a* ribosomal promoter in the case of fed-batch cultivations carried out either on rich (YPD) or minimal (Verduyn) medium B) the mean PI uptake related fluorescence in the case of fed-batch cultivations carried out either on rich (YPD) or minimal (Verduyn) medium C) the mean GFP fluorescence intensity under the *rpl22a* ribosomal promoter in the case of cultivations carried out in scale-down reactors either on rich (YPD) or minimal (Verduyn) medium D) the mean PI uptake related fluorescence in the case of cultivations carried out in scale-down reactor either on rich (YPD) or minimal (Verduyn) medium. For each case, at least 40,000 microbial cells were considered to compute the mean. Samples were taken each 15 minutes by using on-line FC. The transition from the batch phase to the fed-batch phase is indicated by an arrow.

Figure 5.9: Flow cytograms at the end of the cultivation for the standard fed-batch and the scale-down bioreactor carried-out either on rich or minimal medium. Flow cytograms are displayed in dotplot format showing the FL1 channel (GFP fluorescence) as function of the FL3 channel (PI uptake). Only the regions showing the GFP+PI- and GFP-PI+ subpopulations are displayed. The results point out the fact that cells growing on rich medium displayed reduced fitness to the conditions imposed by the fed-batch mode as shown by a progressive rise of the PI uptake by cells located in the GFP+PI- region

Figure 5.10: Evolution of the boxplot representation (box: interquartile range ; bar : mean; dot : median; whiskers : extreme values) for the GFP distribution among the yeast population during the last 7 hours of the cultivation carried out in fed-batch bioreactor on rich (YPD) medium. During this phase, yeast cells were exposed to stress and exhibited a progressive increase of the population segregation for the GFP content as displayed on the frequency distribution acquired by on-line FC

Figure 5.11: Evolution of the boxplot representation (box: interquartile range ; bar : mean; dot : median; whiskers : extreme values) for the PI uptake distribution among the yeast population during the last 7 hours of the cultivation carried out in fed-batch bioreactor on rich (YPD) medium. During this phase, yeast cells were exposed to stress and exhibited a progressive increase in PI uptake as displayed on the GFP frequency distribution acquired by on-line FC

Figure 5.12 : Mini bioreactor platform

Figure 5.13 : A: Diagram of heterogeneities zones in an industrial reactor, B: Diagram of the feeding strategy used in the experiments (0: pump OFF, 1: pump ON), C: Evolution of dissolved oxygen during a fed-batch of *S. cerevisiae*

Figure 5.14 : Evolution of biomass concentration (circle), glucose concentration (triangle) and dissolved oxygen rate (square) for the four GFP strain (TPS2, PDC6 HXT2 and ADH2) during fermentation with no glucose excess

Figure 5.15 : Evolution of biomass concentration (circle), glucose concentration (triangle) and dissolved oxygen rate (square) for two GFP strain (TPS2 and PDC6) during fermentation with glucose excess

Figure 5.16 : GFP intensities for the three main stages of yeast growth: lag, exponential and stationary stages and Pictures of the three samples presented at figure 4, showing the GFP induction

Figure 5.17 : Evolution of the GFP contents of the cells for the four GFP strains (TPS2, PDC6, HXT2 and ADH2) in case of no glucose excess (left side) and in case of glucose excess (right side)

Figure 6.1 : Schéma général des paramètres physiques et physiologiques à prendre en compte pour la réalisation de l'extrapolation d'une culture de microorganismes en bioréacteur de volume industriel et des techniques permettant le suivi de ces paramètres avec, en vert, les éléments abordés dans ce travail

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Présentation de différentes méthodes de mesure du temps de mélange, avec les traceurs et sondes associés (Adapté de [23])

Tableau 2.2 : Tableau reprenant différents paramètres utiles à suivre en cours de culture et le type de mesure possible : en ligne ou hors ligne

Tableau 3.1 : Synthesis of the different parameters characterizing the hydrodynamic conditions of scale-down reactors

Tableau 5.1 : Presentation of the GFP strains used in this work and their corresponding target genes

**CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE
ET PRESENTATION DE LA STRATEGIE
SCIENTIFIQUE**

1.1. CONTEXTE DU TRAVAIL

Lors de l'extrapolation d'une production de microorganismes à l'échelle industrielle, l'augmentation de volume peut entraîner l'apparition de phénomènes qui vont perturber le bon développement de la culture, comme par exemple une mauvaise homogénéisation de fluide ou une dispersion peu efficace de l'oxygène dissous dans le milieu. Une perte d'efficacité du mélange est alors observée et des zones hétérogènes en substrat, en oxygène dissous, de pH ou de température apparaissent au sein de la cuve. Ce phénomène reste le plus souvent incontrôlé et entraîne des pertes économiques pour l'industriel. Ce projet a donc pour but d'apporter une nouvelle méthodologie de travail à ces industriels désireux d'extrapoler une production de microorganismes. La difficulté réside dans la connaissance de l'interaction entre le microorganisme et son milieu de culture.

Le travail est divisé en trois parties :

- étude et modélisation des conditions hydrodynamiques développées au sein du réacteur
- étude de la réponse des cellules à ces conditions hydrodynamiques en étudiant des paramètres non ségrégés
- étude de la réponse des cellules à ces conditions hydrodynamiques en étudiant des paramètres ségrégés

L'objectif final est de comprendre et prédire le comportement des microorganismes en fonction des conditions extracellulaires présentes dans le milieu de production et ce, grâce à la comparaison de productions réalisées dans des réacteurs de différentes tailles (mini-bioréacteurs, réacteurs pilotes et réacteurs *scale-down*).

Le cas d'étude choisi est la production de *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*. Cette levure, Crabtree positive, voit son métabolisme influencé par les variations de concentrations en glucose au sein du réacteur. Sa production est donc réalisée en mode *fed-batch* de manière à apporter uniquement la quantité de glucose nécessaire à sa croissance. Ce mode de production, combiné à la perte d'efficacité du mélange du système, provoque l'apparition d'un gradient de concentration en glucose dans la cuve. Si le stress encouru par les cellules est importants, le métabolisme des cellules est perturbé et une perte de rendement et de qualité du produit est observée. Par contre, si le stress est modulé, des mécanismes de résistance au stress sont mis en place. Il s'agit du phénomène nommé *trade off* qui décrit le compromis métabolique impliquant une résistance au stress.

La complexité du travail est de pouvoir caractériser l'état physiologique de la levure en fonction des conditions de culture qu'elle rencontre et d'estimer l'impact des conditions industrielles sur la croissance des cellules, leur résistance aux stress et sur le mécanisme de *trade off*.

1.2. STRATÉGIE SCIENTIFIQUE

La stratégie scientifique développée dans ce travail peut être scindée en trois parties.

Tout d'abord, l'impact des conditions hydrodynamiques des réacteurs industriels a été étudié grâce à des réacteurs de laboratoire de géométrie particulière, nommés réacteurs *scale-down*. Ces réacteurs possèdent les mêmes caractéristiques d'écoulement que les réacteurs de grands volumes. Les réacteurs *scale-down* utilisés dans ce travail sont composés de deux parties : une partie agitée (un réacteur de 20 litres) et une partie non agitée (ampoule en verre ou tuyau en silicone de différentes géométries). Le milieu de culture est mis en circulation entre les deux parties grâce à une pompe péristaltique. Ce système permet de mimer les gradients de concentration apparaissant dans les réacteurs industriels, de grand volume, comme représenté à la figure 1.1.

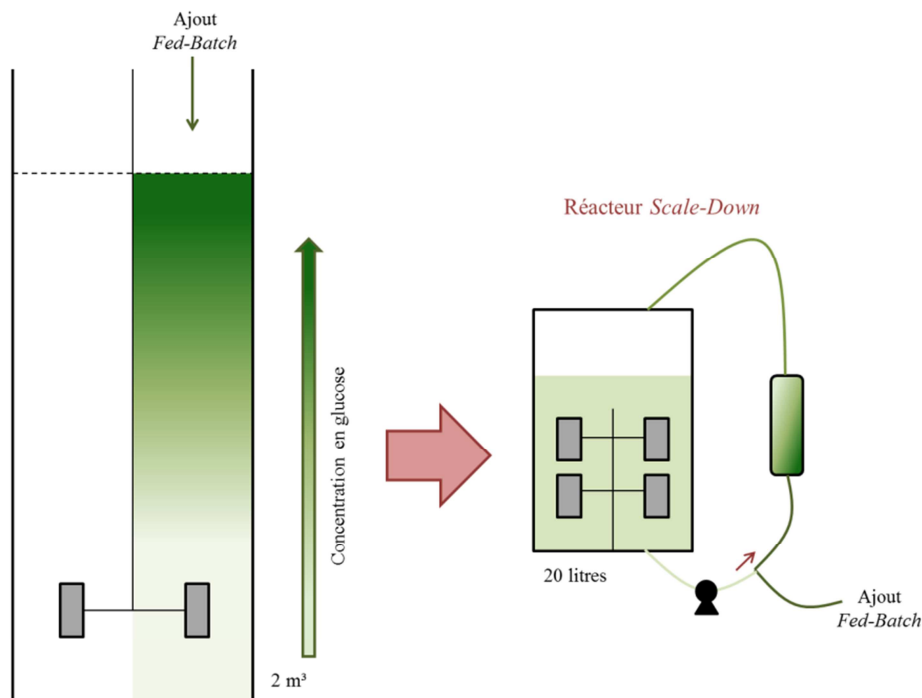


Figure 1.1 : Schématisation d'un gradient de concentration (en glucose par exemple) présent dans un réacteur industriel et représentation de ce même gradient dans un réacteur *scale-down*

L'axe suivant concerne l'étude de traceurs physiologiques permettant d'estimer l'impact des conditions de mélange au sein des réacteurs. Les traceurs les plus faciles à étudier sont les facteurs dits non ségrégués. Dans ce cas, la population microbienne est considérée comme homogène (figure 1.2 A). Ces traceurs peuvent être des paramètres physiques, liés à la production (concentration en oxygène dissous, pH,...) ou des paramètres liés au métabolisme de la levure (production de tréhalose, d'éthanol,...).

Le troisième axe complète le deuxième puisqu'il concerne l'étude de paramètres ségrégués permettant d'estimer le stress encouru par les cellules lors de la production. Les hétérogénéités présentes au sein de la population sont alors prises en compte (figure 1.2 B). Les techniques développées dans cet axe sont : le marquage cellulaire permettant l'estimation de la viabilité des cellules et l'étude de l'expression de protéines fluorescentes par des souches de *Saccharomyces cerevisiae* modifiées.

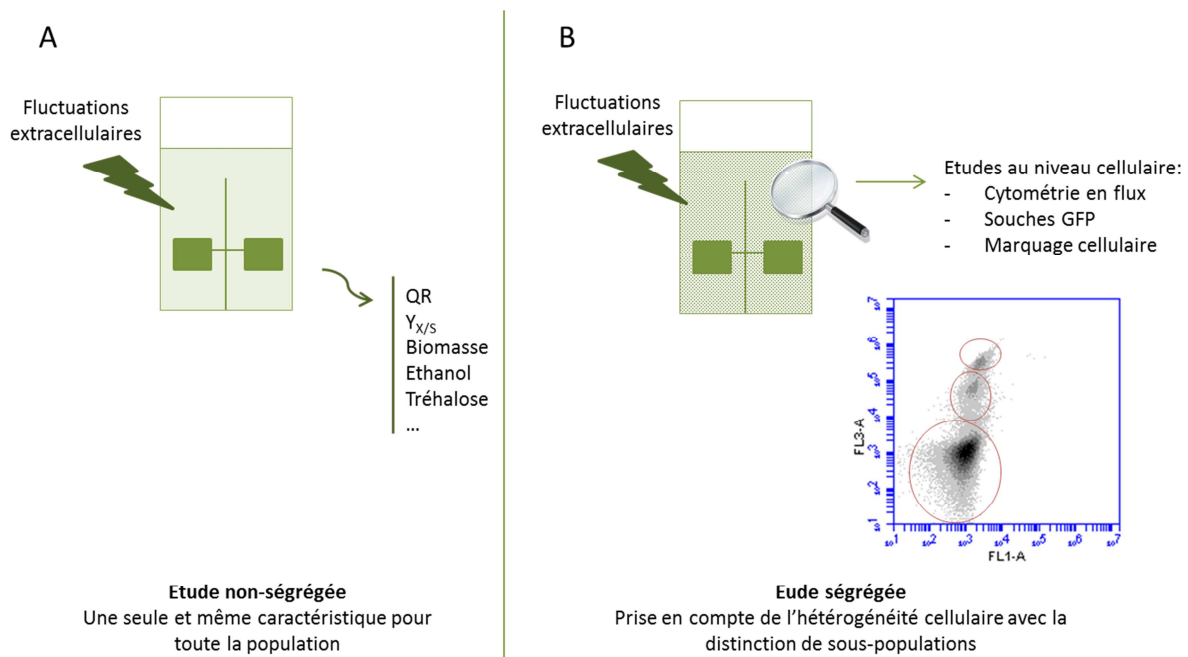


Figure 1.2 : Représentation des axes 2 et 3 de la stratégie scientifique de ce travail. A : paramètres non ségrégués, B : paramètres ségrégués

Les travaux effectués et les principaux résultats obtenus pour ces trois axes de recherche sont présentés dans les paragraphes suivants.

1.3. APERÇU DE LA STRUCTURE DE LA THÈSE

1.3.1. DESCRIPTION DU PREMIER AXE DE RECHERCHE

1.3.1.1. INTITULÉ

Mise en œuvre d'un réacteur facilitant l'extrapolation des bioprocédés : approche *scale-down*

1.3.1.2. BREF DESCRIPTIF DES TRAVAUX EFFECTUÉS

La levure est un microorganisme largement utilisé à cause de ses capacités à produire de la biomasse ou des métabolites d'intérêt. Cependant, sa sensibilité à l'effet glucose rend l'extrapolation de la production problématique. Dans les réacteurs de grand volume, les conditions hydrodynamiques ne sont pas idéales et des gradients de concentration en glucose peuvent apparaître surtout si le mode *fed-batch* est utilisé. Dans ce chapitre, qui a fait l'objet d'une publication dans le « Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology », les effets de tels gradients ont été étudiés dans des réacteurs dits « *scale-down* ». Ces réacteurs sont composés d'une partie agitée et d'une partie non agitée. Le milieu de culture est mis en recirculation entre ces deux parties grâce à une pompe péristaltique. Ce système, dont la géométrie est modulable, permet de mimer les conditions hydrodynamiques rencontrées dans les réacteurs de grand volume. Dans cet article, trois géométries différentes de la partie non agitée ont été testées. Pour chacune des géométries, trois vitesses de recirculation du milieu ont été testées. Il s'agit donc de 9 réacteurs différents qui ont été utilisés pour étudier l'impact des conditions hydrodynamiques sur les paramètres de croissance de la levure.

Durant les tests réalisés avec la levure *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*, différentes constatations ont été observées : le rendement en biomasse (rapport entre la quantité de biomasse produite et la quantité de glucose ajouté) et la production de tréhalose diminuent tandis que le temps de fermentation (temps entre l'inoculation et le début de la phase stationnaire) et la production d'éthanol augmentent. L'évolution de ces paramètres est influencée par le type de réacteurs *scale-down* et par la vitesse de recirculation entre les deux parties du réacteur. L'augmentation de la production d'éthanol montre que les cellules ont été soumises à de fortes concentrations en glucose.

Les conditions hydrodynamiques développées dans les réacteurs *scale-down* ont été caractérisées par la mesure du temps de mélange. Il en résulte que le mélange peut être gouverné par deux phénomènes : la dispersion ou l'écoulement piston. Une relation entre

l'augmentation du temps de mélange et la diminution du rendement en biomasse a pu être établie.

Un modèle stochastique a été développé et a permis d'expliquer que ces effets sont dus principalement aux conditions hydrodynamiques développées par les conditions opératoires des différents tests. Le modèle présenté permet la représentation à la fois de la circulation des microorganismes et du mélange de fluide dans un réacteur agité. Ces deux phénomènes sont superposés pour fournir les profils de concentration en substrat (glucose) rencontrés par les cellules pendant leur production en bioréacteur. Les résultats des simulations ont permis de montrer que la perte de rendement est liée à l'augmentation du nombre de cellules soumises aux fortes concentrations en glucose créées par le système *scale-down* si le mélange est gouverné par la dispersion. Dans le cas de l'écoulement piston, la diminution du rendement peut être expliquée par l'amplitude des fluctuations de concentration en glucose ressenties par les cellules lorsqu'elles entrent dans la partie non agitée.

Même si le modèle développé est un outil prometteur pour le *scale-up* des productions industrielles, il ne permet pas de clarifier tous les phénomènes. Les mauvaises conditions hydrodynamiques ne peuvent pas expliquer à elles-seules l'effet *scale-down*. C'est pourquoi, il est intéressant d'obtenir des informations sur la façon dont les cellules ressentent les fluctuations de concentration en glucose.

1.3.2. DESCRIPTION DU DEUXIÈME AXE DE RECHERCHE

1.3.2.1. INTITULÉ

Etude de traceurs physiologiques des conditions de stress en bioréacteurs : paramètres non ségrégués

1.3.2.2. BREF DESCRIPTIF DES TRAVAUX EFFECTUÉS

Le tréhalose est un sucre de réserve produit par *Saccharomyces cerevisiae* lorsqu'elle se trouve en conditions de stress. Il est utilisé comme cryoprotecteur pendant la lyophilisation. Le contenu cellulaire en tréhalose est donc un paramètre intéressant à maîtriser dans le cadre d'une production industrielle de levure pour assurer une bonne conservation des cellules.

Dans ce contexte, les réacteurs *scale-down*, permettant de mimer les conditions hydrodynamiques rencontrées par les cellules pendant une production industrielle, ont été utilisés. La production de la levure a été réalisée dans les trois types de réacteurs présentés dans l'axe 1. Les résultats obtenus montrent que les cellules produites en réacteurs *scale-down*

produisent moins de tréhalose que celles produites en réacteur de référence (c'est-à-dire sans partie non agitée).

Ces résultats sont complétés par l'étude d'une souche exprimant une protéine recombinante fluorescente (GFP) dont l'expression est sous l'influence du promoteur du gène TPS2. Ce gène code pour une sous-unité du complexe enzymatique responsable de la synthèse du tréhalose. Cette souche a été produite en mini-bioréacteurs (fioles agitées équipées d'une sonde mesurant l'oxygène dissous). Les cellules produites en présence d'un excès de glucose dans le milieu expriment moins le gène TPS2. Les fluctuations de concentration en glucose affectent les réactions enzymatiques des cellules et perturbent leur croissance normale.

Cette approche permet l'utilisation du tréhalose, ou des enzymes associées, comme un marqueur cellulaire du stress ressenti par les cellules de levure pendant une production industrielle. Cette approche pourrait être étendue à d'autres métabolites, enzymes,...

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue « Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement ».

1.3.3. DESCRIPTION DU TROISIÈME AXE DE RECHERCHE

1.3.3.1. INTITULÉ

Etude de traceurs physiologiques des conditions de stress en bioréacteurs : paramètres ségrégés

1.3.3.2. BREF DESCRIPTIF DES TRAVAUX EFFECTUÉS

Cet axe est divisé en deux parties :

La première partie décrit la production d'une levure modifiée, exprimant une protéine recombinante fluorescente sous le contrôle d'un promoteur ribosomal. La viabilité cellulaire est estimée par un marquage à l'iodure de propidium. Différents tests sont réalisés en chemostat ou en *fed-batch*, en réacteur bien agité ou en réacteur *scale-down* et avec un milieu riche ou un milieu minimum. L'utilisation d'un cytomètre en ligne permet de suivre pendant la culture l'évolution des sous-populations de cellules qui se développent au sein du réacteur. La ségrégation des cellules peut être interprétée en utilisant différents traitements ou représentations mathématiques : cytogramme, ratio moyenne/médiane, boxplot. Celles-ci sont exposées et leur utilisation est discutée.

Dans le second sous-chapitre, l'utilisation de souches de levure exprimant une protéine recombinante fluorescente (GFP) est développée. Cette partie a fait l'objet d'une publication dans la revue « *Cerevisia* » et d'une publication d'un abstract dans « *New Biotechnology* ».

Le contexte est toujours celui de la perte d'efficacité du mélange au sein des réacteurs industriels. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est touchée par ce phénomène à cause de sa capacité à passer d'un métabolisme respiratoire à un métabolisme fermentaire en fonction de la concentration en glucose présente dans le milieu. L'apparition de zones d'hétérogénéité en substrat ou en oxygène dissous est donc courante. Ces fluctuations extracellulaires ont différents impacts au niveau de la physiologie des microorganismes qui vont du shift métabolique à l'expression de gènes spécifiques du stress encouru. Ces réponses cellulaires aux fluctuations de leur environnement ne sont pas encore totalement comprises. Dans ce sous-chapitre, les principales fluctuations extracellulaires sont reproduites au niveau d'une plate-forme de mini-bioréacteurs. Ceux-ci sont des fioles agitées, bafflées et équipées de sonde mesurant l'oxygène dissous. Les cultures sont réalisées avec différentes stratégies de contrôle du *fed-batch*. Une approche *scale-down* a été développée en considérant les techniques de relargage lent du substrat ou de l'alimentation intermittente dans le but de reproduire les fluctuations en glucose et en oxygène dissous présentes dans les réacteurs industriels.

Les mini-bioréacteurs ont été utilisés pour étudier la réponse de différentes souches exprimant une GFP sous le contrôle de divers promoteurs (ADH2, TPS2, PDC6, HXT2). Le contenu en GFP des cellules a été déterminé par cytométrie en flux de façon à prendre en compte l'hétérogénéité de la population.

La méthodologie présentée ici peut être proposée comme un outil *scale-down*. D'un côté les mini-bioréacteurs permettent d'obtenir un grand nombre de données en peu de temps et avec un investissement réduit. Cette technique simple, combinée aux souches exprimant une GFP, permet d'étudier plusieurs souches en parallèle et donc de tester plusieurs types de réponse cellulaire simultanément. Les effets du *scale-up* peuvent donc être compris à l'échelle de chaque cellule.

CHAPITRE 2 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT L’EVALUATION DU STRESS MICROBIEN DANS LES BIO-REACTEURS INDUSTRIELS

Extrait de :

Lejeune A., Thonart P., Delvigne F., 2013, *Stress microbien lors du processus d’extrapolation : Approche physique et biologique*, *Cerevisia*, **38** (3), 89-101

2.1. RÉSUMÉ

Les microorganismes sont utilisés dans de nombreux domaines (agro-alimentaire, pharmaceutique, environnemental, énergétique...) que ce soit pour la production de biomasse ou de métabolites particuliers. Le passage de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle est souvent problématique car les microorganismes sont sensibles aux conditions environnementales développées au sein du volume réactionnel. De plus, la perte de l'efficacité d'homogénéisation des bioréacteurs industriels entraîne des perturbations au niveau du métabolisme des cellules. C'est pourquoi il est important d'étudier les conditions hydrodynamiques développées au sein du réacteur. Cet article présente des méthodes de calcul et de modélisation de ces conditions. L'impact de l'hydrodynamique sur le métabolisme microbien peut être étudié par l'utilisation de réacteurs scale-down. Les techniques nouvelles permettant de réaliser un scale-up prennent en compte des caractères physiologiques des cellules, qui estiment l'impact des conditions environnementales sur le métabolisme microbien et donc la bonne réussite du procédé. Enfin, l'étude de *Saccharomyces cerevisiae*, microorganisme de grand intérêt biotechnologique, est réalisée.

2.2. INTRODUCTION

L'extrapolation de la production d'un microorganisme, ou *scale-up*, est complexe à mettre en œuvre car l'augmentation du volume de production conduit à l'apparition de phénomènes limitants, tant globalement que localement. Le mode de production *fed-batch* est souvent utilisé car il permet d'obtenir de hautes concentrations cellulaires et donc une bonne productivité tout en limitant le métabolisme surverse¹ et les limitations en oxygène [1]. Malheureusement ce mode de production, couplé aux mauvaises performances de mélange des réacteurs industriels, conduisent à des gradients de concentration (nutriments, oxygène, pH...) qui perturbent le développement optimal du microorganisme. Les effets de l'augmentation du volume de production sont essentiellement une diminution du rendement en biomasse² et une production de métabolites secondaires, parfois indésirables. C'est le cas, par exemple, pour *Saccharomyces cerevisiae* [2]. Cette levure, dite GRAS (*Generally recognized As Safe*) est un microorganisme particulièrement intéressant industriellement. Elle intervient dans de nombreux procédés de fermentation de l'industrie agro-alimentaire mais aussi en recherche fondamentale, dans le domaine de la santé, en biotechnologies ou pour la production de bioéthanol. L'apparition d'hétérogénéités dans le bioréacteur en cours de production est problématique car sa croissance est perturbée par les variations de concentration en glucose : elle produit de l'éthanol quand la concentration en glucose dans son environnement dépasse 150 mg/l [3]. Ce métabolite secondaire est un inhibiteur de

¹ Métabolisme surverse : voie métabolique secondaire qui s'enclenche lorsqu'un substrat se trouve en excès dans le milieu

² Rendement en biomasse : rendement obtenu en divisant la quantité de biomasse récoltée en fin de fermentation par la quantité de substrat engagée dans la réaction

croissance des cellules de levure et contient une partie de l'énergie fournie par le substrat qui n'a pu être utilisé pour la production de biomasse. Il en résulte une diminution du rendement en biomasse [4] ce qui n'est pas avantageux dans le contexte d'une production industrielle de biomasse de levure.

La figure 2.1 présente un schéma général des différents paramètres intervenant dans le *scale-up* d'une production d'un microorganisme. Pour réaliser une approche globale et ainsi coller au mieux à la réalité, il faut prendre en compte trois types de facteurs : les facteurs biologiques liés à la souche d'intérêt, les facteurs chimiques liés à la composition du milieu et à la solubilité des gaz et les facteurs physiques liés aux caractéristiques du bioréacteur et aux conditions opératoires [5].

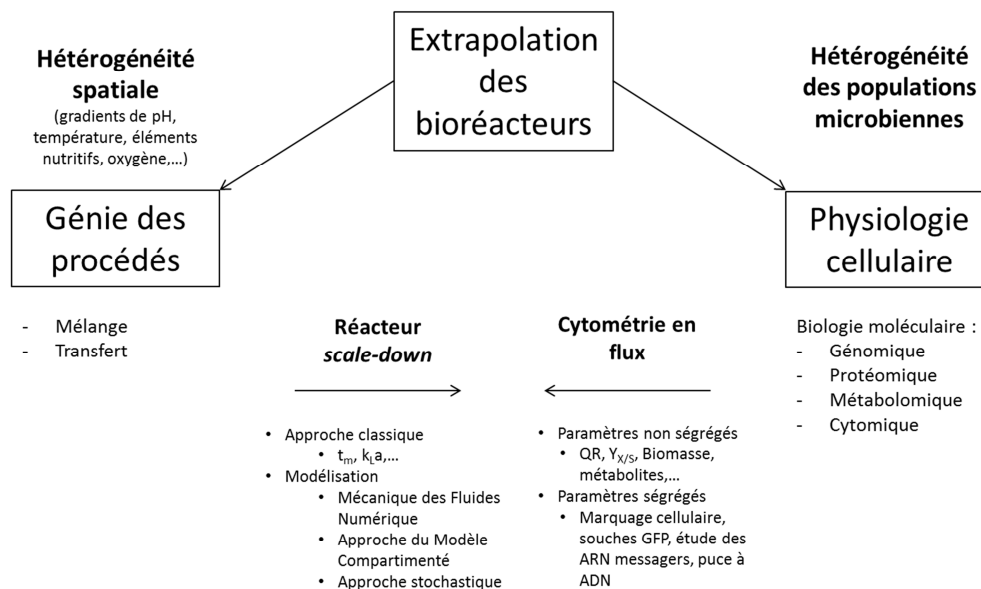


Figure 2.1 : Schéma général des paramètres physiques et physiologiques à prendre en compte pour la réalisation de l'extrapolation d'une culture de microorganismes en bioréacteur de volume industriel et des techniques permettant le suivi de ces paramètres

L'augmentation du volume du bioréacteur induit des hétérogénéités spatiales. Divers gradients peuvent apparaître au sein du volume réactionnel : pH, température, éléments nutritifs, oxygène,... Ces gradients peuvent avoir un impact sur la physiologie cellulaire ce qui provoque des hétérogénéités au niveau de la population microbienne. Ces hétérogénéités

peuvent être analysées grâce à des techniques de biologie moléculaire (protéomique³, génomique⁴, métabolomique⁵ ou cytomique⁶).

Cette revue bibliographique décrit les techniques permettant le calcul global de l'extrapolation d'une production de microorganismes. Les méthodes de calcul des conditions hydrodynamiques des bioréacteurs comprennent le phénomène de mélange des fluides et celui du transfert d'oxygène. La technique classique utilisée pour résoudre un problème d'extrapolation est basée sur le calcul des paramètres de l'opération de mélange et principalement du temps de mélange⁷ qui en estime l'efficacité. Malheureusement les techniques usuelles de mesure de ce paramètre se basent sur le principe de la boîte noire et considèrent le réacteur comme une seule entité homogène ce qui est loin de représenter la réalité, entraînant ainsi de mauvaises estimations. D'autres techniques ont donc été développées pour approcher au mieux les conditions réellement présentes dans les réacteurs de grand volume. C'est le cas des modèles compartimentés, suivant l'approche déterministe⁸, ou de la mécanique des fluides numérique⁹ (MFN). Ces modèles permettent de décrire les différents flux présents dans le réacteur et ainsi calculer les gradients de concentration apparaissant dans le réacteur suite à un mélange déficient. Pour aller plus loin, l'approche stochastique¹⁰ décrit les flux sous forme de probabilités et permet, en plus de décrire les conditions hydrodynamiques du réacteur, de représenter le déplacement des microorganismes dans ce réacteur. La superposition de ces deux phénomènes permet de déterminer les concentrations auxquelles sont soumis les microorganismes pendant leur déplacement dans le réacteur.

Les conditions hydrodynamiques rencontrées dans les réacteurs de grand volume peuvent être étudiées à petite échelle grâce à la mise en œuvre de réacteurs *scale-down* (RSD). Les RSD

³ Protéomique : science qui s'attache à caractériser le protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme soumis à des conditions expérimentales ou physiologiques précises

⁴ Génomique : science qui se rapporte au génome, c'est-à-dire à l'ensemble du matériel génétique porté par les êtres vivants

⁵ Métabolomique : science qui étudie l'ensemble des métabolites (sucres, acides aminés, acides gras, etc.) présents dans une cellule, un organe, un organisme

⁶ Cytomique : analyse exhaustive visant à définir l'état d'une cellule à un moment donné et dans un contexte donné, en intégrant plusieurs paramètres

⁷ Temps de mélange : durée nécessaire à un système pour atteindre un certain degré d'homogénéité, après introduction d'une perturbation

⁸ Approche déterministe : approche de modélisation compartimentée permettant de décrire les flux au sein du milieu réactionnel, entre les différents compartiments considérés, par la résolution d'équations différentielles

⁹ Mécanique des fluides numérique : étude des mouvements d'un fluide, ou de leurs effets, par la résolution numérique des équations régissant le fluide

¹⁰ Approche stochastique : approche de modélisation dans laquelle les flux existants entre les différents compartiments définis du modèle sont exprimés grâce à des probabilités

sont des réacteurs de laboratoire permettant de mimer les conditions hydrodynamiques ressenties par les microorganismes dans un réacteur industriel. Ces réacteurs permettent de calculer les paramètres du génie chimique de manière plus aisée mais permettent aussi de faire le lien avec la physiologie cellulaire en rendant possible l'étude à petite échelle de l'impact des mauvaises conditions hydrodynamiques sur la croissance et le métabolisme des cellules. Dans ce cas, les études peuvent être menées de manière ségréguée ou non. Les paramètres non ségrégués¹¹ sont les paramètres classiques de la croissance cellulaire : quotient respiratoire, rendement de bioconversion du substrat en biomasse, production de métabolites d'intérêt,... L'étude ségréguée¹² de la physiologie cellulaire est possible grâce à des techniques de biologie moléculaire dont la cytométrie en flux [6]. Elle peut être combinée aux marquages cellulaires (iodure de propidium, CFDA, FUN-1, bisoxonol,...) qui sont autant de paramètres cellulaires qui peuvent être impactés par les conditions hydrodynamiques. Il est donc maintenant possible de suivre l'évolution de certaines propriétés cellulaires au cours d'une culture. Cette masse d'informations a permis le développement de modèles ségrégués dits modèles d'équilibre des populations¹³ (*population balance model*) [7]. Ces modèles sont composés d'équations décrivant l'équilibre de la population prenant en compte les limites, les conditions initiales et d'autres événements, comme la probabilité de division cellulaire ou les stades de transition par exemple. A côté des marquages cellulaires, l'utilisation de souches exprimant une protéine recombinante fluorescente couplée au gène d'intérêt est également un outil précieux en permettant l'étude en ligne de l'induction de ce gène.

2.3. CARACTÉRISATION DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES DES RÉACTEURS INDUSTRIELS : ENVIRONNEMENT PERÇU À L'ÉCHELLE DU MICROORGANISME

2.3.1. CONFIGURATION DES BIORÉACTEURS INDUSTRIELS UTILISÉS POUR LA CULTURE DE LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Il existe plusieurs types de réacteurs utilisés à l'échelle industrielle dans le domaine des bioprocédés. Le choix du réacteur est conditionné par l'application visée (type de

¹¹ Paramètres non ségrégués : paramètres décrivant la population cellulaire par une seule valeur moyenne pour toute la population

¹² Etude ségréguée : étude dans laquelle le paramètre d'intérêt est mesuré cellule par cellule

¹³ Modèle d'équilibre des populations : modèle décrivant la modification, dans le temps, de la distribution du nombre de cellules, caractérisées par une variable descriptive, comme l'âge cellulaire ou un métabolite intracellulaire

microorganismes, production de métabolites ou de biomasse,...) mais aussi par des contraintes techniques et économiques. Il est impossible de décrire ici tous les types de réacteurs utilisés en industrie, tant leur variété est grande. Trois d'entre eux seront décrits : la colonne à bulles, le réacteur air-lift et le réacteur agité. Ils sont représentés à la figure 2.2.

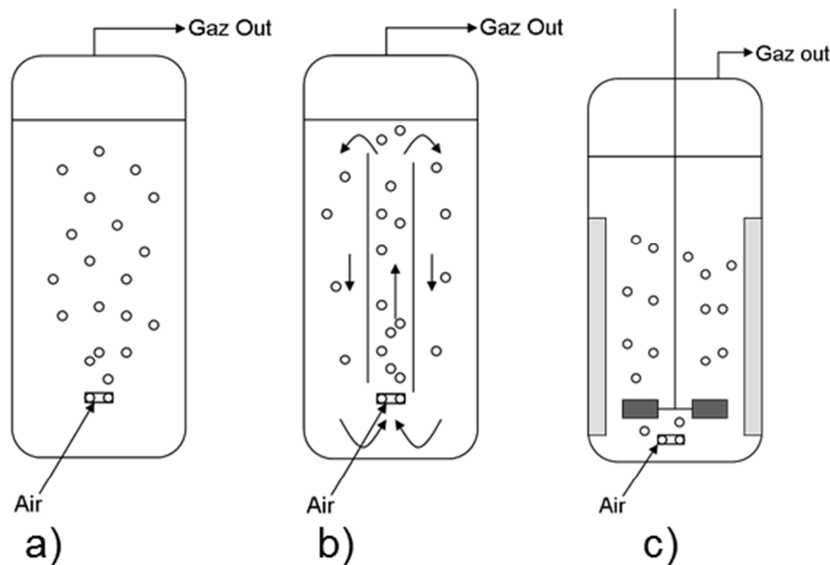


Figure 2.2 : Représentation de trois grands types de réacteurs utilisés à l'échelle industrielle : a) colonne à bulles, b) réacteur air-lift avec tube de conduite interne, c) réacteur mécaniquement agité pouvant comprendre plusieurs étages d'agitation (ici, un seul étage a été représenté)

Une colonne à bulle (Figure 2.2 A) est un réacteur cylindrique équipé d'un injecteur de gaz situé dans le bas de la colonne. Le gaz est injecté sous forme de bulles dans une phase liquide ou dans une suspension liquide-solide. Ce type de réacteur possède plusieurs avantages. Premièrement, il possède d'excellentes performances de transfert de masse et de chaleur. L'absence de parties mobiles et l'aspect compact des colonnes à bulles entraînent des coûts opérationnels faibles. Elles nécessitent donc pour les mêmes raisons peu d'entretien. Les colonnes à bulles sont utilisées, à l'échelle industrielle pour la production de métabolites microbiens valorisables tels les enzymes, les protéines, les antibiotiques,... [8].

Un réacteur air-lift (Figure 2.2 B) est similaire à la colonne à bulle. Il s'agit d'un bioréacteur dans lequel le milieu réactionnel est mélangé et aéré par l'introduction d'air ou d'un autre gaz à la base d'un réacteur colonne, équipé d'un tube étroit, qui peut être à l'intérieur ou à l'extérieur du réacteur. Le volume du réacteur est donc séparé en une région aérée et une région non aérée ce qui génère un flux de circulation vertical [9]. Dans leur étude, Ogonna *et al.* [10] utilisent *Saccharomyces cerevisiae* de façon à étudier la faisabilité du *scale-up* de la production de bioéthanol à partir de jus de betteraves. Le réacteur utilisé est une colonne à

bulles possédant une partie externe, permettant la recirculation du milieu et l'immobilisation uniforme des cellules au sein de la colonne. Ce système permet d'obtenir de hautes concentrations en éthanol (jusqu'à 80 g.l⁻¹). Roca *et al.* [11] ont utilisé un réacteur air-lift pour la production d'éthanol à partir de levures floculantes. La concentration en biomasse a atteint 85 à 110 g.l⁻¹ (en matière sèche). L'homogénéisation au sein du réacteur est bonne, excepté à concentrations en biomasse et substrat importantes.

Enfin, les bioréacteurs les plus communément utilisés, tant au niveau du laboratoire qu'au niveau industriel, sont les bioréacteurs agités (Figure 2.2 C). Il s'agit de cuves cylindriques de dimensions standards, équipées d'un axe d'agitation muni de mobiles, seules parties mobiles du réacteur. Le nombre et la géométrie des mobiles, ainsi que la vitesse d'agitation, sont choisis pour réaliser l'opération de mélange de façon optimale. Les conditions hydrodynamiques présentes au sein de ces réacteurs sont décrites dans les paragraphes suivants.

2.3.2. ETUDES DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES DES RÉACTEURS MÉCANIQUEMENT AGITÉS

Les conditions hydrodynamiques d'un réacteur décrivent l'ensemble des phénomènes de transfert (de masse, d'oxygène,...) intervenant lors d'une production en bioréacteur. Le transfert de masse, ou mélange, est fondamental en biotechnologie car il définit l'environnement dans lequel les microorganismes évoluent pendant la production en bioréacteur [12].

2.3.2.1. SCALE-UP ET HÉTÉROGÉNÉITÉS DE MÉLANGE

Le *scale-up* modifie plusieurs caractéristiques du procédé : augmentation du volume, du système d'agitation, des temps de mélange et de circulation, du nombre de chemins préférentiels qui peuvent être suivis par les microorganismes au sein du réacteur,...

Le temps de mélange est le paramètre qui permet d'estimer l'efficacité du mélange au sein d'un réacteur, pour des conditions particulières de production. L'augmentation de cette caractéristique indique que le mélange ne se réalise pas de façon optimale et que des zones d'hétérogénéités peuvent apparaître. Ces hétérogénéités peuvent concerner des éléments nutritifs, l'oxygène dissous, le pH,... Les microorganismes se déplaçant dans le réacteur sont donc soumis à des conditions environnementales variables.

Dans le cas d'une production de biomasse de *Saccharomyces cerevisiae*, la production en mode *fed-batch* est utilisée car elle permet d'atteindre des hautes densités cellulaires. Une solution concentrée en glucose est ajoutée en cours de culture de manière à éviter le métabolisme fermentaire de la levure et donc la production d'éthanol. Si le mélange ne s'effectue pas correctement, comme c'est le cas dans les réacteurs de grand volume, un gradient de concentration en glucose se crée depuis le point d'ajout. Ce point d'ajout est défini comme la zone du réacteur où la concentration en glucose est supérieure à une valeur critique [13], spécifique du nutriment et de son effet sur la croissance du microorganisme.

2.3.2.2. LE TEMPS DE MÉLANGE, ESTIMATION DE L'EFFICACITÉ DU MÉLANGE

Le temps de mélange, t_m , est le paramètre à contrôler quand l'opération critique du mélange est l'homogénéisation de deux solutions, par exemple l'homogénéisation d'une solution concentrée dans le milieu de culture. Le temps de mélange est défini comme le temps nécessaire au système pour atteindre un degré spécifique d'homogénéité dans le liquide [14]. Par exemple, Mayr *et al.* [15] considèrent que le temps de mélange est le temps nécessaire au système pour atteindre 85% d'homogénéité. Pour Melton *et al.* [16], il s'agit d'atteindre 95% d'homogénéité. Il n'existe pas de méthodes acceptées universellement car chacune d'entre elles comporte des limitations et dépendent de différents facteurs : viscosité du milieu, géométrie du système, vitesse d'agitation, aération, concentration cellulaire,...

Ju *et al.* [17] ont comparé les temps de mélange obtenus en réacteurs agités (agitateurs Rushton) et aérés avec ceux obtenus sans phase gazeuse. Ils ont observé que le temps de mélange en présence de gaz est toujours plus long que ceux obtenus dans une simple phase liquide. La dispersion gazeuse peut donc être inefficace pour l'homogénéisation [18]. Sweere *et al.* [19] ont montré que les concentrations en biomasse et en métabolites sont fonction du temps de mélange. Si le temps de circulation est inférieur à 30 secondes, les levures sont fortement influencées par les conditions hydrodynamiques du réacteur. Si ce temps est supérieur à 30 secondes, les cellules produisent de l'éthanol. Pendant le *scale-up*, conduisant généralement à une augmentation du temps de mélange, l'impact dynamique sur la culture devient donc plus important et les temps caractéristiques du procédé affectés par le mélange doivent être recalculés [20].

Les méthodes utilisées pour mesurer le temps de mélange, reprises au tableau 2.1, peuvent être divisées en méthodes physiques et méthodes chimiques [21] ou en méthodes globales et locales suivant le volume de liquide impliqué dans la mesure [22].

Dans le cas des méthodes physiques, un traceur est ajouté au système et la modification de la grandeur physique est enregistrée grâce à une ou plusieurs sondes placées dans le volume du réacteur. Il s'agit de la méthode thermique (ajout d'eau chaude ou d'eau froide), de la méthode conductimétrique (ajout d'une solution saline), de la méthode fluorimétrique (ajout d'un fluorochrome) ou de la méthode basée sur la mesure du pH après ajout d'une solution d'acide ou de base. Ce sont des méthodes dites locales car elles donnent une seule valeur de temps de mélange à un endroit précis du volume.

Tableau 2.1 : Présentation de différentes méthodes de mesure du temps de mélange, avec les traceurs et sondes associés (Adapté de [23])

Méthode	Locales			Globales
	Conductimétrique	pH	Thermique	Chimique et Optique
<i>Traceur</i>	Solution ionique concentrée	Solution d'acide ou de base	Eau chaude ou eau froide	Solution concentrée en colorant, indicateur pH
<i>Sonde</i>	Electrode et sonde à conductivité	Electrode pH	Thermocouple	
<i>Avantages</i>	Bonne sensibilité et précision Utilisation possible pour de grand volume			Bonne précision si utilisation de l'analyse d'image Détermination des zones non mélangées
<i>Inconvénients</i>	Interférences et fluctuation du signal dues aux bulles			Nécessité d'un réacteur transparent
	Ne permet pas de quantifier les zones non mélangées Ne donne pas le point final du mélange			
<i>Références bibliographiques</i>	[24]	[25], [26]	[27]	[28], [29], [30]

La méthode conductimétrique a permis à Lejeune *et al.* [31] de démontrer que la modification du taux de recirculation entre la partie agitée et la partie non-agitée d'un réacteur *scale-down* permet de créer des conditions hydrodynamiques différentes au sein de ce réacteur. La même conclusion a été obtenue pour la modification de la géométrie de la partie non-agitée. Un exemple de courbes de traceur est présenté à la figure 2.3. Celles-ci ont été réalisées dans un réacteur *scale-down* composé d'un réacteur agité de 20 litres et d'une partie non agitée de 1 litre, à deux vitesses de recirculation différentes. Le traceur utilisé est une solution de NaCl. Le temps de mélange est plus que doublé quand le taux de recirculation¹⁴ entre les deux parties est doublé induisant des conditions de mélange moins efficaces.

¹⁴ Taux de recirculation : vitesse de recirculation du milieu entre la partie agitée et la partie non agitée d'un réacteur *scale-down*

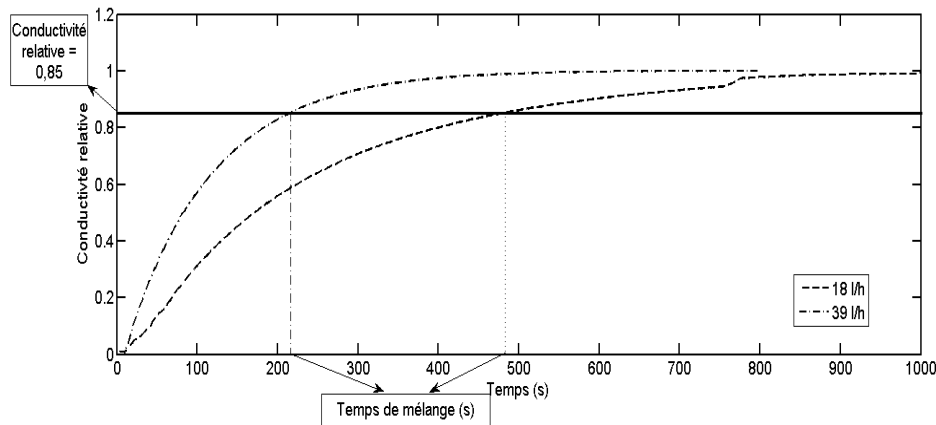


Figure 2.3 : Courbe de traceur, représentant la capacité du système à revenir à l'état d'équilibre, pour un réacteur *scale-down* composé d'un réacteur agité de 20 litres et d'une partie non agitée de 1 litre, à des vitesses de recirculation de 18 l/h et 39 l/h [31]

Les méthodes globales sont des méthodes chimiques et optiques. Elles sont basées sur l'intervention d'une réaction chimique rapide comme la décoloration du volume de liquide contenant un indicateur pH suite à l'ajout d'une solution d'acide ou de base. La « sonde » est souvent l'œil humain ce qui peut provoquer des erreurs dues à l'utilisateur. Pour rectifier ce biais, un enregistrement de l'image est couplé à un programme d'analyse d'image [32].

A côté de ces méthodes, il existe une technique d'analyse d'images couplée à une méthode de fluorescence, nommée *planar laser-induced fluorescence method* ou pLIF¹⁵. Ce système est composé d'une source lumineuse (un laser), d'un ensemble de lentilles permettant de former un plan avec le faisceau laser, d'un milieu fluorescent, d'une caméra et d'un programme d'analyse d'images. La technique consiste à mesurer l'intensité de fluorescence du traceur, excité par un laser plan, et à transformer le signal en gradient de concentration du traceur grâce à une calibration préalable [33]. La pLIF n'est pas une méthode globale puisque la mesure se fait uniquement dans un plan. De plus, elle est limitée au petit volume pour des raisons techniques liées à l'intensité du laser [22]. Elle est donc plutôt utilisée pour étudier la structure des profils de mélange ou quantifier le micromélange¹⁶ et le macromélange¹⁷ plutôt que pour mesurer le temps de mélange [34-36].

La définition du temps de mélange présentée ici concerne l'homogénéisation de deux solutions. Cependant, cette même définition a été appliquée à l'homogénéisation de cellules marquées avec un fluorochrome (CFDA-SE). Des essais ont montré que les deux traceurs se

¹⁵ pLIF : technique optique permettant de visualiser les flux et d'en mesurer certains paramètres (vitesse, concentration, température, pression) au sein d'un réacteur

¹⁶ Micromélange : relatif à un mélange au niveau de ses constituants

¹⁷ Macromélange : concerne le mélange à l'échelle macroscopique, c'est-à-dire directement lié au type d'écoulement

comportent de la même manière au sein du réacteur, ils répondent aux mêmes lois hydrodynamiques. Ceci a permis à Delvigne *et al.* [37] de valider le modèle hydrodynamique décrivant les fluctuations de concentrations rencontrées par les microorganismes lors de leur déplacement au sein du réacteur.

Les techniques présentées ci-dessus concernent le macromélange, c'est-à-dire qu'elles permettent de caractériser les conditions hydrodynamiques à une échelle de l'ordre de grandeur des dimensions du système d'agitation. Or les microorganismes ressentent les fluctuations de l'environnement à une échelle beaucoup plus petite. Il est intéressant de se demander quels types de techniques pourraient être utilisés pour caractériser le micromélange. L'utilisation des marqueurs biologiques est une piste qui sera décrite par la suite.

2.3.2.3. TRANSFERT D'OXYGÈNE

Dans le cas des cultures microbiennes aérobies, l'apport en oxygène est un des facteurs qui a le plus d'impact sur le dimensionnement des réacteurs industriels. En effet, le manque d'oxygène peut avoir un impact sur la productivité des grands réacteurs, surtout en présence de hautes concentrations cellulaires, entraînant une diminution de la viabilité des cellules ou une modification des voies métaboliques empruntées par ces cellules.

Les microorganismes sont insensibles aux changements de concentration en oxygène dans une gamme allant de 10 à 100% par rapport au liquide saturé [19]. Par contre, à de plus faibles concentrations, les réponses aux variations du taux en oxygène peuvent être plus complexes. A de faibles concentrations, la moindre fluctuation du taux en oxygène peut impliquer des modifications dans les voies métaboliques du microorganisme. Or, dans les bioréacteurs de taille industrielle, des fluctuations de la concentration en oxygène peuvent apparaître dans une gamme allant de 0 à 20%. Celles-ci influencent de différentes manières la croissance et la formation de métabolites par le microorganisme.

La technique classique permettant de garder le taux de transfert d'oxygène (OTR) constant entre l'échelle laboratoire et l'échelle industrielle consiste à estimer le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène, $k_{L,a}$, ainsi que la puissance par unité de volume, P_g/V_L [38].

La résistance au transfert d'oxygène se fait essentiellement au niveau des films liquides entourant les bulles de gaz et les microorganismes, et plus particulièrement au niveau du film liquide entourant la bulle gazeuse. La formule permettant de quantifier le transfert d'oxygène

peut être établie à partir du modèle du double film de Withman. L'expression permettant de déterminer le $K_L a$ est la suivante :

$$Q = \frac{q}{V_L} = k_L \cdot \frac{S}{V_L} \cdot (C_L^\circ - C_L) = k_L a \cdot (C_L^\circ - C_L)$$

Avec q : quantité d'oxygène transmise de la phase gazeuse à la phase liquide (mol s^{-1}), V_L : volume de liquide (m^3), K_L : coefficient de transfert en phase liquide (m/s), S : surface d'échange (m^2), C_L et C_L° : concentration en oxygène dissous au sein du liquide et à l'équilibre (moles m^{-3}), a : aire interfaciale (m^2/m^3)

Réaliser un *scale-up* en gardant le taux de transfert en oxygène constant implique une concentration en oxygène dissous dans la phase liquide (C_L) constante et uniforme. Ceci peut être réalisé en jouant sur la différence entre C_L° et C_L , en augmentant par exemple la concentration maximale (C_L°), et /ou en jouant sur le $K_L a$ [39].

2.3.2.4. MODÉLISATION DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES DES RÉACTEURS MÉCANIQUEMENT AGITÉS

Les procédés classiques d'extrapolation considèrent le bioréacteur globalement, en faisant abstraction des caractéristiques locales. Le concept de « boîte noire » ou modèle non structuré permet de calculer facilement certains paramètres, comme la puissance dissipée ou le temps de mélange car il présente l'avantage de la simplicité. Cependant des phénomènes se déroulant dans la cuve, telle l'apparition de gradient de concentration ou de pH, ne sont pas pris en compte. La représentation schématique de la cuve du bioréacteur est alors utile afin de faciliter la description des phénomènes se produisant à l'intérieur de celle-ci. La modélisation structurée est alors un outil efficace. Le volume du bioréacteur peut être représenté sous la forme d'un maillage (MFN) ou divisé en plusieurs compartiments reliés entre eux par les flux décrivant le mélange (modèle déterministe ou stochastique).

MÉCANIQUE DES FLUIDES NUMÉRIQUE (MFN) OU COMPUTATIONAL FLUID DYNAMIC (CFD)

La mécanique des fluides numérique consiste à étudier les mouvements d'un fluide, ou leurs effets, par la résolution numérique d'équations de type Naviers-Stokes, régissant le fluide. Dans le domaine de la recherche, cette approche est l'objet d'un effort important car elle permet l'accès à toutes les informations instantanées pour chaque point du domaine de calcul pour un coût global généralement modique par rapport aux expériences correspondantes.

Réaliser un *scale-up* en utilisant cette technique n'est pas encore réalisable surtout à cause du régime turbulent développé dans le réacteur car cela complexifie les équations [39]. De plus,

l'agitation et l'injection d'air perturbe l'écoulement. Des essais de modélisation ont été réalisés en MFN mais la complexité des équations oblige une simplification du modèle qui s'écarte alors de la réalité [40]. Il faut donc établir un équilibre entre la demande informatique et les exigences de précision du modèle.

L'APPROCHE DU MODÈLE COMPARTIMENTÉ (AMC)

Le modèle déterministe est le modèle le plus communément appliqué aux bioréacteurs pour exprimer les phénomènes de mélange. Dans cette approche, le réacteur est divisé en compartiments, chacun considéré comme parfaitement agité. Des équations différentielles décrivent les flux existant entre ces compartiments. La résolution de ces équations donne la trajectoire globale de la dynamique du système. Dans le cas de l'homogénéisation d'une solution concentrée dans le milieu de culture, la dynamique est la répartition de la perturbation au sein du réacteur sous l'action du processus de mélange.

La figure 2.4 présente un exemple de décomposition de la cuve d'un bioréacteur à 2 étages d'agitation. Les compartiments sont reliés par les flux de circulation (les flux de turbulence¹⁸ ne sont pas représentés) [41]. Ce type de modèle permet de représenter les phénomènes de mélange avec une assez bonne résolution. La précision du modèle dépend du nombre de compartiments considérés : plus celui-ci est élevé, meilleure est la résolution. Il existe des variantes de cette approche en fonction du type et du nombre d'agitateurs ainsi que du nombre de compartiments considérés [42]. Le modèle le plus simple, ne prenant en compte qu'un seul compartiment par étage d'agitation [43, 44], est devenu rapidement limitant pour décrire les phénomènes de mélange. Le modèle du réseau de zones (Networks-of-Zones), dans lequel de nombreux compartiments interconnectés sont pris en compte, a été développé par Mann *et al.* [45, 46]. L'augmentation du nombre de compartiments permet d'améliorer la résolution du modèle mais le rend aussi plus complexe, point de vue du traitement informatique, par exemple. La version originale du modèle du réseau de zones a été étendue pour couvrir la distribution de taille des bulles gazeuses, le transfert de masse gaz – liquide, la cinétique des bioréacteurs et les opérations utilisant plusieurs agitateurs [41].

¹⁸ Flux de turbulence ou flux tangentiel : caractère d'un fluide dans lequel la vitesse présente en tout point un profil tourbillonnaire

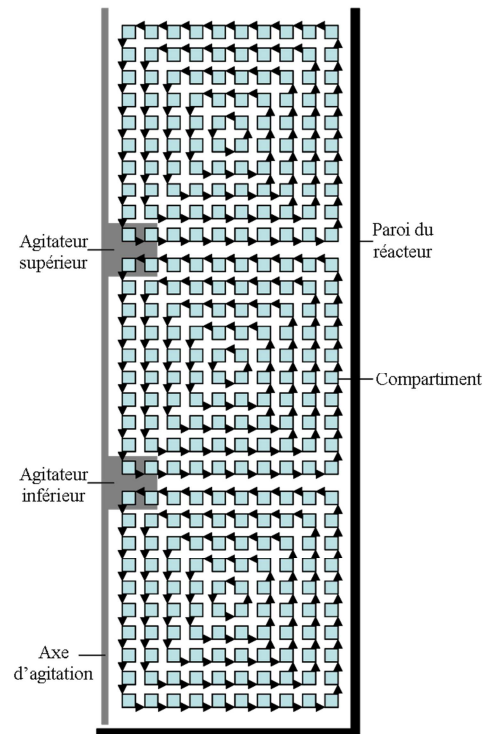


Figure 2.4 : Décomposition de la cuve en zones homogènes interconnectées par les flux de circulation (les flux de turbulence ne sont pas représentés) : cas d'un réacteur muni d'un axe avec deux agitateurs

Dans le cas du modèle déterministe, basé sur un réseau de zones, l'évolution de la concentration du substrat est décrite par un ensemble d'équations différentielles, décrivant le bilan de masse d'un compartiment, interconnecté avec son (ses) voisin(s) par des flux de circulation et/ou de turbulence :

$$\text{Variation} = \text{In} - \text{Out}$$

$$\text{Ou} \quad V * \frac{dC_n}{dt} = Q_c * (C_{n+i} - C_n) + Q_e * (C_{n+i} + C_{n-j} - 2 * C_n)$$

Avec C_i : concentration en soluté ($g \Gamma^l$), Q_c et Q_e : débit de circulation et débit de turbulence ($l h^{-1}$) et V : volume d'un compartiment (l)

L'ensemble d'équations ainsi créé peut être résolu par une routine de type Runge – Kutta [47]. Les flux de circulation, Q_c , sont calculés en utilisant des corrélations venant de l'analyse dimensionnelle et les flux de turbulence, Q_e , sont estimés par des expériences de mesure du temps de mélange.

Ce type de modèle ne permet d'obtenir qu'une seule solution relative à chaque opération de mélange. Une autre limitation est que le modèle se construit sur base de flux de molécules solubles et non pas sur des flux de petites particules. Le comportement des microorganismes

durant leur séjour dans le réacteur n'est donc pas modélisable par ce type d'approche. De plus, le traitement mathématique, assez lourd, nécessaire à la résolution des équations différentielles fait que seuls les cas les plus simples peuvent être décrits. Une augmentation du nombre de compartiments considérés provoquent l'augmentation de la complexité du calcul et donc du temps nécessaire à la réalisation d'une simulation.

APPROCHE HYBRIDE

L'approche hybride combine la mécanique des fluides numérique avec le modèle compartimenté. La définition des compartiments, considérés comme homogènes, peut se faire manuellement ou de manière automatique. Cette approche consiste donc à résoudre l'écoulement turbulent par mécanique des fluides numérique et ensuite de développer un modèle compartimenté basé sur les résultats de la MFN [48].

Bezzo et al. [49] ont développé un modèle hybride pour étudier des bioréacteurs complexes conduits en mode *batch*. Un des avantages du modèle hybride est qu'il permet de déterminer les flux entre des zones adjacentes, ainsi que les caractéristiques hydrodynamiques importantes de chacune des zones. Cette approche se révèle donc être un outil utile pour prédire les interactions complexes entre les réactions biologiques et l'hydrodynamique des bioréacteurs agités.

COUPLAGE HYDRODYNAMIQUE – RÉACTIONS BIOLOGIQUES

Dans le cas des bioprocédés, le but du *scale-up* est de prédire le comportement du microorganisme en fonction des performances du bioréacteur. Dans cette optique, le couplage d'un modèle de cinétique microbienne à un modèle hydrodynamique, constitue un outil intéressant pour l'étude des phénomènes d'extrapolation. Comme dans le cas des modèles hydrodynamiques, de nombreux modèles de cinétique microbienne, structurés ou non, sont disponibles dans la littérature. Le modèle le plus simple, non structuré, est celui de Monod [50]. Mais il existe de nombreux modèles structurés : modèle du goulot d'étranglement [51], modèle cybernétique [52], modèle cinétique et de transfert de masse [53], simulation de la compétition dynamique entre les voies métaboliques [54], modèle prenant en compte deux compartiments biochimiques [55],...

Dans le paragraphe suivant, l'approche stochastique est décrite. Celle-ci permet de combiner, en utilisant les probabilités, la description des conditions hydrodynamiques avec la cinétique de croissance des microorganismes.

APPROCHE STOCHASTIQUE

Cette approche prend en compte le caractère aléatoire du processus de mélange par l'introduction de probabilités décrivant les flux existant entre les compartiments du modèle, appelé « états ». Deux types de probabilité peuvent être décrits : la probabilité de quitter l'état i et la probabilité de rester dans l'état i . Les probabilités que possède une particule de rester dans cet état ou de migrer dans un autre vont réguler l'action de mélange au sein de l'entière du réacteur. Les probabilités sont proportionnelles au flux de circulation, de turbulence (ou tangentiels). Ces probabilités entrent dans la composition d'une matrice, appelée matrice de transition. Cette matrice multipliée par le vecteur état, vecteur reprenant les concentrations en substrat de chaque état considéré à un temps donné, résulte en un nouveau vecteur état décrivant les concentrations en substrat dans les différents états de la cuve à l'instant suivant.

La résolution des probabilités conduit à différentes trajectoires de la dynamique du système. Plusieurs simulations sont donc nécessaires pour obtenir la moyenne et la variance associées à la dynamique du système. Ce type de modèle a jusqu'ici été peu exploité par la littérature traitant de mélange dans les bioréacteurs. Pourtant cette approche présente de nombreux avantages, à performance semblable à celle de l'approche déterministe :

- facilité de résolution mathématique car il s'agit d'une succession de multiplication de la matrice de transition et du vecteur état (chaîne de Markov [56])
- prise en compte du caractère aléatoire du processus de mélange
- possibilité de décrire la circulation d'une particule et donc d'un microorganisme

Ce dernier point est important car il est alors possible de coupler un modèle décrivant l'hydrodynamique du réacteur avec un modèle décrivant la croissance microbienne. A partir du modèle de l'hydrodynamique du système, le trajet moyen d'un microorganisme pendant la fermentation peut être calculé ainsi que les concentrations en glucose auxquelles celui-ci est confronté.

La principale limitation de cette approche de modélisation est de travailler sans référentiel temporel. Une transition correspond à un intervalle de temps qui doit être estimé pour permettre de resituer l'opération de mélange dans le temps. Pour cela, le temps de mélange est utilisé :

$$\Delta t = \frac{t_m}{k} = \frac{t_c}{n * c}$$

Avec Δt : durée d'une transition (s), t_m : temps de mélange de l'expérience de traceur (s), n : nombre de transitions à effectuer avant d'atteindre l'état correspondant au temps de mélange, t_c : temps de circulation (s) et c : paramètre caractéristique de l'agitateur.

2.4. RÉACTEURS DE LABORATOIRE COMME OUTIL PRÉDICTIF DE L'EXTRAPOLATION DES BIOPROCÉDÉS : APPROCHE *SCALE-DOWN*

Le réacteur *scale-down* est un système permettant de mimer les conditions critiques de la production industrielle de microorganismes à petite échelle. Ces réacteurs ont été utilisés pour mimer l'influence des gradients en oxygène, en glucose, de pH ou même l'impact du transfert de chaleur sur différentes cultures de microorganismes [57]. Il existe plusieurs types de réacteurs *scale-down*. Certaines configurations sont représentées à la figure 2.5. Le choix de cette configuration doit se faire en prenant en compte le type d'effet étudié ainsi que le microorganisme produit [5].

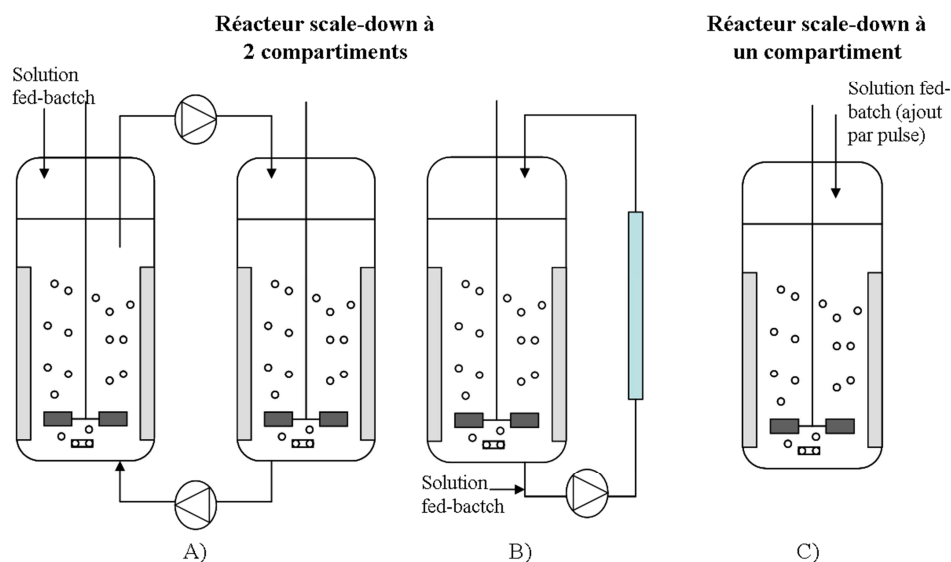


Figure 2.5 : Schéma de différents types de système *scale-down* : A) Couplage de 2 réacteurs agités, B) Couplage d'un réacteur agité avec une partie non agitée, C) Réacteur agité seul dans lequel les conditions opératoires varient

Les réacteurs *scale-down* à deux compartiments (figure 2.5 A et 2.5 B) ont été largement utilisés pour étudier les phénomènes intervenant à l'échelle industrielle. Le réacteur agité peut être relié à une zone non agitée ou peu agitée (figure 2.5 B) et le milieu de culture est mis en recirculation entre ces deux parties grâce à une pompe péristaltique [13, 58]. Ce type de configuration a été utilisé pour étudier l'impact de la zone d'ajout en glucose sur *Saccharomyces cerevisiae* [2]. Delvigne *et al.* [59] ont montré qu'un tel système permet de créer un gradient de concentration tel qu'il est rencontré dans un réacteur de grand volume.

Ce phénomène est aussi plus marqué dans le cas d'un réacteur *fed-batch* où une solution concentrée en glucose est ajoutée en un seul point du fermenteur. L'étude d'une culture en système *scale-down* montre une diminution du rendement en biomasse, comme c'est le cas lors d'une production industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* [31]. Cette diminution est due aux zones de fortes concentrations en glucose créées par le système de recirculation. Il y a aussi une production d'éthanol dans cette région car la concentration en glucose y est supérieure à la concentration critique.

L'effet des valeurs hautes et basses de pH sur la croissance d'*E. coli* a aussi été évalué grâce à ce système [60]. Papagianni *et al.* [61] ont utilisé un réacteur avec une recirculation tubulaire pour étudier la fermentation d'*Aspergillus niger* au niveau du laboratoire. Ce système permet de simuler les boucles de circulation présentes dans les réacteurs de plus grand volume. La production d'acide citrique et la morphologie du mycélium ont été utilisées comme paramètres de comparaison entre les 2 systèmes. Le système *scale-down* mis en place peut être utilisé pour déterminer le volume maximum permettant de produire ce microorganisme en éliminant les gradients néfastes et les excès de substrat.

Les résultats obtenus par Georges *et al.* [62] montrent que le système *scale-down* permet d'investiguer la sensibilité des microorganismes face à l'augmentation de la taille des réacteurs et peut être un outil d'extrapolation intéressant.

Sweere *et al.* [63] ont étudié l'effet des gradients de concentrations en glucose et en oxygène dissous à l'aide d'un système *scale-down* consistant en 2 réacteurs reliés l'un à l'autre (figure 5A). Les conditions dans chaque fermenteur peuvent être choisies plus ou moins indépendamment. Ce système a déjà été utilisé par Oosterhuis *et al.* [64] pour simuler les profils en oxygène dissous qui peuvent être observés lors de la production à grande échelle de l'acide gluconique par *Gluconobacter oxydans*. Le système couplant deux réacteurs agités a aussi été utilisé pour comprendre les modifications métaboliques observées lorsque les cellules d'*E. coli* passent de zones aérobies à des zones anaérobies [65]. Ce système de couplage de deux fermenteurs offre de plus grandes possibilités pour étudier séparément les effets des différentes zones.

Une expérience *scale-down* peut également être menée dans un réacteur seul (figure 2.5 C). Dans ce cas, ce sont les paramètres qui fluctuent pour recréer un gradient de concentrations en nutriment par exemple. L'ajout se fait par pulse ce qui mime le parcours du microorganisme

dans le réacteur industriel, passant des zones à fortes concentrations en glucose aux zones à faibles concentrations en glucose [57].

A côté de ces réacteurs *scale-down* dont le volume peut être de l'ordre du litre, il existe des systèmes où les volumes engagés sont de l'ordre du millilitre voire du microlitre. Ces réacteurs permettent d'atteindre un haut degré d'automatisation et ainsi obtenir des procédures permettant d'acquérir de nombreux résultats en peu de temps et avec peu de matériel mis en œuvre [57]. Ce type de système a été utilisé, par exemple, pour étudier la cinétique de croissance et l'expression des gènes chez *Saccharomyces cerevisiae* [66].

2.5. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PARAMÈTRES PHYSIQUES ET PHYSIOLOGIQUES EN COURS DE PRODUCTION : VERS DES PROCÉDURES D'EXTRAPOLATION BASÉES SUR LA PHYSIOLOGIE

La réponse physiologique du microorganisme face aux conditions environnementales n'est pas unique et dépend d'un ensemble de réactions métaboliques, physiologiques ou transcriptionnelles. Il s'agit pourtant d'un paramètre primordial à maîtriser lors de l'extrapolation d'une culture à l'échelle industrielle. La technique des puces à ADN¹⁹, par exemple, a été utilisée pour étudier la réponse de *Saccharomyces cerevisiae* vis-à-vis du stress salin [67] ou du stress osmotique [68]. Erasmus *et al.* [69] ont montré que 589 gènes de *Saccharomyces cerevisiae* sont deux fois plus actifs dans un milieu contenant 40% (W/V) de sucres. Gash *et al.* [70] ont étudié les gènes impliqués dans la réponse à différents stress (Environmental Stress Response ou ESR) grâce à cette même technique, qui, bien que très riche en informations, n'est pas utilisable en routine et ne donne pas une réponse en ligne de l'état des cellules.

Les réactions en jeu sont caractérisées par différentes échelles temporelles et peuvent être irréversibles puisqu'elles peuvent toucher la viabilité des microorganismes. La figure 2.6 présente les temps caractéristiques liés aux aspects physico-chimiques du procédé ainsi que ceux liés aux processus microbiens impliqués dans la réponse cellulaire.

¹⁹ Puces à ADN : technologie permettant d'analyser le niveau d'expression des gènes dans une cellule, un tissu, un organe, un organisme ou encore un mélange complexe, à un moment donné et dans un état donné par rapport à un échantillon de référence

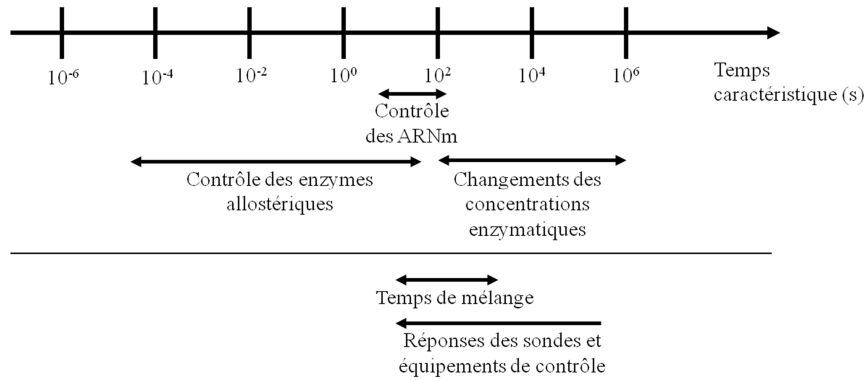


Figure 2.6 : Temps de relaxation de différentes étapes du métabolisme des microorganismes et de leur environnement dans le réacteur (adapté de [20])

2.5.1. CAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Les levures sont un groupe de microorganismes intéressant industriellement car elles sont utilisées dans de nombreux procédés de fermentation (pain, bière, vin,...) mais aussi en recherche fondamentale, dans le domaine de la santé, en biotechnologies [71] et dans la production de bioéthanol. *Saccharomyces cerevisiae* est un microorganisme eucaryote (règne des Fungi), dit GRAS (Generally Recognized As Safe). Dans un autre domaine, citons l'exemple de *Saccharomyces boulardii*, utilisée en tant que probiotique²⁰ et prescrite aux patients souffrant de diarrhées à la suite d'un traitement antibiotique. Cette levure apparaît également intéressante dans la réduction de symptômes dus aux traitements contre *Helicobacter pylori*, dans la prévention des infections à *Clostridium difficile* ou encore intervient dans le traitement des maladies chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn [72]. Les levures peuvent donc être considérées comme des « cellules-usines ». La production à l'échelle industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* est problématique car elle possède un métabolisme surverse qui provoque la production d'un métabolite secondaire, l'éthanol, en présence d'une concentration élevée en glucose. Ce phénomène provoque des pertes de rendement et de viabilité.

Saccharomyces cerevisiae utilise le glucose comme source énergétique principale. Sa dégradation fait l'objet de la glycolyse, conduisant à la formation de pyruvate et libérant de l'ATP et du NADH. Les enzymes clés sont la phosphofructokinase et la pyruvate kinase. Le pyruvate est considéré comme la plaque tournante du métabolisme général chez la levure [55]. Il est utilisé dans la respiration, en entrant dans la chaîne respiratoire à travers la

²⁰ Probiotique : microorganismes vivants (bactéries ou levures) qui, ajoutés comme compléments à certains produits alimentaires (yaourts, céréales,...), ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte

membrane mitochondriale, mais peut aussi servir de point de départ à la fermentation alcoolique et conduire à la production d'éthanol. Cette particularité du métabolisme de la levure est synthétisée à la figure 2.7.

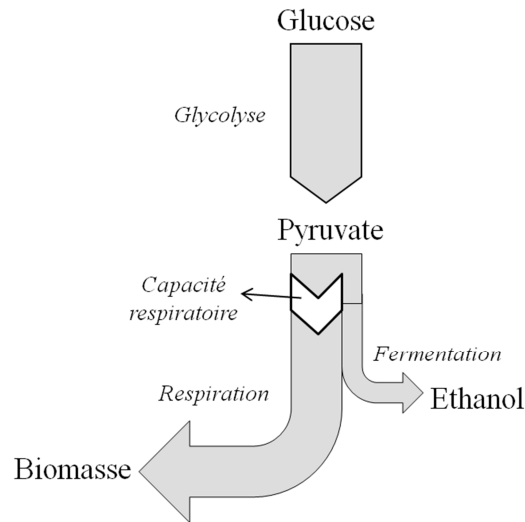


Figure 2.7 : Représentation de la capacité respiratoire de la levure et du *by-pass* entre fermentation et respiration

Saccharomyces cerevisiae fait donc partie des levures sensibles au glucose [73]. Elle est Crabtree positive²¹ et produit donc de l'éthanol même en condition aérobie quand la concentration en glucose est élevée (supérieure à 0,04 g/l). Pour pallier à cette particularité, la production de cette levure est effectuée en *fed-batch*, c'est-à-dire qu'une solution concentrée en glucose est ajoutée en cours de culture pour maintenir la levure en dessous d'un certain taux de croissance critique, μ_{crit} , où le glucose est totalement oxydé selon un coefficient de rendement en biomasse par rapport au glucose, $Y_{X/S}^{Ox}$. Cependant, entre ce taux critique et le taux de croissance maximum, μ_{max} , l'excès de glucose est converti en métabolite, via la voie réductrice, à un rendement plus faible, $Y_{X/S}^{Red}$ [74]. Il est donc nécessaire de faire croître les cellules à un taux aussi proche que possible du taux critique [75-78]. Une manière de procéder serait de contrôler la concentration en éthanol et de la maintenir à un niveau aussi bas que possible [74].

Cette propriété de passer d'un métabolisme respiratoire à un métabolisme fermentaire, ajouté au mode *fed-batch*, est problématique lorsque l'objectif est d'augmenter le volume de production de la levure. Les gradients de concentration en glucose créés dans la cuve par les

²¹ Effet Crabtree : transition respiro-fermentaire en conditions aérobies, c'est-à-dire à une production d'éthanol en présence d'oxygène

conditions hydrodynamiques défavorables perturbent le métabolisme des cellules. Lorsqu'une culture de levure a produit de l'éthanol lors de sa croissance, le rendement en biomasse par rapport au glucose ($Y_{X/S}$) chute par rapport à une culture idéale où la production d'éthanol est évitée. Dans ce cas idéal, la valeur de $Y_{X/S}$ est de 50%, alors que lorsque la levure produit de l'éthanol, ce rendement peut chuter jusqu'à 39% [62], voire 36% [31, 59, 79]. En plus de la perte de rendement, la levure se conserve moins bien et perd de son pouvoir fermentaire et donc de sa qualité.

2.5.2. MESURE DE PARAMÈTRES PHYSIQUES

Le temps de réponse des sondes et des équipements de contrôle est bien plus grand que celui des processus biologiques. Des sondes avec un temps de réaction très court sont donc requises. Un système de contrôle industriel idéal doit être simple, robuste et basé sur des techniques de mesure non-invasives [82]. Dans le cas d'une culture où le mode *fed-batch* est utilisé, le contrôle de l'ajout est primordial si de fortes concentrations cellulaires sont attendues. Différentes approches ont été développées comme le suivi de la concentration en éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* [80] ou d'un substrat limitant comme le méthanol chez *Pichia pastoris* [81], mais aussi d'autres variables comme le pH, l'oxygène dissous, le quotient respiratoire,... Des approches prenant en compte la physiologie cellulaire voient le jour comme par exemple le contrôle de l'ajout de substrat en temps réel en se basant sur la demande en oxygène dissous. Cette technique a donné de bons résultats pour des cultures industrielles de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* et *Escherichia coli* [78].

Les capteurs classiquement présents sur un bioréacteur donnent des renseignements sur les paramètres physiques du procédé : température, oxygène dissous, pH,... Ces paramètres jouent un rôle essentiel dans la bonne conduite d'une production de microorganismes. Prenons l'exemple des sondes mesurant la quantité d'oxygène dissous dans le réacteur. Classiquement cette mesure s'effectue grâce à des sondes polarographiques [83], qui possèdent divers inconvénients : le temps de réponse est assez long, l'électrolyte peut se contaminer et la calibration est souvent difficile. C'est pourquoi de nouvelles sondes ont fait leur apparition sur le marché, comme par exemple des sondes à fibres optiques. Le principe de la mesure se base sur le *quenching* de la luminescence [84]. Ce système comporte un mini-détecteur qui contient des molécules luminophores et sur lequel est dirigé un faisceau lumineux. Lorsque ces molécules sont portées à un état excité par l'absorption du rayon lumineux, celles-ci réémettent l'énergie absorbée sous forme d'émission lumineuse. L'oxygène vient perturber ce système en acceptant l'énergie émise par le rayon lumineux. La

molécule luminophore reste donc éteinte. Il existe une relation entre la concentration en oxygène dissous dans le milieu et l'intensité de la luminescence. Ces sondes présentent l'avantage de la rapidité de réponse, de la facilité de pose et d'entretien, ainsi qu'une calibration aisée [85]. Un nouveau polymère hydrophobe luminescent réagissant à l'oxygène dissous a été utilisé dans des microbioréacteurs. Ce film sensible donne une réponse rapide de concentration en oxygène dissous, a une bonne stabilité et a l'avantage d'être peu coûteux pour les applications en bioprocédés [86].

2.5.3. MESURE DE PARAMÈTRES PHYSIOLOGIQUES

Outre ces paramètres physiques, ce sont les paramètres biochimiques et physiologiques qui sont intéressants à suivre de façon à adapter les conditions opératoires à la culture réalisée et ce en temps réel. Le tableau 2.2 présente certains de ces paramètres, les techniques qui permettent de les mesurer et si cette mesure se fait en ligne ou hors ligne.

Tableau 2.2 : Tableau reprenant différents paramètres utiles à suivre en cours de culture et le type de mesure possible : en ligne ou hors ligne

Phase	Paramètres	Techniques	Mesure OFF LINE	Mesure ON LINE
Phase solide ≡ microorganisme	Biomasse (estimation de la population microbienne totale)	Densité optique	X	X
		Dosage gravimétrique	X	
	Concentration cellulaire (estimation de la population microbienne vivante)	Dénombrement	X	
		Cytométrie en flux + marquage cellulaire	X	X
Caractéristique cellulaire (perméabilité de la membrane, activité métabolique, expression de protéine, activité enzymatique,...)	Cytométrie en flux + marquage cellulaire ou utilisation de souches GFP	X		
Phase gazeuse ≡ espace de tête du réacteur	CO ₂ – O ₂	Analyseur de gaz		X
Phase liquide ≡ milieu de culture	Métabolites (éthanol, acétate,...)	Kit enzymatique	X	
		Méthode chromatographique	X	X
		Sonde		X
	Substrat		X	
Protéines	Dosage Follin	X		

Il existe peu de sondes permettant de suivre en ligne les caractéristiques physiologiques des cellules. Les mesures se font généralement hors-ligne, après prélèvement d'un échantillon, comme c'est le cas pour la mesure de la concentration en biomasse par exemple. La technique classique consiste à mesurer la densité optique de l'échantillon par spectrophotométrie. Cette densité optique est ensuite convertie en concentration en biomasse (g.l⁻¹) grâce à une corrélation qui doit être établie pour chaque application. Cette technique ne permet pas, par

exemple, d'adapter en ligne l'ajout de glucose à la croissance cellulaire. Des sondes mesurant en ligne la concentration en biomasse existent sur le marché. Elles peuvent être basées sur différents principes : sondes diélectriques [87, 88], sondes optiques [89], sondes fluorimétriques, analyse de la taille des particules [90], mesure de l'impédance à hautes fréquences [91]... Certaines techniques utilisent un microscope, monté en ligne, qui permet de photographier et d'analyser directement des informations morphologiques mais aussi estimer la concentration cellulaire [92].

L'utilisation de marqueurs fluorescents détectant la présence ou l'absence d'une caractéristique physiologique (perméabilité de la membrane, réaction enzymatique, activité métabolique,...) couplée à la cytométrie en flux permet d'obtenir un grand nombre d'informations en peu de temps. La cytométrie en flux est de plus en plus utilisée pour étudier la physiologie des cellules en croissance. Cette technique permet de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer la population suivant plusieurs critères et de les trier [6]. Elles peuvent être identifiées sur base de leur intégrité, de la perméabilisation des membranes, de leur activité métabolique ou de leur capacité à se reproduire [93]. La cytométrie en flux présente des avantages non négligeables. Il s'agit d'une technique rapide qui mesure les caractéristiques de chaque cellule. Il est alors possible de connaître l'hétérogénéité présente au niveau de la population cellulaire [6, 7]. Dans le cas de l'estimation de la viabilité cellulaire, la difficulté provient du fait qu'il n'existe pas uniquement deux états cellulaires : cellules mortes ou cellules vivantes. Les cellules peuvent être dans des états physiologiques intermédiaires, qualifiés de viables mais non cultivables [94]. En choisissant différents marqueurs cellulaires, employés simultanément pour autant que les fluorescences ne se superposent pas, il est alors possible de distinguer par cytométrie en flux ces états intermédiaires, indétectables par des techniques classiques de dénombrements cellulaires.

L'iodure de propidium (PI) est un marqueur de l'intégrité des membranes [95]. Il colore, en rouge, les cellules dont les membranes deviennent perméables. Le colorant entre dans la cellule et s'intercale dans l'ADN. Les cellules sont alors considérées comme mortes. La rhodamine 123 (Rh123) est un marqueur du potentiel de membrane²². Le bromure d'éthidium (EB), contrairement au PI, peut passer au travers des membranes cytoplasmiques intactes. Il

²² Potentiel de membrane : différence de potentiel électrique existant entre les faces extracellulaire et intracellulaire de la membrane plasmique de toute cellule vivante

est aussi un intercalant de l'ADN mais il est pompé par transport actif vers l'extérieur de la cellule dans les cellules saines [96]. Le PI est parfois combiné au carboxyfluorescéine diacétate (CFDA). Il s'agit d'un composé incolore qui peut pénétrer dans les cellules saines. Il devient fluorescent si la cellule possède une activité estérase [97], elle est alors considérée comme vivante. Le colorant FUN-1 [(2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-méthyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-méthylène)-1-phénylquinolinium) iodide] permet de discriminer les cellules sur base de leur activité métabolique. Il est converti par les cellules, possédant une membrane intègre et métaboliquement actives, qui transforment la fluorescence diffuse verte en des structures intravacuolaires oranges-rouges ou jaunes-oranges intenses [98]. Placé en ligne, le cytomètre en flux permet d'obtenir instantanément l'état cellulaire des microorganismes présents dans le réacteur et adapter les conditions de culture si besoin. Broger *et al.* [99] ont observé que les cellules diffèrent l'une de l'autre pendant leur croissance dans le bioréacteur.

Les souches intégrant un gène codant pour une protéine recombinante fluorescente (souche GFP), couplée à la cytométrie en flux constituent une alternative intéressante aux techniques de marquages cellulaires, parfois laborieuses. Il existe des banques de souches modifiées pour *Escherichia coli* [100] et pour *Saccharomyces cerevisiae* [101]. Ces souches peuvent être utilisées pour étudier une caractéristique physiologique précise du microorganisme ou comme bio-marqueur, c'est-à-dire comme sonde permettant de définir les variations de conditions de croissance perçues par les microorganismes lors d'une production [102, 103]. La viabilité n'est pas le seul paramètre intéressant à étudier lors de la production de cellules de levures. Carlquist *et al.* [104] ont mis au point un système de double gène rapporteur exprimant une protéine recombinante fluorescente chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cela leur a permis de mesurer cellule par cellule, grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux, les variations au niveau de la croissance et de l'intégrité de la membrane après un stress physiologique (cycle de gel et dégel). Ils ont ainsi montré qu'il existe une corrélation inverse entre la croissance et l'intégrité de la membrane et que plusieurs phénotypes coexistent dans la population.

Les techniques de marquage cellulaire et l'utilisation de souches exprimant une GFP peuvent être combinées. La figure 2.8 montre des photos prises au microscope confocal d'une levure exprimant une GFP, dont l'expression est liée à un promoteur d'activité ribosomal pour la croissance [104]. Si la cellule est viable, elle exprime la protéine fluorescente en même temps que l'activité ribosomiale et la cellule fluoresce. L'échantillon a également été marqué à l'iodure de propidium. Le microscope confocal permet de prendre des photos de l'échantillon

sur différents plans ce qui permet de représenter plus fidèlement l'échantillon. Le résultat est une compilation de ces différentes photos.

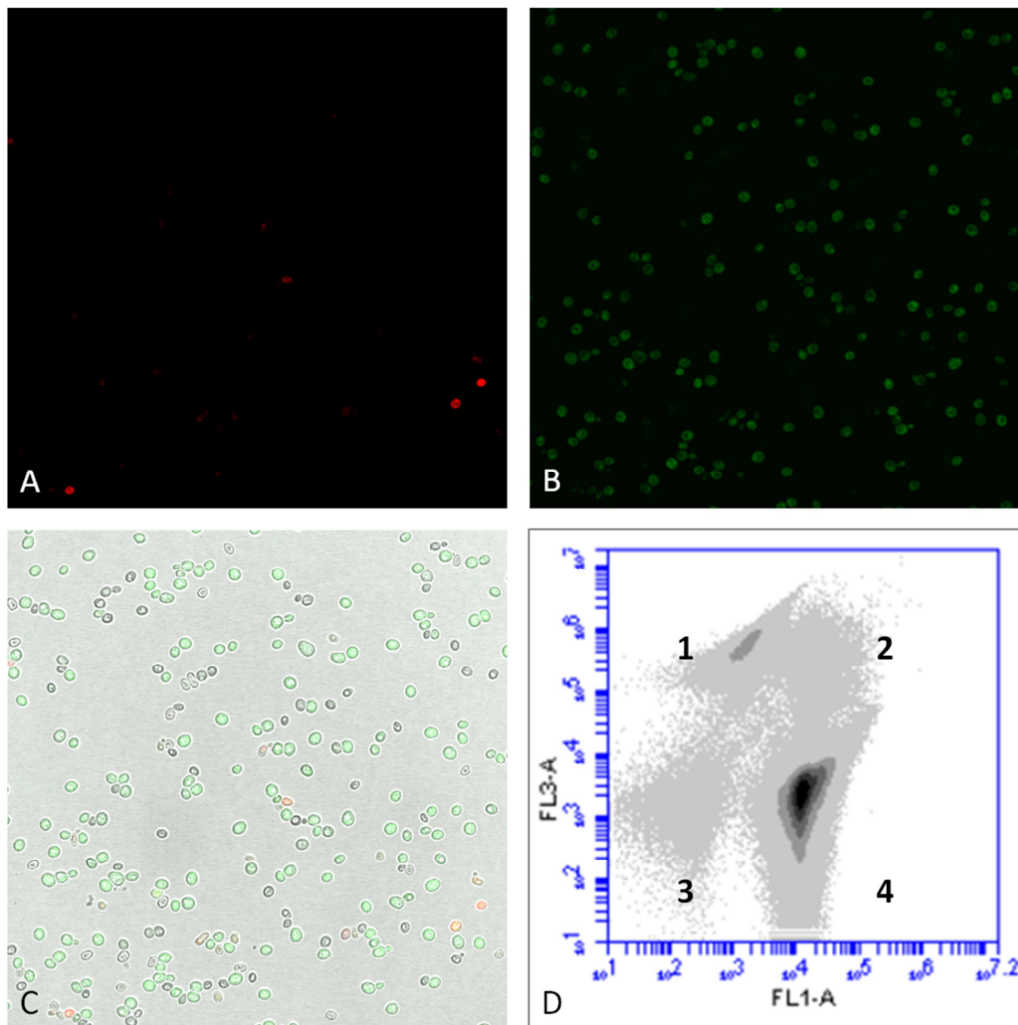


Figure 2.8 : Exemple de photos prises au microscope confocal d'un échantillon de *Saccharomyces cerevisiae* (produite en chemostat) exprimant une GFP et marqué à l'iodure de propidium : A) photo prise avec un filtre permettant de voir la fluorescence rouge (marquage PI), B) photo prise avec un filtre permettant de voir la fluorescence verte (expression de la GFP), C) Superposition des images A et B et d'une photo prise en inversion de phase et D) Exemple de cytogramme pouvant être obtenu à partir de ces photos

De plus, dans l'exemple présenté à la figure 2.8, des filtres ont été utilisés pour observer d'une part la fluorescence rouge et les cellules marquées au PI (figure 2.8 A) et d'autre part, la fluorescence verte et les cellules exprimant la protéine fluorescente (figure 2.8 B). La figure 2.8 C résulte de la compilation des trois types de photos. Il est alors possible d'observer différents stades cellulaires : cellules au métabolisme actif ou non, cellules dont la membrane est endommagée,.... Un logiciel d'analyse d'image peut, à partir de ces photos, créer un cytogramme (figure 2.8 D). Dans ce type de graphique, chaque point correspond à une cellule.

Les axes représentent l'intensité de la fluorescence dans le vert pour l'abscisse et de la fluorescence dans le rouge pour l'ordonnée. Ils représentent donc respectivement la fluorescence due à la GFP et la fluorescence due au PI. En réalisant plusieurs tests de référence, il est possible de définir des zones dans ce graphique qui séparent les cellules suivant leur état :

- cellules dont la membrane est endommagée : GFP-/PI+
- cellules se trouvant dans un stade intermédiaire : GFP+/PI+
- cellules n'exprimant ni la GFP, ni le PI : GFP-/PI-
- cellules actives : GFP+/PI-

Les états cellulaires semblent ne pas être irréversibles. Davey *et al.* [105] ont montré qu'il existait un phénomène de régénération de la membrane et de redémarrage des activités métaboliques nécessaires à la croissance de la levure. Ce phénomène est illustré à la figure 2.9. Ces cytogrammes ont été obtenus lors d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae*, exprimant une GFP liée à un promoteur d'activité ribosomale. La culture s'effectue en mode chemostat, après 7 heures de culture *batch*. Cette expérience a été menée dans le but d'étudier la stabilisation physiologique de la levure. Des échantillons ont été prélevés pendant la culture, marqués au PI et analysés par cytométrie en flux.

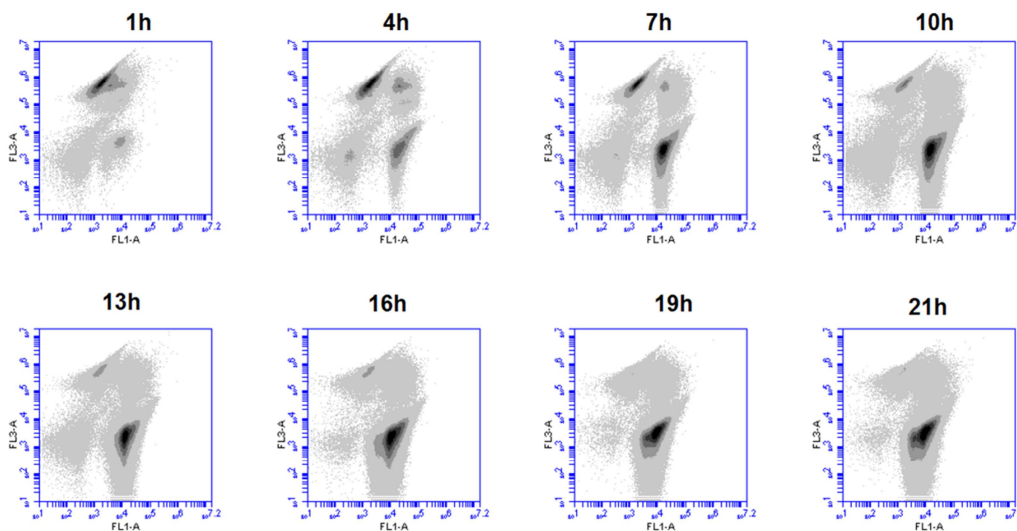


Figure 2.9 : Cytogrammes obtenus au cours d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae*, exprimant une GFP et marqué au PI (culture *batch* suivie d'un chemostat après 7H) montrant le phénomène de régénération

Une évolution de la répartition des cellules dans les 4 parties du cytogramme peut être observée. Il y a un phénomène de régénération. Des cellules se trouvant dans le groupe des

cellules à la membrane endommagée juste avant le passage en chemostat se « déplacent » dans le pool des cellules en stade intermédiaire pour finir dans les cellules actives après 13 à 16 heures de culture. Il y a régénération de la membrane et redémarrage des activités métaboliques nécessaires à la croissance de la levure.

2.6. CONCLUSION

L'extrapolation de la production d'un microorganisme à l'échelle industrielle est complexe à mettre en œuvre car il faut tenir compte des conditions de mélange développées dans le réacteur et de l'impact que peuvent avoir ces conditions sur la croissance du microorganisme. Cet impact peut être très néfaste pour l'industriel car des pertes de rendement et de viabilité sont observées. Cet article présente des outils permettant de réaliser le passage de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle de façon plus optimale. Les techniques classiques du *scale-up* utilisent des paramètres globaux qui ne prennent pas en compte les hétérogénéités présentes dans les réacteurs de grand volume. Des modèles mathématiques ont donc été développés pour représenter les gradients développés au sein des cuves de volume industriel. Le plus intéressant est le modèle stochastique, qui représente les flux intervenant dans le réacteur grâce à des probabilités et auquel il est possible de juxtaposer la croissance microbienne et donc d'obtenir un modèle complet. Dans le cas particulier de la production de *Saccharomyces cerevisiae*, le métabolisme du glucose caractéristique de cette levure induit des difficultés lors du passage à une production industrielle. De nouvelles techniques existent pour suivre au mieux les perturbations de la physiologie des cellules lorsqu'elles sont soumises à des modifications des conditions de production. Les marquages cellulaires ou l'utilisation de souches GFP couplés à la cytométrie en flux sont des outils puissants permettant de suivre l'impact des perturbations hydrodynamiques sur la croissance et le métabolisme des cellules.

2.7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lee S.Y., *High cell-density culture of Escherichia coli*. Trends in Biotechnology, 1996. **14**(3): p. 98-105.
2. George S., Larsson G., and Enfors S.O., *A scale-down two-compartment reactor with controlled substrate oscillations: Metabolic response of Saccharomyces cerevisiae*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1993. **9**(6): p. 249-257.
3. Woehrer W. and Roehr M., *Regulatory aspects of bakers' yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures*. Biotechnology and Bioengineering, 1981. **23**: p. 567-581.
4. Biener R., Steinkämpe A., and Horn T., *Calorimetric control of the specific growth rate during fed-batch cultures of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology, 2012. **160**(3-4): p. 195-201.

5. Takors R., *Scale-up of microbial processes: impacts, tools and open questions*. Journal of Biotechnology, 2012. **160**(1-2): p. 3-9.
6. Díaz M., et al., *Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses*. Biochemical Engineering Journal, 2010. **48**(3): p. 385-407.
7. Lencastre Fernandes R., et al., *Experimental methods and modeling techniques for description of cell population heterogeneity*. Biotechnol Adv, 2011. **29**: p. 575 - 599.
8. Kantarci N., Borak F., and Ulgen K. O., *Review: Bubble column reactors*. Process Biochemistry, 2005. **40**(7): p. 2263-2283.
9. MacNaught A. D., *IUPAC compendium of chemical terminology*. 2000, Research Triangle Park: IUPAC.
10. Ogbonna J. C., Mashima H., and Tanaka H., *Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor*. Bioresource Technology, 2001. **76**(1): p. 1-8.
11. Roca E., et al., *Hydraulic model of a gas-lift bioreactor with flocculating yeast*. Bioprocess Engineering, 1995. **12**(5): p. 269-272.
12. Guillard F. and Trägårdh C., *Mixing in industrial Rushton turbine-agitated reactors under aerated conditions*. Chemical Engineering and Processing, 2003. **42**: p. 373-386.
13. Namdev P.K., Thompson B.G., and Gray M.R., *Effect of feed zone in fed-batch fermentations of Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 1992. **40**: p. 235-246.
14. Zlokarnik M., *Stirring*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
15. Mayr B., Horvat P., and Moser A., *Engineering approach to mixing quantification in bioreactors*. Bioprocess Engineering, 1992. **8**: p. 137-143.
16. Melton L. A., et al., *Dismt - Determination of mixing time through color changes*. Chemical Engineering Communications, 2002. **189**(3): p. 322-338.
17. Ju L. K. and Chase G. G., *Improved scale-up strategies of bioreactors*. Bioprocess Engineering, 1992. **8**(1-2): p. 49-53.
18. Jahoda M. and Machon V., *Homogenization of liquids in tanks stirred by multiple impellers*. Chemical Engineering Science, 1994. **17**: p. 95-101.
19. Sweere A.P.J., et al., *Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production: I. One-fermentor system*. Biotechnology and Bioengineering, 1988. **31**: p. 567-578.
20. Sweere A.P.J., Luyben K.C.A.M., and Kossen N.W.F., *Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors*. Enzyme and Microbial Technology, 1987. **9**: p. 386-398.
21. Manna L., *Comparison between physical and chemical methods for the measurement of mixing times*. Chemical Engineering Journal, 1997. **67**(3): p. 167-173.
22. Cabaret F., et al., *Mixing Time Analysis Using Colorimetric Methods and Image Processing*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2007. **46**(14): p. 5032-5042.
23. Fu C-C., Wu W-T., and Lu S-Y., *Performance of airlift bioreactors with net draft tube*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **33**: p. 332-342.
24. Woziwodzki S., *Unsteady Mixing Characteristics in a Vessel with Forward-Reverse Rotating Impeller*. Chemical Engineering & Technology, 2011. **34**(5): p. 767-774.
25. Tissot S., et al., *Determination of a scale-up factor from mixing time studies in orbitally shaken bioreactors*. Biochemical Engineering Journal, 2010. **52**(2-3): p. 181-186.
26. Hadjiev D., Sabiri N. E., and Zanati A., *Mixing time in bioreactors under aerated conditions*. Biochemical Engineering Journal, 2006. **27**(3): p. 323-330.
27. Delaplace G., Leuliet J. C., and Relandeau V., *Circulation and mixing times for helical ribbon impellers. Review and Experiments*. Experiments in Fluids, 2000. **28**(2): p. 170-182.

28. Fournier M. C., Falk L., and Villermaux J., *A new parallel competing reaction system for assessing micromixing efficiency—Experimental approach*. Chemical Engineering Science, 1996. **51**(22): p. 5053-5064.
29. Menisher T., Metghalchi M., and Gutoff E.B., *Mixing studies in bioreactors*. Bioprocess Engineering, 2000. **22**(2): p. 115-120.
30. Vallejos J. R., et al., *Optical analysis of liquid mixing in a minibioreactor*. Biotechnology and Bioengineering, 2006. **93**(5): p. 906-911.
31. Lejeune A., Delvigne F., and Thonart P., *Influence of bioreactor hydraulic characteristics on a Saccharomyces cerevisiae fed-batch culture: hydrodynamic modelling and scale-down investigations*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010. **37**(3): p. 225-236.
32. Lee K. C. and Yianneskis M., *A Liquid Crystal Thermographic Technique for the Measurement of Mixing Characteristics in Stirred Vessels*. Chemical Engineering Research and Design, 1997. **75**(8): p. 746-754.
33. Houcine I., et al., *Planar laser induced fluorescence technique for measurements of concentration fields in continuous stirred tank reactors*. Experimentals in Fluids, 1996. **22**: p. 95-102.
34. Arratia P. E. and Muzzio F. J., *Planar Laser-Induced Fluorescence Method for Analysis of Mixing in Laminar Flows*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2004. **43**(20): p. 6557-6568.
35. Kling K. and Mewes D., *Two-colour laser induced fluorescence for the quantification of micro- and macromixing in stirred vessels*. Chemical Engineering Science, 2004. **59**(7): p. 1523-1528.
36. Hu Y., et al., *Study on the reactive mixing process in an unbaffled stirred tank using planar laser-induced fluorescence (PLIF) technique*. Chemical Engineering Science, 2010. **65**(15): p. 4511-4518.
37. Delvigne F., et al., *Modelling of the substrate heterogeneities experienced by a limited microbial population in scale-down and in large-scale bioreactors*. Chemical Engineering Journal, 2006. **120**: p. 157-167.
38. Junker B.H., *Scale-up methodologies for E. coli and yeast fermentation processes*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004. **97**(6): p. 347-364.
39. Nienow A. W. and Flickinger M. C., *Scale-Up, Stirred Tank Reactors*, in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. 2009, John Wiley & Sons, Inc.
40. Howes T., Brannock M., and Corre G., *Development of simplified flow models from CFD simulations*, in *Third International Conference on CFD in the Minerals and Process Industries*, CSIRO, Editor. 2003: Melbourne, Australia. p. 575-580.
41. Zahradnik J., et al., *A network-of-zones analysis of mixing and mass transfer in three industrial bioreactors*. Chemical Engineering Science, 2001. **56**: p. 485-492.
42. Delvigne F., Destain J., and Thonart P., *Structured mixing model for stirred bioreactor: an extension to a stochastic approach*. Chemical Engineering Journal, 2005. **113**(1): p. 1-12.
43. Cui Y.Q., et al., *Compartment mixing model for stirred reactors with multiple impellers*. Trans IChemE, 1996. **74**(part A): p. 261-271.
44. Vrabel P., et al., *Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modeling and measurements*. Chemical Engineering Science, 2000. **55**: p. 5881-5896.
45. Mann R., et al., *Computational fluid mixing for stirred vessels: Progress from seeing to believing*. Chemical Engineering Science, 1995. **59**: p. 39-50.
46. Mann R., et al., *A network-of-zones analysis of the fundamentals of gas-liquid mixing in an industrial stirred bioreactor*. Récent progrès en génie des procédés, 1997. **11**: p. 223-230.
47. Delvigne F., E.M.T., Destain J., Deroisse J.M., Vandenbol M., Haubruge E., Thonart P., *Estimation of bioreactor efficiency through structured hydrodynamic modelling: case of study of a Pichia pastoris fed-batch process*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005. **121-124**: p. 653-671.
48. Delafosse A., et al., *Development of a compartment model based on CFD simulations for description of mixing in bioreactors*. Biotechnologie Agronomie Société Environnement, 2012. **14**(S2): p. 517-522.

49. Bezzo F., M.S., Pantelides C. C., *General hybrid multizonal/CFD approach for bioreactor modeling*. AIChE Journal, 2003. **49**(8): p. 2133-2148.
50. Monod J., *The growth of bacterial cultures*. Annual Review of Microbiology, 1949. **3**: p. 371-394.
51. Sonnleitner B. and Käppeli O., *Growth of Saccharomyces cerevisiae is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis*. Biotechnology and Bioengineering, 1986. **28**: p. 927-937.
52. Kompala D.S., et al., *Investigation of bacterial growth on mixed substrates: experimental evaluation of cybernetic models*. Biotechnology and Bioengineering, 1986. **28**: p. 1044-1055.
53. Di Serio M., Tesser R., and Santacesaria E., *A kinetic and mass transfer model to simulate the growth of baker's yeast in industrial bioreactors*. Chemical Engineering Journal, 2001. **82**: p. 347-354.
54. Jones K.D. and Kompala D.S., *Cybernetic model of the growth dynamics of Saccharomyces cerevisiae in batch and continuous cultures*. Journal of Biotechnology, 1999. **71**: p. 105-131.
55. Lei F., Rotboll M., and Jorgensen S.B., *A biochemically structured model for Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology, 2001. **88**: p. 205-221.
56. Berthiaux H., *Analysis of grinding process by Markov chain*. Chemical Engineering Science, 2000. **55**: p. 4117-4127.
57. Neubauer P. and Junne S., *Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses*. Current Opinion in Biotechnology, 2010. **21**(1): p. 114-121.
58. Neubauer P., Haggstrom L., and Enfors S.O., *Influence in substrate oscillations on acetate formation and growth yield in E. coli glucose limited fed-batch cultivations*. Biotechnology and Bioengineering, 1995. **47**: p. 139-146.
59. Delvigne F., et al., *Stochastic models to study the impact of mixing on a fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Progress, 2006. **22**(259-269).
60. Onyeaka H., Nienow A. W., and Hewitt C. J., *Further studies related to the scale-up of high cell density Escherichia coli fed-batch fermentations: the additional effect of a changing microenvironment when using aqueous ammonia to control pH*. Biotechnology and Bioengineering, 2003. **84**(4): p. 474-484.
61. Papagianni M., Matthey M., and Kristiansen B., *Design of a tubular loop bioreactor for scale-up and scale-down of fermentation processes*. Biotechnology Progress, 2003. **19**: p. 1408-1504.
62. George S., et al., *Comparison of the Baker's yeast performance in laboratory and production scale*. Bioprocess Engineering, 1998. **18**: p. 135-142.
63. Sweere A.P.J., Janse L., and Luyben K.C.A.M., *Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production: II. Two-fermentor system*. Biotechnology and Bioengineering, 1988. **31**: p. 579-586.
64. Oosterhuis N.M.G., et al., *Scale-down aspects of the gluconic acid fermentations*. Biotechnology Letters, 1983. **5**(3): p. 141-146.
65. Sandoval-Basurto E.A., et al., *Culture of Escherichia coli under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: Metabolic response and production of recombinant protein*. Biotechnology and Bioengineering, 2004. **89**(4): p. 453-463.
66. Boccazzi P., et al., *Differential Gene Expression Profiles and Real-Time Measurements of Growth Parameters in Saccharomyces cerevisiae Grown in Microliter-Scale Bioreactors Equipped with Internal Stirring*. Biotechnology Progress, 2006. **22**(3): p. 710-717.
67. Yale J. and Bohnert H. J., *Transcript Expression in Saccharomyces cerevisiae at High Salinity*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(19): p. 15996-16007.
68. Rep M., et al., *The Transcriptional Response of Saccharomyces cerevisiae to Osmotic Shock: Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycérol pathway-dependent genes*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(12): p. 8290-8300.
69. Erasmus D. J., van der Merwe G. K., and van Vuuren H. J. J., *Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of Saccharomyces cerevisiae to high sugar stress*. FEMS Yeast Research, 2003. **3**(4): p. 375-399.

70. Gasch A. P., et al., *Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes*. Mol. Biol. Cell, 2000. **11**(12): p. 4241-4257.
71. Walker G.M., *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1998: Wiley. 350.
72. McFarland L.V., *Systematic review and meta-analysis of Saccharomyces boulardii in adult patients*. World Journal of Gastroenterology, 2010. **16**(18): p. 2202-2222.
73. Fiechter A. and Seghezzi W., *Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells*. Journal of Biotechnology, 1992. **27**: p. 27-45.
74. Cannizzaro C. and Valentinotti S., *Control of yeast fed-batch process through regulation of extracellular ethanol concentration*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2004. **26**: p. 377-383.
75. Valentinotti S., et al., *Optimal operation of fed-batch fermentation via adaptive control of overflow metabolite*. Control Engineering Practise, 2002. **11**(6): p. 665-674.
76. Henes, B., Sonnleitner B., *Controlled fed-batch by tracking the maximal culture capacity*. Journal of Biotechnology, 2007. **132**: p. 118-126.
77. Valentinotti, S., Holmberg, U., Srinivasan, B., Cannizzaro, C., Rhiel, M., von Stockar, U., Bonvin, D., *Optimal operation of fed-batch fermentation via adaptive control of overflow metabolite*. Control Engineering Practise, 2003. **11**(6): p. 665-674.
78. Henes B. and Sonnleitner B., *Controlled fed-batch by tracking the maximal culture capacity*. Journal of Biotechnology, 2007. **132**(2): p. 118-126.
79. Lejeune, A., Delvigne, F., Thonart, P., *Influence of bioreactor hydraulic characteristics on a Saccharomyces cerevisiae fed-batch culture: hydrodynamic modelling and scale-down investigations*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010. **37**: p. 225-236.
80. Valentinotti S., et al., *Optimal operation of fed-batch fermentations via adaptive control of overflow metabolite*. Control Engineering Practice, 2003. **11**(6): p. 665-674.
81. Ramon R., et al., *Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of Pichia pastoris*. Biotechnology Letters, 2004. **18**: p. 1447-1452.
82. Whiffin V. S., Cooney M. J., and Cord-Ruwisch R., *Online detection of feed demand in high cell density culture of Escherichia coli by measurement of changes in dissolved oxygen transients in complex media*. Biotechnology and Bioengineering, 2004. **85**(4): p. 422-433.
83. Johnson M. J., Borkowski J., and Engblom C., *Steam sterilizable probes for dissolved oxygen measurement*. Biotechnology and Bioengineering, 1964. **6**(4): p. 457-468.
84. Bambot S. B., et al., *Phase fluorometric sterilizable optical oxygen sensor*. Biotechnology and Bioengineering, 1994. **43**(11): p. 1139-1145.
85. Kroneis H. W. and Marsoner H. J., *A fluorescence-based sterilizable oxygen probe for use in bioreactors*. Sensors and Actuators, 1983. **4**(0): p. 587-592.
86. Jin P., et al., *A NIR luminescent copolymer based on platinum porphyrin as high permeable dissolved oxygen sensor for microbioreactors*. AIChE Journal, 2013. **In Press**.
87. Mishima K., et al., *On-line monitoring of cell concentrations by dielectric measurements*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991. **72**(4): p. 291-295.
88. Bryant D. N., et al., *Modelling real-time simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic biomass and organic acid accumulation using dielectric spectroscopy*. Bioresource Technology, 2011. **102**(20): p. 9675-9682.
89. Palmer S. M. and Kunji E. R. S., *Online Monitoring of Biomass Accumulation in Recombinant Yeast Cultures*, in *Recombinant Protein Production in Yeast*, R.M. Bill, Editor. 2012, Humana Press. p. 165-179.
90. Konstantinov K., et al., *Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures*. Trends in Biotechnology, 1994. **12**(8): p. 324-333.
91. Carvell J. P., et al., *On-line Monitoring of the Live Cell Concentration in Disposable Bioreactors*, in *Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT)*,

- Dublin, Ireland, June 7-10, 2009, N. Jenkins, N. Barron, and P. Alves, Editors. 2012, Springer Netherlands. p. 315-318.
92. Suhr H., et al., *In situ microscopy for on-line characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration measurements by depth from focus*. Biotechnology and Bioengineering, 1995. **47**(1): p. 106-116.
 93. Spilimbergo S., et al., *High-pressure CO₂ inactivation and induced damage on *Saccharomyces cerevisiae* evaluated by flow cytometry*. Process Biochemistry, 2010. **45**(5): p. 647-654.
 94. Nebe-von-Caron G., et al., *Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting*. Journal of Microbiological Methods, 2000. **42**(1): p. 97-114.
 95. Joux F. and Lebaron P., *Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level*. Microbes and Infection, 2000. **2**(12): p. 1523-1535.
 96. Hewitt C. J. and Nebe-Von-Caron G., *An industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations*. Cytometry, 2001. **44**(3): p. 179-187.
 97. Breeuwer P., et al., *Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(4): p. 1614-9.
 98. Henry-Stanley M.J., G.R.M., Wells C.L., *Adaptation of *FUN-1* and calcofluor white strains to assess the ability of viable and nonviable yeast to adhere to and be internalized by culture mammalian cells*. Journal of Microbiological Methods, 2004. **59**: p. 289-292.
 99. Broger T., et al., *Real-time on-line flow cytometry for bioprocess monitoring*. Journal of Biotechnology, 2011. **154**(4): p. 240-247.
 100. Zaslaver A., et al., *A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli**. Nat Meth, 2006. **3**(8): p. 623-628.
 101. Huh W-K., et al., *Global analysis of protein localization in budding yeast*. Nature, 2003. **425**: p. 686-691.
 102. Lejeune A., Delvigne F., and Thonart P., *Physiological response of yeast to process perturbations: A mini-bioreactor approach*. Cerevisia, 2013. **38**(1): p. 15-19.
 103. Lejeune A., Delvigne F., and Thonart P., *Physiological response of yeast to process perturbations : a mini bioreactor approach*. New Biotechnology, 2009. **255**: p. s235-s236.
 104. Carlquist M., et al., *Physiological heterogeneities in microbial populations and implications for physical stress tolerance*. Microbial Cell Factories, 2012. **11**(1): p. 94.
 105. Davey H. M. and Hexley P., *Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide*. Environmental Microbiology, 2011. **13**(1): p. 163-171.

CHAPITRE 3 : MISE EN ŒUVRE D'UN RÉACTEUR FACILITANT L'EXTRAPOLATION DES BIOPROCÉDÉS : APPROCHE *SCALE- DOWN*

Extrait de :

Lejeune A., Delvigne F., Thonart P., 2010, *Influence of bioreactor hydraulic characteristics on a Saccharomyces cerevisiae fed-batch culture: hydrodynamic modelling and scale-down investigations*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, **37**, 225-236

3.1. ABSTRACT

Yeast is a widely used microorganism at the industrial level because of its biomass and metabolite production capabilities. However, due to its sensitivity to the glucose effect, problems occur during scale-up to the industrial scale. In large-scale bioreactors, hydrodynamic conditions are not ideal and glucose concentration gradients can arise when operating in fed-batch mode. In this study, the effects of such gradients were studied in scale-down reactors. These reactors are composed of a mixed part linked to a non-mixed part by a recirculation pump in order to mimic the hydrodynamic conditions encountered at the large scale. During fermentation tests in scale-down reactor, the following observations were made: drop of biomass yield (ratio between the biomass produced and the glucose added) and trehalose production and increase of fermentation time (time between inoculation and beginning of stationary phase) and ethanol production. A stochastic model has been developed and permits to explain that these effects were induced mainly by the hydrodynamic conditions. The model presented allows the representation of both the microorganisms circulation and fluid mixing in a stirred bioreactor. These two phenomena were superimposed in order to obtain the concentration profiles experienced by the microorganisms. The effects observed from the scale-down reactors were set in relation to different parameters calculated from the simulation results.

3.2. INTRODUCTION

The production of microorganisms is a difficult task to realize as it takes into account a living material and its interaction with the environmental conditions. Mixing operations are necessary in this production because the agitation permits an optimal growth of the microorganism though different phenomena such as heat transfer, gas circulation, homogenization,... [1]. The large-scale production is an essential stage of the development of a bioprocess but the increase in volume induces limiting phenomena. One of the consequences is the appearance of heterogeneous zones in the reactor, mainly concentration gradient in pH, substrate or oxygen. The presence of these gradients in the reactor forces the microorganism to adapt and change its metabolic pathways in accordance with extracellular concentration fluctuations [2, 3]. These perturbations cause different effects, called scale-up effect, such as, biomass yield (ratio between the biomass produced and the glucose added) drop, increase in fermentation time (time between inoculation and beginning of stationary phase) and in ethanol production or loss of viability [4]. In order to better understand these phenomena, the scale-down principle is often used. Scale-down reactors have been described in the literature as a tool allowing the study of the consequences of poor mixing conditions on the growth of microorganisms. It allows to reproduce the hydrodynamic conditions of industrial reactors [5] and to show the effects of the increase in volume at a laboratory scale [6-8]. Such reactors are generally composed of a mixed part linked to a non-mixed part by a recirculation pump [9, 10]. The geometry of the non-mixed part depends on the limiting

phenomenon to be studied [11]. These reactors have already been tested with different microorganisms and permit to study a wide range of effects of poor mixing efficiency. They have been used to simulate the effects of oxygen and dextrose concentration gradients [11-17] on the culture of different microorganisms. The effect of dextrose concentration gradients [18, 19] and of dissolved oxygen gradient [20-22], or both [23], have been studied thanks to scale-down reactors of different configurations. Scale-down principle can be used in parallel with numerical analysis in order to enhance the characterization of the hydrodynamics.

Structured hydrodynamic model is able to simulate the mixing phenomena in bioprocess with a good resolution [24-26]. In this model, the reactor is divided into a set of interconnected compartments, considered to be perfectly mixed and linked by flow (mass, heat...). The simplest model that has been described is composed of one compartment by agitation stage [27, 28]. The network-of-zones analysis is a more complex model in which a high number of compartments is taken into account [29, 30]. The original version of this model has been extended to simulations of bubbles size distribution, gas – liquid transfers, kinetics of bioreactors and multi-agitated systems [25]. The structured model can be developed according to two approaches: deterministic or stochastic. The deterministic method is based on the consideration of differential equations that define the flows between the compartments. The stochastic approach allows the inclusion of the probabilistic nature of the mixing process and allows to trace the circulation of particles in the reactor [31]. The advantage of such a model is the representation of the circulation of microorganisms and the fluid mixing using the same structure [32]. Our study is focused on the production of *Saccharomyces cerevisiae* (*boulardii*) which is widespread at the industrial level because of its capability of producing biomass and metabolites [33]. In previous works, hydrodynamic model has been designed to characterize the dextrose gradient and microbial cells circulation in large-scale bioreactors. On this basis, three scale-down bioreactors geometries has been proposed to reproduce gradient stress experiments at laboratory scale. It has been shown that the geometry of the plug-flow part of the scale-down reactor is relevant for the stress induction [34]. Different parameters have been followed during the culture of *Saccharomyces cerevisiae* in scale-down reactor (biomass, ethanol or trehalose concentrations) to estimate the impact of this stress. The second part of this study concerns the characterization of the hydrodynamic conditions of these reactors. A stochastic model of these conditions is described in the last part.

3.3. MATERIAL AND METHODS

3.3.1. CULTURE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN SCALE-DOWN REACTORS (SDR)

Saccharomyces cerevisiae (MUCL 43340), stored at -80°C before use, was inoculated in a 500 ml preculture (dextrose (20 g/l), peptone casein (10 g/l), yeast extract (10 g/l)) and incubated at 30°C during 12H under orbital agitation. The culture medium was composed of dextrose (5 g/l), peptone casein (10 g/l) and yeast extract (10 g/l). The scale-down reactor was composed of a 20 liters stirred bioreactors (Biolafitte-France) with two turbines TD4-TD4. The regulation of temperature (30°C), pH (5.5) and dissolved oxygen was ensured by using a direct control system (ABB). Dissolved oxygen level was maintained above 30% saturation by the stirrer speed. Aeration was fixed at 1 vvm. The stirred reactor was connected by a peristaltic pump (Watson Marlow 325D) to the appropriate non-mixed part, characterized as follow (Figure 3.1):

- SDR type A, glass bulb: diameter = 85 mm, length = 0.25 m, capacity = 1 l
- SDR type B, pipe: internal diameter = 8 mm, external diameter = 12 mm, length = 7.5 m, capacity = 0.377 l
- SDR type C, pipe: internal diameter = 15 mm, external diameter = 21 mm, length = 5 m, capacity = 0.884 l

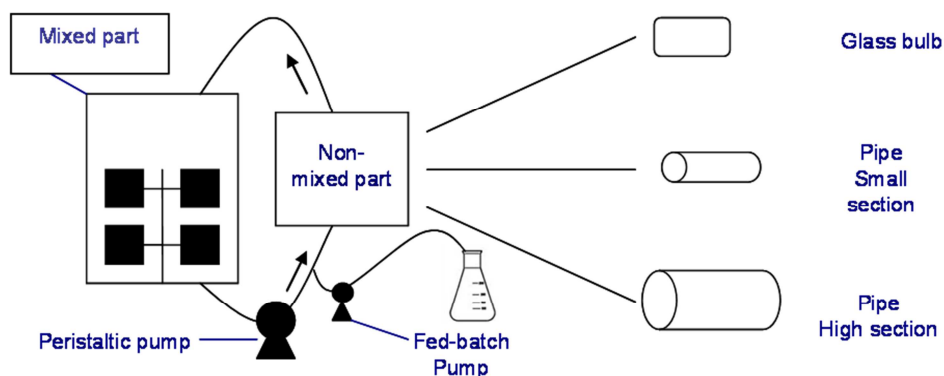


Figure 3.1: Description of the scale-down reactors tested

The fed-batch mode was used in all fermentation tests. The dextrose solution was introduced in the non-mixed part. The feeding strategy adopted during each fermentation test was:

- 5 h of culture in batch mode

- Then 12 h of exponential fed-batch mode, the addition of dextrose was controlled by this equation:

$$F = F_0 * e^{(\mu_{\max} * t)} \quad (1)$$

where F : feed flow rate (ml min^{-1}), F_0 : initial feed flow rate (ml min^{-1}), μ_{\max} : maximum specific growth rate of the microorganism (min^{-1}) and t : culture time (min).

The parameters μ_{\max} (0.005 min^{-1}) and F_0 ($0.0058 \text{ ml min}^{-1}$) were previously calculated from growth data of *Saccharomyces cerevisiae* in batch reactor (data not shown).

After the exponential fed-batch mode, the feeding was fixed at $Q_{\text{cst}}=3.5 \text{ ml min}^{-1}$ until the end of the fermentation, i.e. when the dissolved oxygen goes back over 30%.

3.3.2. FERMENTATION FOLLOW-UP

During the fermentation tests, samples were withdrawn at the level of the mixed part of the reactor. Different measurements were carried out on these samples.

The microbial growth of *Saccharomyces cerevisiae* (*boulardii*) was evaluated by optical density measurement ($\lambda=540 \text{ nm}$, spectrophotometer GENESYS 2). Biomass concentration has been determined by the correlation between optical density and dry matter.

The dextrose concentration was determined by enzymatic method (YSI model 2700 Select).

The ethanol concentration measurement was realized by an enzymatic kit (Boehringer Mannheim, Enzymatic BioAnalysis).

The measurement of the intracellular trehalose concentration was also performed. Trehalose was extracted from the cells after washing samples with water three times. Then the pellet was resuspended in 5 ml of distilled water. Sample tubes were then left 5 minutes in a boiling water bath. After centrifugation, the supernatant was recovered and analyzed by High Performance Anion Exchange Chromatography coupled with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD) on a Dionex DX500 chromatographic system operating at 1 ml/min. The volume of injected samples was 25 μl . The stationary phase consisted of a CarboPac PA 100 column (250 X 4 mm) with a pre-column PA 100 (50 X 4 mm) (DIONEX Corp, Sunnyvale, USA). The mobile phase consisted of sodium hydroxide (160 mM) and elution was performed in isocratic mode, followed by a linear gradient with a solution containing both sodium

hydroxide (160 mM) and sodium acetate (500 mM). The gradient was completed by washing with sodium hydroxide 500 mM [35, 36].

3.3.3. MIXING TIME MEASUREMENT

The mixing time was estimated using a conductrimetric method. A saline solution (NaCl saturated) was added at the top of the non-mixed part. The conductivity probe was positioned in the mixed part. Relative conductivity (%) was calculated from the conductivity curve. The mixing time was defined as the duration between the injection of the saline solution and the moment when the relative conductivity reached a value of 85% [37].

3.3.4. HYDRODYNAMIC MODELLING

In order to understand better the phenomena which take place in the reactor during the fermentation, a structured model was developed. The reactor volume was divided into compartments, called “states”, considered as perfectly mixed. A stochastic approach was chosen. It describes the mixing phenomenon in term of probabilities. The mixed part of the scale-down reactor was divided into 64 states (8 plans, divided into 8 states). Each state is linked to their neighbors by probabilities. The number of states in the non-mixed part depends on the type of scale-down device used (see the “results and discussion” section).

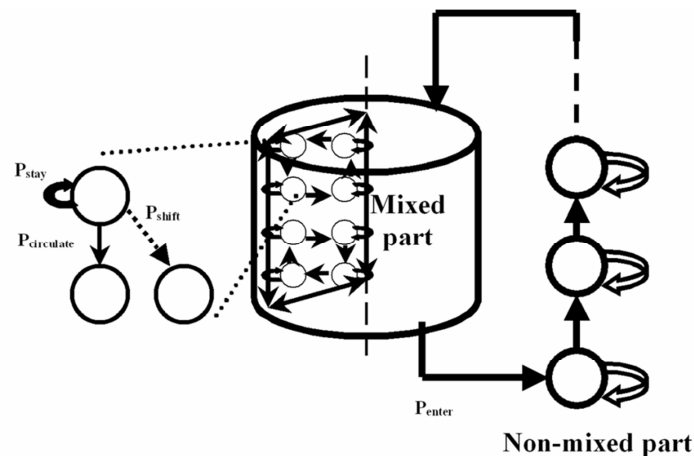


Figure 3.2: Structure of the compartment model used to run stochastic simulations. In the case of the SDR type A, the non-mixed part comprises 3 compartments.

As presented in figure 3.2, three types of probabilities governed mixing in the mixed part: the probability of staying in the present state (P_{stay}), the probability of entering into the circulation flow ($P_{circulate}$) and the probability of diverging from this flow and shifting into another plan (P_{shift}). In the non-mixed part, only the probabilities of staying in the present state or leaving

this state and passing into the next state were considered. The passage between the mixed and the non-mixed part is defined by P_{enter} .

The aim of this model was to simulate the dextrose concentration encountered by the microorganisms in the reactor during a fermentation test. As these data are difficult to obtain, two sub-models were considered and described in the following sections.

3.3.4.1. SUB-MODEL 1: FLUID MIXING

The dextrose concentration gradient that appears in the reactor during the fermentation can be modelled by a Markov chain [34], which is defined as the multiplication of a transition matrix (T) and a state vector (S). The transition matrix is formed by the probabilities presented in the figure 2 and proportional to the different flows present in the reactor. The probability of staying in the circulation flow of the mixed part ($P_{\text{circulate}}$) can be determined from the calculation of the circulation flow rate:

$$Q_c = N_{qc} * N * d^3 \quad (3)$$

$$P_{\text{circulate}} = \frac{Q_c}{V_{\text{comp}}} * \Delta t \quad (4)$$

where Q_c : circulation flow (m^3/s), N_{qc} : pumping number, N : impeller speed (1/s), d : impeller diameter (m), V_{comp} : compartment volume (m^3) and Δt : time step chosen to run the simulation (in our case, $\Delta t=1$ s).

The probability of leaving this loop, diagonally or from one plan to another, is:

$$P_{\text{shift}} = 1 - P_{\text{circulate}} \quad (5)$$

The probability of remaining within the present stage is calculated using the same formula.

The state vector includes the concentration of tracer in the different states considered by the model. The result of this multiplication is the state vector describing the concentrations in each state at the next time interval:

$$S_i = T * S_{i-1} \text{ or } S_i = T^i * S_0 \quad (6)$$

where S : state vector at the considered time and T : transition matrix.

Successive multiplications lead to an understanding of the evolution of the dextrose concentration gradient in the reactor.

In order to calculate accurately the dextrose concentration gradient, the intermittent behavior of the pump must be considered [32]. So, a pulse matrix was used to represent the discontinuous behavior of the pump, in which the number of columns corresponded to the number of transitions and the number of rows to the number of states. The pulse was carried out at the level of the first state of the model, i.e. at the level of the non-mixed part, where the dextrose solution is added during the fermentation tests.

The Markov chain was modified to introduce the S_{pulse} matrix:

$$S_i = T * S_{i-1} + S_{pulse} \quad (7)$$

The concentrations obtained after the application of this model were normalized i.e. brought back to between 0 and 1, which permitted to compare the different profiles obtained.

3.3.4.2. SUB-MODEL 2: CIRCULATION OF PARTICLES

A stochastic model of “random number” type was used. The displacement of a particle was calculated by comparing a number to the value of the transition probability in order to determine if the cell stays in the present state or switches to the next state.

The structure of the transition matrix was the same as the one presented for the fluid mixing sub-model, and was not developed in the present paper.

3.3.4.3. SUPERIMPOSITION OF THE TWO SUB-MODELS

The two sub-models were superimposed in order to obtain the dextrose concentration profile encountered by the microorganism during a fermentation test. The profiles form frequency distributions, which allowed the determination of the history of the gradient encountered by the microorganisms. Each bar of the histogram represents the number of microorganisms that have been, on average, subjected to the range of concentrations corresponding to the class.

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1. FERMENTATION TESTS IN SCALE-DOWN REACTOR

The aim of this section is to show the impact of the use of a scale-down reactor to produce *Saccharomyces cerevisiae*. The parameters that will be discussed are biomass, ethanol and trehalose concentration. For each test, the biomass yield was calculated (ratio between the amount of biomass obtained at the end of the fermentation and the amount of substrate (dextrose) involved in the same fermentation).

Tests carried out in the different scale-down configurations have been compared on the basis of a reference reactor, i.e. a well-mixed bioreactor ($t_m = 5s$), without recirculation part. The dextrose solution was added at the top of the stirred vessel. The biomass yield obtained in these conditions reached 47.9%. The ideal yield for a yeast fermentation under fully aerobic conditions is 50% [6, 38]. A production of ethanol is detected during the culture. This is probably due to the limiting oxygen concentration in the medium (data not shown). Indeed, small scale reactor used as a reference is not to be considered as perfectly mixed, but as nearly perfectly mixed, or well mixed. Tracer experiments have been carried out and a mixing time of about 5 seconds has been found, which is very low compared with mixing time values found for scale-down reactors.

In all scale-down tests, the final biomass concentration is lower than for the reference reactor (figure 3.3). The greatest reduction was obtained with the scale-down reactor type B with a recirculation flow rate (Q_r) of 39 l/h. The difference between the reference reactor and the scale-down tests appeared after approximately 20 hours of culture when the dextrose solution was added at a constant rate. At this time, the dextrose content in the reactor is close to 0 g/l (data not shown). So these differences can't be explained by a difference in a dextrose consumption rate.

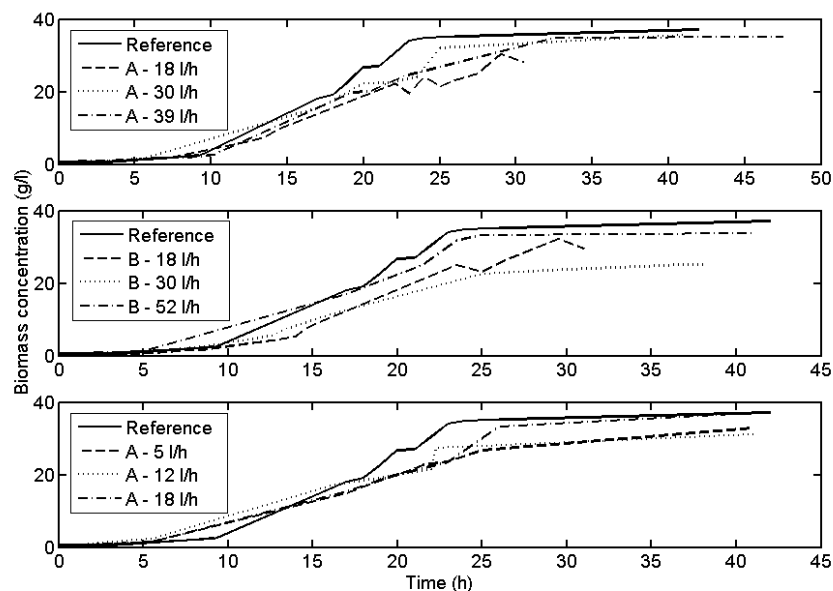


Figure 3.3: Evolution of biomass concentration for the three types of scale-down reactor. The reference reactor is represented by the solid line. A) Scale-down reactors type A, with $Q_r=18$ l/h, 30 l/h and 39 l/h; B) Scale-down reactors type B, with $Q_r=18$ l/h, 39 l/h and 52 l/h; C) Scale-down reactors type C, with $Q_r=5$ l/h, 12 l/h and 18 l/h.

Saccharomyces cerevisiae is a Crabtree positive microorganism. So when the cells are submitted to high dextrose concentration, they produce ethanol [39]. This production can cause the biomass yield to fall to 39% [6], whereas ideal yield is 50%. In the scale-down reactors, the ethanol concentration reached during the test is greater than in the reference reactor (figure 3.4). This is due to the fact that cells experienced high dextrose concentrations in the non-mixed part and they switched their metabolism to the fermentative process and produced ethanol. Scale-down reactors types B and C were shown to be systems in which cells produce more ethanol than SDR type A, type C showing the highest concentration with $Q_r=18$ l/h.

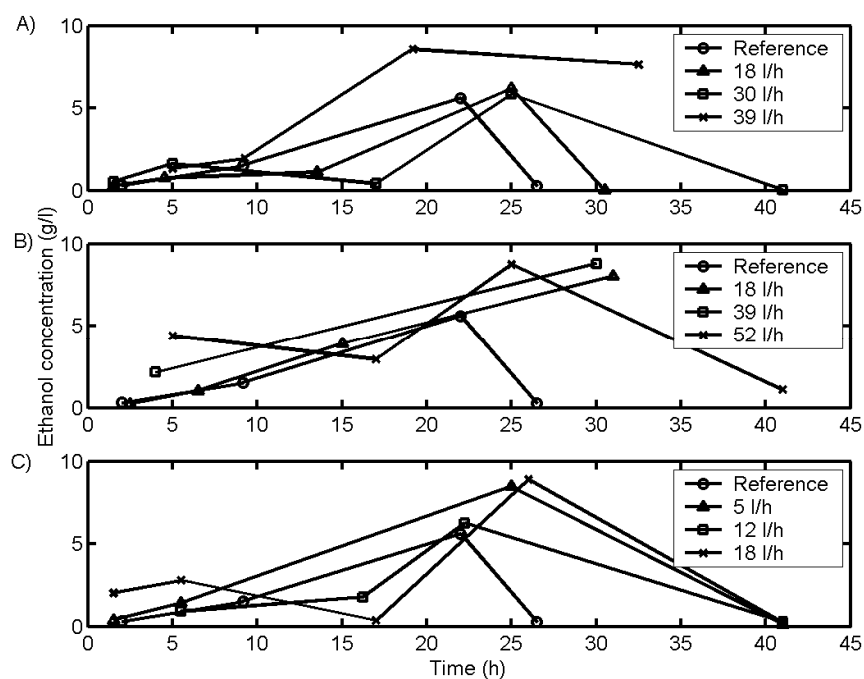


Figure 3.4: Evolution of ethanol concentration for the different fermentation tests realized. A) Scale-down reactors type A, with $Q_r=18$ l/h, 30 l/h and 39 l/h; B) Scale-down reactors type B, with $Q_r=18$ l/h, 39 l/h and 52 l/h; C) Scale-down reactors type C, with $Q_r=5$ l/h, 12 l/h and 18 l/h.

Trehalose is a reserve carbohydrate used by yeast cells to survive during nutrient limitation or starvation. But it is also a cryoprotectant that permits to protect plasma membrane during freeze-drying for example. A high trehalose content of the cells is linked to a high capacity to resist to conservation treatments. The results presented showed that the final trehalose content is influenced by the use of scale-down reactor (figure 3.5).

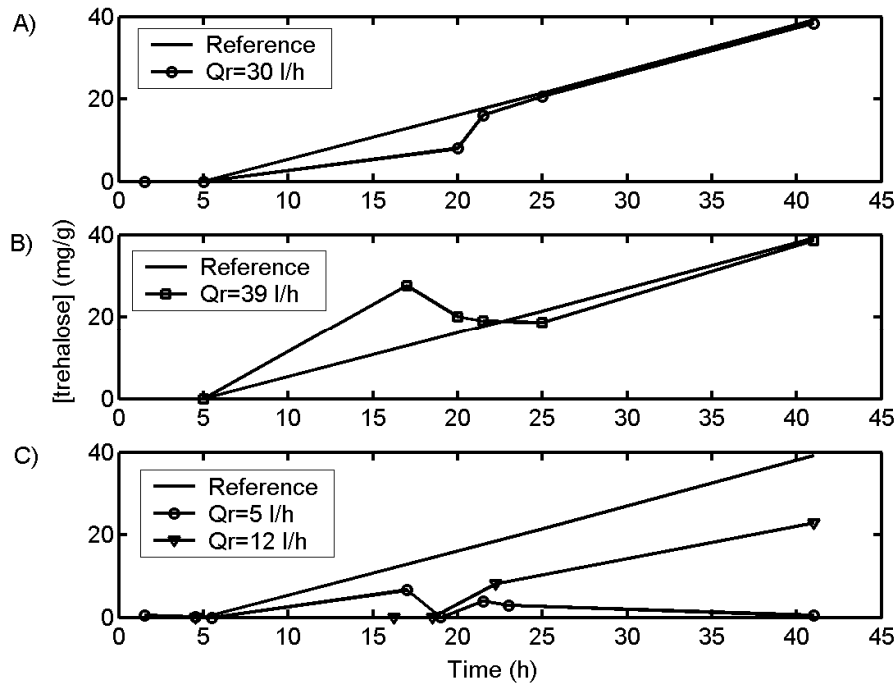


Figure 3.5: Evolution of trehalose concentration for the different fermentation tests realized. A) Scale-down reactor type A, with $Q_r=30$ l/h; B) Scale-down reactor type B, with $Q_r=52$ l/h; C) Scale-down reactor type C, with $Q_r=5$ l/h and D) Scale-down reactor type C, with $Q_r=12$ l/h.

The final trehalose concentration is higher for the reference reactor than for the scale-down reactor type C. There is also an influence of the recirculation flow. When it increases, the trehalose content increases too and approaches the content of the reference reactor. However trehalose production is connected with nutrient starvation so we should observe an increase in the final trehalose concentration when the recirculation flow increases. We explain the difference by the continually changing conditions presents in the scale-down reactor which perturbs the metabolism of cells. Trehalose is synthesized by cells when nutrient conditions are favourable. This sugar can be reassimilated when nutrient starvation occurs. In our scale-down reactor, since glucose is added at the level of the non-mixed part, starvation tends to occur at the level of the mixed part. This last part represents about 90% of the reacting volume and the starvation effect is thus very important. Trehalose reassimilation is thus expected to occur when residence time at the level of the non-mixed part is higher.

The biomass yield was calculated for each scale-down reactor and represented as a function of the recirculation flow rate (figure 3.6). The values of the reference reactor are indicated by the broken line in order to provide a basis of comparison with the results of the scale-down tests. The biomass yield of the reference is superior to the scale-down reactor, with the greatest difference being observed for the SDR-type B with $Q_r=39$ l/h. Biomass yield depends on the

recirculation flow rate, as were almost all the parameters presented up to this point. The yields increase with the recirculation flow rates. Three tests showed a yield close to that of the reference reactor (SDR-type A with $Q_r = 30$ and 39 l/h and SDR-type C with $Q_r = 18$ l/h).

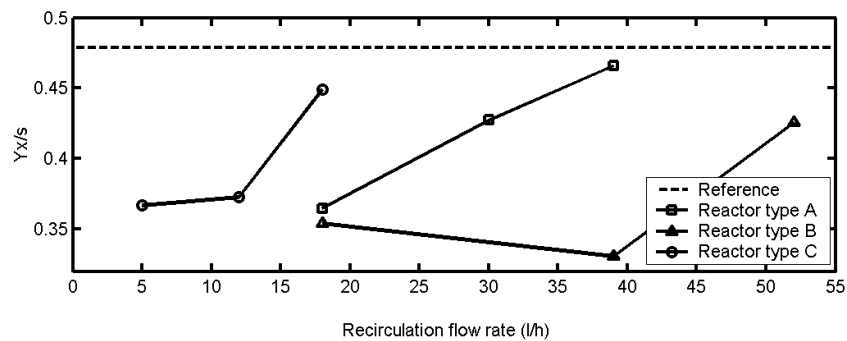


Figure 3.6: Comparison of the biomass yield between the scale-down reactors tested.

These different parameters showed that the use of a scale-down reactor permits to mimic the scale-up effects observed in a large-scale bioreactor. Indeed, these effects induce an increase of by-products (ethanol) excretion and a reduction at the level of biomass concentration, biomass yield and final trehalose concentration. Similar observations have been made in the case of the fed-batch culture of *E. coli* in large-scale bioreactor (20 m^3) and different scale-down reactors [2, 23]. In order to understand these effects, different hypotheses can be formulated. The first assumption is the appearance of fluctuation in temperature, in pH or in dissolved oxygen in the non-mixed part but some measurements showed that it was not the main explication [40]. So our working hypothesis becomes: the yield drop is due to the passage of microorganisms into the non-mixed part, in which the dextrose concentration is submitted to high fluctuations. Thus, microorganisms have to adapt their metabolism and their enzymatic systems to these continually changing conditions [41]. Even if the key stages of the metabolism can respond to fluctuations in substrate within less than one minute [9], these continuous changes slow down the normal growth of yeast. These adaptation phenomena cause a lack of efficiency in biomass production and thus a reduction in yield.

3.4.2. MIXING EFFICIENCY OF SCALE-DOWN REACTORS

All the tests realized in scale-down reactor showed a reduction of the biomass yield but all the tests did not give the same reduction. The hydrodynamic characterization is essential to explain the difference observed. Mixing time calculation can give information about the mixing efficiency in a reactor. It has been measured for each fermentation test realized in scale-down reactor.

The evolution of the relative conductivity in the mixed part was different for each type of scale-down reactor (figure 3.7). In the case of types A and C, the mixing phenomenon presents two steps in homogenization: the saline solution is dispersed in the non-mixed part and then it seeps gradually into the mixed part. The curve increase slowly as the tracer comes through gradually into the mixed part. The curve profiles are completely different for SDR type B. This type is governed by a plug-flow section. There is low fluid dispersion in the non-mixed part and the perturbation caused by the addition of saline solution is propagated in one pulse into the mixed part. It explains the quasi instantaneous increase in relative conductivity. Increase in diameter of the non-mixed part involved a decrease in plug-flow section effect, which gave way to dispersion in the scale-down reactor of types C and A.

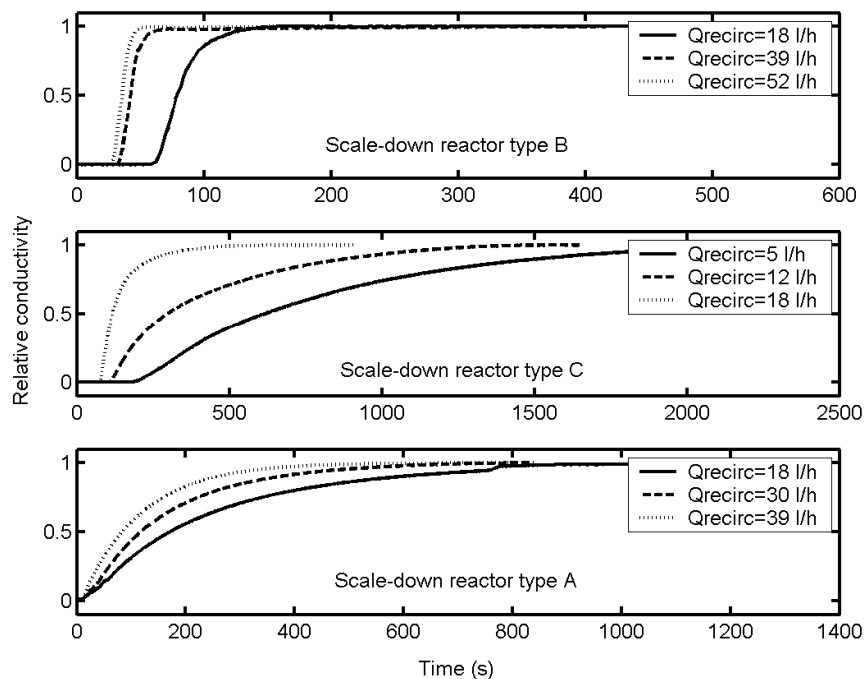


Figure 3.7: Variation of relative conductivity when a pulse of saline solution is injected into the non-mixed part of the reactor. A) Scale-down reactors type A, with $Q_r=18$ l/h (full line), 30 l/h (dashed line) and 39 l/h (dotted line); B) Scale-down reactors type B, with $Q_r=18$ l/h (full line), 39 l/h (dashed line) and 52 l/h (dotted line); C) Scale-down reactors type C, with $Q_r=5$ l/h (full line), 12 l/h (dashed line) and 18 l/h (dotted line)

The mixing time was calculated for each test (tableau 3.1). They are different for each type of scale-down reactors. SDR type B gives the shortest mixing times. The system that gives the worst mixing efficiency, at the particular recirculation flow rate tested, is the type C. This is partially due to the increase in volume of the non-mixed part and to the multiplication of the possible ways followed by the tracer before it reaches the detector. Moreover the recirculation flow rates tested are very low in comparison with the two other types. SDR type A, the system

in which the dispersion phenomenon is the strongest, gives longer mixing times in comparison with SDR type B.

The last observation that can be made is that the yield in biomass depends on the mixing time (Figure 3.8).

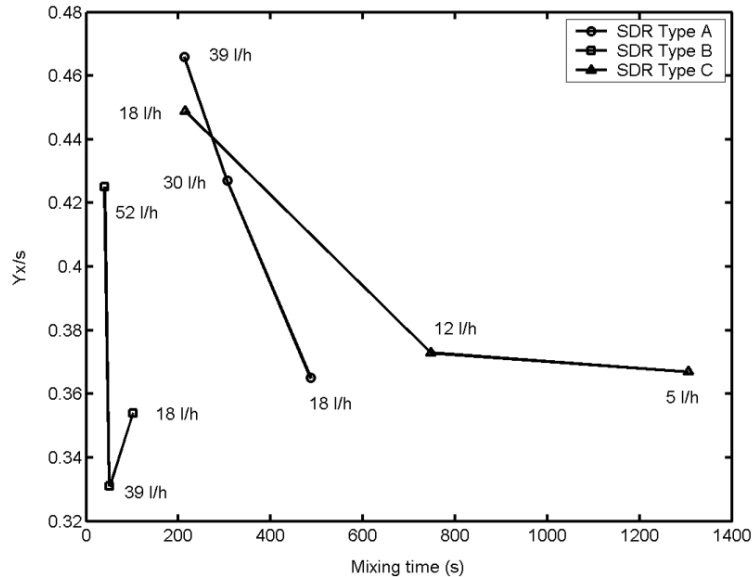


Figure 3.8: Relationship between mixing time and biomass yield

Yield decreases when the mixing time increases. The highest yield drop appears for scale-down reactor of type B. This is surprising because it leads to the shortest mixing time and so to the best mixing efficiency. One explanation can be formulated. In this type of reactor, the non-mixed part consists of a pipe with a small section. So when a cell arrives in the pipe at the same time as a dextrose pulse, the cell is submitted to high dextrose concentrations as long as it is in the pipe. The cell has to change its metabolic pathways and adapts itself to the new conditions. The “Hydrodynamic modelling” section will give others explanations.

3.4.3. HYDRODYNAMIC MODELLING OF SCALE-DOWN REACTORS

The differences observed between the three types of scale-down reactor appeared after 15 hours of culture, i.e. when the feed solution was added at a constant flow. So the simulation takes place when the pump adds dextrose every 5 seconds into the systems. The exposure time to the pulse is 1000 seconds and the number of cells is 3500. It is clear that these values are far from the reality but it still allows us to attain a good idea of the hydrodynamic conditions in the reactors. These considerations have been discussed by Delvigne *et al.* [42].

The number of states considered in the model is different for each non-mixed part to make the differentiation between the different hydrodynamic conditions observed with the conductimetric tests. The probability of passing in the non-mixed part from one state to another was defined as:

$$P_{plug} = \frac{Q_R}{V_{comp}} \quad (8)$$

where P_{plug} : the probability of passing from state i to state $i+1$, Q_r : recirculation flow rate (l/h) and V_{comp} : state volume (l).

Plug flow was predominant for types B and C. So the non-mixed part was modelled using a high number of compartments placed in series in order to mimic the progression of a tracer in the pipe, as observed in tracer tests. The plug flow effect decreased from SDR type B to C and then type A is governed by dispersion. So the number of cells is 15 in the case of SDR type B, 10 for type C and 3 for type A.

All the microbial cells were present in the first state of the non-mixed part at the initial time. The frequency distributions obtained from the model permit us to appreciate the appearance of the dextrose concentration gradient in the reactor. Different parameters will be discussed to better understand the yield drop observed in the scale-down tests.

The frequency distributions show different profiles depending on the type of scale-down reactor (figure 3.9, 3.10 and 3.11).

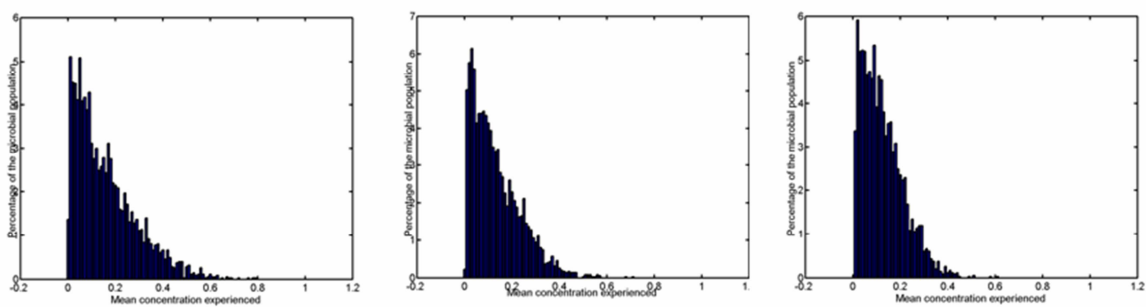


Figure 3.9: Frequency distributions for scale-down reactors type A, a) $Q_r = 18$ l/h, b) $Q_r = 30$ l/h and c) $Q_r = 39$ l/h

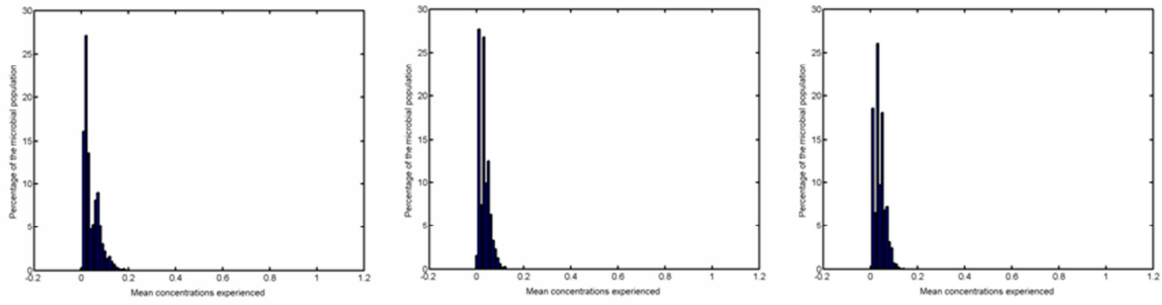


Figure 3.10: Frequency distributions for scale-down reactors type B, a) $Q_r = 18$ l/h, b) $Q_r = 39$ l/h and c) $Q_r = 52$ l/h

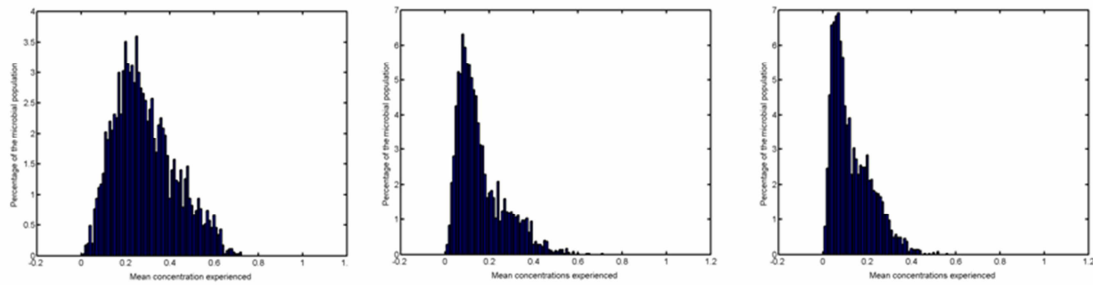


Figure 3.11: Frequency distributions for scale-down reactors type A, a) $Q_r = 5$ l/h, b) $Q_r = 12$ l/h and c) $Q_r = 18$ l/h

The distributions of SDR type A (Figure 3.9) show profiles that decrease regularly. The distributions of SDR type B (Figure 3.10) show that the cells are here particularly exposed to small relative concentrations of dextrose. For the distributions of SDR type C (Figure 3.11), there are a large number of cells that encountered small relative concentrations in dextrose but also cells that were submitted to high relative concentrations. The recirculation flow rate is an important parameter of the model. The distribution seems to be much more gathered for high recirculation flows than for the low recirculation flows. So a higher number of cells are exposed to high dextrose concentrations if a low recirculation flow is used.

The profiles of the distributions of SDR type A and C are similar. This agrees with the results obtained for mixing time tests which show that the homogenization of the tracer in these two types of scale-down reactor is dispersion. However, the distributions of SDR type C seem to be divided into two parts. For the small relative concentrations in dextrose, the profiles resemble the profiles of SDR type B and when the relative concentrations increase, the profiles become closer to SDR type A. This corroborates the results of the mixing time tests.

The scale-down reactors of type B show the shortest mixing times. The profiles of the relative concentrations encountered by cells show that the majority of cells are confronted with small relative concentrations. However, this type of scale-down reactor shows the highest

diminution of biomass yield. An explanation can be advanced to understand the difference in biomass yield by the consideration of different parameters.

First, it is possible to count the number of cells that have been exposed to relative concentrations higher than a critical relative concentration. The critical relative concentration chosen was 0.5. The number of cells is expressed relatively compared to the total number of cells in the population (3500) (expressed in %) (tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Synthesis of the different parameters characterising the hydrodynamic conditions of scale-down reactors

Reactor type	Recirculation flow rate (l/h)	$Y_{X/S}$	Mixing time (s)	Relative number of stressed cells (%)	Fluctuation magnitudes in dextrose relative concentration
A	18	0.352	487	2.09	0.06
	30	0.451	306	0.54	0.1
	39	0.457	213	0.14	0.13
B	30	0.354	101	0	0.7
	39	0.331	50	0	0.95
	52	0.425	40	0	1
C	5	0.418	1305	9.29	0.007
	12	0.396	748	0.94	0.16
	18	0.481	214	0.17	0.25

This relative number of cells decreases, whereas $Y_{X/S}$ increases. It means that in the case of scale-down reactors with a high yield drop, a higher number of cells was submitted to high relative dextrose concentrations. So the relative concentrations encountered by cells have an impact on the yield of the culture. The high dextrose concentration imposes that the cells have to adapt their metabolism to withstand these fluctuations. It results in a decrease in biomass yield of the culture. These high concentrations are located in the non-mixed part of the scale-down reactor. So our working hypothesis is verified: the yield drop is due to the passage of the cells through the non-mixed part where they are exposed to high dextrose concentrations.

Consideration of the number of cells that are submitted to high dextrose concentrations cannot explain the anomalies observed for SDR type B. The fluctuation magnitude in dextrose concentrations experienced by the cells when they enter the non-mixed part is considered to explain the anomaly observed for SDR type B (Table 3.1). The fluctuation magnitude is higher in type B. So in the non-mixed part of type B, the cells experience high fluctuations in dextrose concentration. Thus they have to alter their metabolic pathways in order to withstand

these changes. These permutations disturb the growth of cells with the consequence that the quantity of biomass obtained at the end of fermentation is lower than for the other types.

The hydrodynamic modelling presented permits to differentiate the three scale-down system used in the fermentation tests and in combination with other parameters, it can explain the scale-down effect.

3.5. CONCLUSION AND PERSPECTIVES

The scale-up of a bioprocess is difficult to realize because limiting phenomena appear in the reactor. It induces yield drop or production of undesirable metabolites. This paper presents the study of three types of scale-down reactors in order to represent, at the laboratory scale, the hydrodynamic conditions of the industrial scale. The scale-down effects observed in our study were a decrease in biomass concentration and trehalose production and an increase of the fermentation time and ethanol production during the culture. All these parameters were influenced by the recirculation flow rate. The increase of ethanol production shows that the cells were submitted to high dextrose concentrations when they pass in the non-mixed part, leading to the synthesis of ethanol.

The hydrodynamic conditions developed in the scale-down reactor were characterized by mixing time calculation. It showed that mixing in the three types of scale-down reactor is governed by two different phenomena: dispersion in the case of type A and C and plug flow section in the case of SDR type B. A relation between the increase of the mixing time and the decrease of the biomass yield has also been established.

To understand why the yield decreases in case of scale-down fermentation, a hydrodynamic modelling procedure is presented. The model can describe the concentration profile encountered by the cells during the fermentation thanks to its division in two parts: circulation of microorganisms in the reactor and appearance of dextrose concentration gradients in the system, taking into account the pulses generated by the discontinuous operating of the pump. The results of the simulation permit to partly explain the yield drop. This drop is correlated to an increase in the number of cells submitted to high concentrations. It is thus related to the passage of microorganisms within the zones of high concentrations of dextrose created by the scale-down system. This relationship is clear for reactor types A and C but not for type B. In this case, the yield drop observed can be explained by the fluctuation magnitudes in dextrose concentrations encountered by yeast cells when they enter into the non-mixed part.

This model constitutes a very promising tool for the scale-up of fermentation processes. However it does not permit to clarify all the phenomena. The poor hydrodynamic conditions cannot explain alone the scale-down effect. It would be interesting to obtain information about the way that microorganisms experience fluctuations in dextrose concentrations. This physiological component is missing in our model. We are currently working on a model of microbial growth which could yield knowledge of the behaviour of a cell as a function of the concentration in dextrose really experienced by this cell.

3.6. ACKNOWLEDGEMENT

Annick Lejeune is supported of a grant from the “Fonds pour la formation à la Recherche dans l’Industrie et dans l’Agriculture” (FRIA).

Frank Delvigne is a post-doctoral researcher at the “Fonds national de la Recherche Scientifique” (FNRS).

Both authors acknowledge the FNRS for financial support.

The authors also acknowledge the Department of Industrial Biological Chemistry of the Gembloux Agricultural University and specially Mr Paquot and Mr Ronkart for their help in the realization of trehalose measurements.

3.7. REFERENCES

1. Gaspar A., Etude des interactions entre les paramètres biologiques et les grandeurs physiques liées à l'agitation et à l'aération lors de la production de xylanases par *Penicillium canescens*, in Unité de Bio-Industries. 1999, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux: Gembloux.
2. Enfors S.O., J.M., Rozkov A., Xu B., Hecker M., Jürgen B., Krüger E., Schweder T., Hamer G., O'Beirne D., et al., Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 2001. **85**(2): p. 175-185.
3. Guillard F., T.C., Modeling of the performance of industrial bioreactors with a dynamic microenvironment approach: a critical review. *Chemical Engineering Journal*, 1999. **22**(3): p. 187-195.
4. Sweere A.P.J., et al., Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production: I. One-fermentor system. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988. **31**: p. 567-578.
5. Jem, J.K., Scale-down techniques for fermentation. *Biopharmacy*, 1989: p. 30-39.
6. George, S., et al., Comparison of the Baker's yeast performance in laboratory and production scale. *Bioprocess Engineering*, 1998. **18**: p. 135-142.
7. Li, F., et al., A systematic approach for scale-down model development and characterization of commercial cell culture processes. *Biotechnology Progress*, 2006. **22**: p. 696-703.
8. Sweere A.P.J., Luyben K.C.A.M., and Kossen N.W.F., Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 1987. **9**: p. 386-398.
9. Namdev, P.K., B.G. Thompson, and M.R. Gray, Effect of feed zone in fed-batch fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992. **40**: p. 235-246.
10. Neubauer, P., L. Haggstrom, and S.O. Enfors, Influence in substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *E. coli* glucose limited fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995. **47**: p. 139-146.

11. Sweere, A.P.J., L. Janse, and K.C.A.M. Luyben, Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production: II. Two-fermentor system. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988. **31**: p. 579-586.
12. Oosterhuis, N.M.G., et al., Scale-down aspects of the gluconic acid fermentations. *Biotechnology Letters*, 1983. **5**(3): p. 141-146.
13. Fowler J.D., D.E.H., Effects of reactant heterogeneity and mixing on catabolite repression in culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989. **33**: p. 1039-1046.
14. Cortes G., T.-R.M.A., Ramirez O.T., Galindo E., Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. *Process Biochemistry*, 2005. **40**: p. 773-778.
15. Serrato J.A., P.L.A., Meneses-Acosta A., Ramirez O.T., Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004. **89**(2): p. 176-188.
16. Onyeaka H., Nienow A. W., and Hewitt C. J., Further studies related to the scale-up of high cell density *Escherichia coli* fed-batch fermentations: the additional effect of a changing microenvironment when using aqueous ammonia to control pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003. **84**(4): p. 474-484.
17. Papagianni, M., M. Matthey, and B. Kristiansen, Design of a tubular loop bioreactor for scale-up and scale-down of fermentation processes. *Biotechnology Progress*, 2003. **19**: p. 1408-1504.
18. Lin H.Y., N.P., Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2000. **79**: p. 27-37.
19. Bylund, F., et al., Influence of scale-up on the quality of recombinant human growth hormone. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000. **69**(2): p. 119-128.
20. Lara A.R., V.-L.C., Gosset G., Bolivar F., Lopez-Munguia A., Ramirez O.T., Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006. **94**(6): p. 1164-1175.
21. Lara A.R., L.L., Flores N., Gosset G., Bolivar F., Ramirez O.T., Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005. **93**(2): p. 372-385.
22. Sandoval-Basurto, E.A., et al., Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: Metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004. **89**(4): p. 453-463.
23. Hewitt C.J., O.H., Lewis G., Taylor I.W., Nienow A.W., A comparison of high cell density fed-batch fermentations involving both induced and non-induced recombinant *Escherichia coli* under well-mixed small-scale and simulated poorly mixed large-scale conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006. **96**(3): p. 495-505.
24. Vrabel P., V.D.L.R.G.J.M., Van Der Schot F.N., Luyben K.Ch.A.M., Xu B., Enfors S.O., CMA: Integration of fluid dynamics and microbial kinetics in modelling of large-scale fermentations. *Chemical Engineering Journal*, 2001. **84**: p. 463-474.
25. Zahradnik J., et al., A network-of-zones analysis of mixing and mass transfer in three industrial bioreactors. *Chemical Engineering Science*, 2001. **56**: p. 485-492.
26. Vlaev D., M.R., Lossev V. Vlaev S.D., Zahradnik J., Macro-mixing and *Streptomyces fradiae*: modelling oxygen and nutrient segregation in an industrial bioreactor. *Trans. IChemE*, 2000. **78**: p. 354-362.
27. Cui Y.Q., et al., Compartment mixing model for stirred reactors with multiple impellers. *Trans IChemE*, 1996. **74**(part A): p. 261-271.
28. Vrabel P., et al., Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modeling and measurements. *Chemical Engineering Science*, 2000. **55**: p. 5881-5896.
29. Mann R., et al., Computational fluid mixing for stirred vessels: Progress from seeing to believing. *Chemical Engineering Science*, 1995. **59**: p. 39-50.
30. Mann R., et al., A network-of-zones analysis of the fundamentals of gas-liquid mixing in an industrial stirred bioreactor. *Récent progrès en génie des procédés*, 1997. **11**: p. 223-230.

31. Berthiaux H., Analysis of grinding process by Markov chain. *Chemical Engineering Science*, 2000. **55**: p. 4117-4127.
32. Delvigne, F., et al., Stochastic models to study the impact of mixing on a fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 2006. **22**(259-269).
33. Walker G.M., *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1998: Wiley. 350.
34. Delvigne F., Destain J., and Thonart P., Structured mixing model for stirred bioreactor: an extension to a stochastic approach. *Chemical Engineering Journal*, 2005. **113**(1): p. 1-12.
35. Ronkart S., P.M., Fougnes C., Deroanne C., Van Herck J-C., Bleker C., Determination of total water content in inulin using the volumetric Karl Fischer titration. *Talanta*, 2006. **70**: p. 1006-1010.
36. Ronkart S., B.C., Fougnes C., Van Herck J.C., Wouters J., Paquot M., Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: An X-ray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and environmental scanning electron microscopy study. *Carbohydrates Polymers*, 2006. **63**: p. 210-217.
37. Mayr B., Horvat P., and Moser A., Engineering approach to mixing quantification in bioreactors. *Bioprocess Engineering*, 1992. **8**: p. 137-143.
38. Postma E., V.C., Scheffers W.A., van Dijken J.P., Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989. **55**(2): p. 468-477.
39. Fiechter A. and Seghezzi W., Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Journal of Biotechnology*, 1992. **27**: p. 27-45.
40. Lejeune A., Dimensionnement et extrapolation d'un procédé *fed-batch* de production de la levure *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* par modélisation structurée des paramètres du génie chimique. 2005, Faculté universitaire des Sciences agronomiques: Gembloux.
41. Reijenga K.A., B.B.M., van der Weijden C.C., Westerhoff H.V., Training of yeast cell dynamics. *FEBS Journal*, 2005. **272**: p. 1616-1624.
42. Delvigne F., et al., Modelling of the substrate heterogeneities experienced by a limited microbial population in scale-down and in large-scale bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 2006. **120**: p. 157-167.

CHAPITRE 4 : ETUDE DE TRACEURS PHYSIOLOGIQUES DES CONDITIONS DE STRESS EN BIO-REACTEURS : PARAMETRES NON SEGREGES

Extrait de :

Lejeune A., Delvigne F., Thonart P., 2010, *Trehalose content analysis of yeast cells during fermentation in scale-down reactors and in mini-bioreactors*, BASE, **14** (S2), 579-584

4.1. ABSTRACT

Trehalose is a reserve carbohydrate produced by *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions and used as a cryoprotectant during freeze drying. So the cellular content of trehalose is an important parameter to control in industrial context. Scale-down reactors have been used to produce *Saccharomyces cerevisiae*. These reactors permit to mimic the hydrodynamic conditions experienced by cells during large scale production. Three types of scale-down reactors have been tested, differing by the geometry of the non-mixed part and the recirculation flow rate. The results show that cells cultivated in scale-down reactors produced less trehalose compared to the reference reactor. These results are completed by the study of the expression of the TPS2 promoter coupled with a green fluorescent protein (GFP). TPS2 is a gene coding for a subunit of the enzymatic complex responsible of trehalose synthesis. This strain was produced in mini-bioreactors which are shake flasks equipped with a dissolved oxygen probe. This approach allows using trehalose, or related enzymes, as a cellular marker of the stress encountered by yeast in industrial process.

4.2. INTRODUCTION

Trehalose is a natural disaccharide composed of two molecules of glucose, connected by a stable link α,α -1,1. It can be found in a wide number of microorganisms: bacteria, fungi, insects, plants and invertebrates. Its applications are food industries, health care, cosmetic industries [1].

This paper focuses on the measurement of the intracellular trehalose concentration in different production of *Saccharomyces cerevisiae*. This metabolite is of great interest at the industrial level because it plays several metabolic roles. First, trehalose is a reserve carbohydrate during the non-proliferating periods [2] and protects several cytosol components against hard conditions of growth (osmotic and/or thermic chock, deprive of a nutriment). This action permits to the yeast cells with high trehalose content (15-10 % of dry matter) to resist to the industrial conditions of production [3]. Thirdly, trehalose seems to be useful during drying or congelation of cells because it protects the membranes of dried cells and increases the thermic stability of proteins [4]. The exogenous trehalose can also have an influence during the conservation treatment by protecting the membranes and the structure of proteins [5]. For all these reasons, trehalose can be considered as an important metabolite in industrial production of yeast and used as a biomarker of the impact of growth conditions in an industrial production.

The intracellular trehalose concentration that can be typically reached in a batch reactor is 0.025-0.035 g.g⁻¹ of biomass (dry weight). After a fed-batch culture, this concentration can be 0.13 g.g⁻¹ of biomass (dry weight) [6]. The addition of glucose in the reactor induces a

reconsumption of trehalose, rapidly followed by a new synthesis, leading to a higher content of trehalose in the cell [2, 7, 8]. So the use of the fed-batch process is the best way to increase the cryotolerance as it increase the trehalose content of cells [9].

In this paper, the trehalose content of yeast cells was measured during scale-down experiments. Scale-down reactor (SDR) permit to reproduce the hydrodynamic conditions of large scale reactors at laboratory scale [10-12]. This particular reactor is composed in two parts: a mixing and a non-mixing part linked by a recirculation pump [13-15]. In a large scale reactor, heterogeneity zones in glucose concentration appear, induced by the poor efficiency of mixing. Microorganisms have to adapt their metabolism to these extracellular fluctuations in glucose concentration [16, 17]. The scale-up effect is then observed: biomass yield drop, fermentation time and ethanol production increase and viability decrease [18].

The trehalose measurement was made using two strategies: a direct method and an indirect one using a fluorescent reporter gene. The direct method is the High Performance Anion Exchange Chromatography coupled with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD). It gives more reliable results than the usual techniques based on anthrone or trehalase [19]. For the indirect method, a *Saccharomyces cerevisiae* strain (YDR074W) was chosen in the Yeast GFP Clones Collection of Invitrogen. In this strain the TPS2 gene was replaced by a gene coding for a green fluorescence protein (GFP). The GFP expression is so under the control of the TPS2 promoter. TPS2 is a gene coding for trehalose-6-P phosphatase, a subunit of the enzymatic complex (TPS complex) responsible of the trehalose synthesis (see figure 4.1).

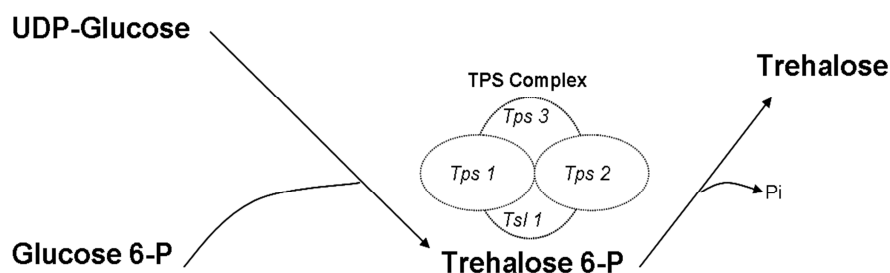


Figure 4.1 : Trehalose biosynthesis in the cytosol

The TPS complex is located in the cytosol where the biosynthesis of trehalose occurs [20]. The regulation of intracellular trehalose concentration is the result of the action of the TPS complex, associated to the action of trehalase, the enzyme responsible of the hydrolysis of trehalose. The expression of the GFP was used as a biomarker, permitting to follow the

impact of stress conditions on yeast cells. The cultivation tests were conducted in mini-bioreactors where stress conditions are reproduced.

4.3. MATERIAL AND METHODS

4.3.1. CULTURE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN SCALE-DOWN REACTORS (SDR)

Saccharomyces cerevisiae (MUCL 43340) was stored at -80°C before use. A 500 ml preculture (dextrose (20 g.l^{-1}), peptone casein (10 g.l^{-1}), yeast extract (10 g.l^{-1})) was prepared before inoculation of the reactor. The culture medium was composed of dextrose (5 g.l^{-1}), peptone casein (10 g.l^{-1}) and yeast extract (10 g.l^{-1}). The mixing part of the scale-down reactors is a 20 liters stirred bioreactor (Biolafitte-France) with two turbines TD4-TD4. The regulation of temperature (30°C), pH (5.5) and dissolved oxygen was ensured by using a direct control system (ABB). Dissolved oxygen level was maintained above 30% saturation by the stirrer speed. Aeration was fixed at 1 vvm. The stirred reactor was connected to the appropriate non-mixed part, characterized as follow (Figure 4.2):

- SDR type A, glass bulb: diameter = 85 mm, length = 0.25 m, capacity = 1 l
- SDR type B, pipe: internal diameter = 8 mm, external diameter = 12 mm, length = 7.5 m, capacity = 0.377 l
- SDR type C, pipe: internal diameter = 15 mm, external diameter = 21 mm, length = 5 m, capacity = 0.884 l

The recirculation between the two parts of the scale-down reactor was ensured by a peristaltic pump (Watson Marlow 323S/D).

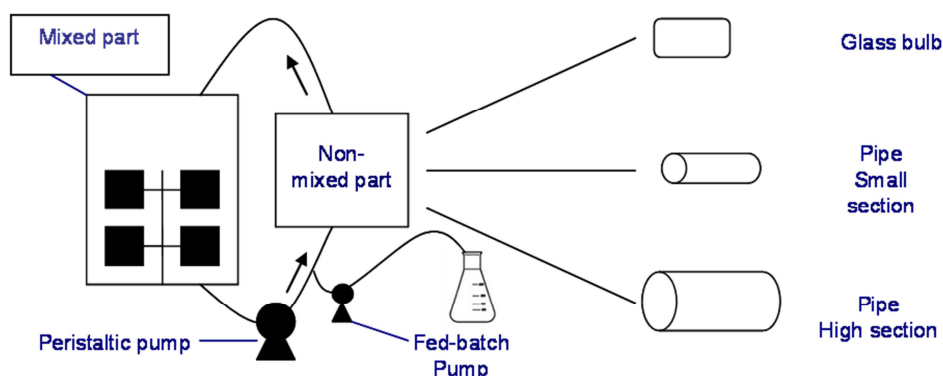


Figure 4.2 : Experimental material: scale-down reactor with the three types of non-mixing parts

The fed-batch mode was used in scale-down tests and the dextrose solution was introduced in the non-mixed part. For the reference reactor (with no recirculation), the feed was made at the top of the stirred vessel. After 5 h of batch culture, an exponential fed-batch was used, following the equation: $F=0.0058*e^{0.005*t}$ (F: feed flow rate (ml.min⁻¹), t: culture time (min)). After the exponential phase, the feeding was fixed at a constant flow rate of 3.5 ml/min.

4.3.2. CULTURE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (GFP) IN MINI-BIOREACTORS

Mini-bioreactors are shake flasks, equipped with a dissolved oxygen sensor. The tests are made in an orbital incubator (Orbi-Safe, Sanyo). The temperature is maintained at 30°C and the orbital speed at 110 rpm. The dissolved oxygen is recording using the software “Oxy_4v2”.

The GFP strain is a *Saccharomyces cerevisiae* strain (YDR074W) from the Yeast GFP Clones Collection of Invitrogen. The target promoter is TPS2. It codes for the phosphatase subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex, which synthesizes trehalose. Its expression is induced by stress conditions and repressed by the Ras-cAMP pathway [21, 22].

The CFM mineral medium was used. It is composed of (all compounds are expressed in g l⁻¹): KH₂PO₄, 6.0; (NH₄)₂SO₄, 12.0; MgSO₄, 1.0; EDTA, 0.015; ZnSO₄×7H₂O, 0.0045; MnCl₂×4H₂O, 0.001; CoCl₂×6H₂O, 0.0003; CuSO₄×5H₂O, 0.0003; Na₂MoSO₄×2H₂O, 0.004; CaCl₂×2H₂O, 0.0045; FeSO₄×7H₂O, 0.003; H₃BO₃, 0.001; D-biotin, 0.1; D,L-pantothenic acid, 0.001; nicotinic acid, 0.001; myo-inositol, 0.0025; thiamin, 0.001; pyridoxin, 0.001; para-aminobenzoic acid, 0.0002. Glucose and yeast extract were added at final concentration of 5 g l⁻¹ each. 50 ml of this medium were used for the precultures. After 10 hours of incubation (30°C, 110 rpm), 200 ml of CFM medium, in mini-bioreactor, were inoculated with the preculture. The fed-batch solution was added after 15 hours and was composed of (all compounds are expressed in g l⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 10.0; KH₂PO₄, 5.0; MgSO₄, 0.9; yeast extract, 5.0. Glucose was added at final concentration of 30 g l⁻¹. The glucose addition was made using a MatLab program. The profile was calculated using older data set. Two feeding strategies were used to estimate the impact of poor mixing conditions on the trehalose production: one leading to glucose excess in the medium and one to no glucose excess in the mini-bioreactor which can be considered as a reference.

4.3.3. FERMENTATION FOLLOW-UP

During the fermentations, samples were withdrawn at the level of the mixed part of the reactor and different measurements were carried out on these samples. The microbial growth of *Saccharomyces cerevisiae* was evaluated by optical density measurement ($\lambda=540$ nm, spectrophotometer GENESYS 2). Biomass concentration has been determined by the correlation between optical density and dry matter. Dextrose concentration was determined by enzymatic method (YSI model 2700 Select).

The analysis of the GFP expression level has been performed with a FACScan (Becton Dickinson) flow cytometer. Samples are taken directly from the reactor and diluted in 900 μl of PBS (Phosphate Buffer Solution) and 100 μl of a cycloheximide solution ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) in order to stop protein synthesis. For each measurement, 30,000 cells are analyzed (GFP is excited at 488 nm and emission signals are collected by using filters at 530 nm). The measurements are made with FL1 channel intensities at 530 nm. The results have been analyzed by the CellQuest (Becton Dickinson) software and are subsequently exported to WinMDI and MatLab for further analysis.

4.3.4. TREHALOSE ANALYSIS

Trehalose was extracted from the cells after washing samples with water three times. Then the pellet was resuspended in 5 ml of distilled water. Sample tubes were then left 10 minutes in a boiling water bath. After centrifugation, the supernatant was recovered and analyzed by High Performance Anion Exchange Chromatography coupled with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD) on a Dionex DX500 chromatographic system operating at $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. The volume of samples injected was 25 μl . The stationary phase consisted of a CarboPac PA 100 column (250 X 4 mm) with a pre-column PA 100 (50 X 4 mm) (DIONEX Corp, Sunnyvale, USA). The mobile phase was composed of sodium hydroxide (160 mM) and elution was performed in isocratic mode, followed by a linear gradient with a solution containing both sodium hydroxide (160 mM) and sodium acetate (500 mM). The gradient was completed by washing with sodium hydroxide 500 mM [23, 24]. Before each set of samples measurements, a calibration curve was done with concentration range of 62.5 ppm to 5000 ppm. The retention time of the trehalose was of 2.83 seconds. This value was very constant for all the measurements realized (data not shown).

4.4. RESULTS AND DISCUSSION

Three types of scale-down reactors have been used and for each type, three recirculation flow rates have been tested in order to modulate the global mixing efficiency of the scale-down reactors (see figure 4.2). The biomass yield, ratio between the biomass produced and the glucose consumed during the fermentation, has been calculated for each test. Figure 4.3 shows the means and the standard deviations that have been calculated for each scale-down type and the horizontal line symbolizes the yield of the reference bioreactor which reaches a value of 47.5%. In the case of scale-down cultures, the biomass yield is lower than in the case of the reference reactor. An effect of the type of SDR and of the recirculation rate is observed [25]. The higher recirculation flow rate gives, for example, a biomass yield similar to the reference reactor.

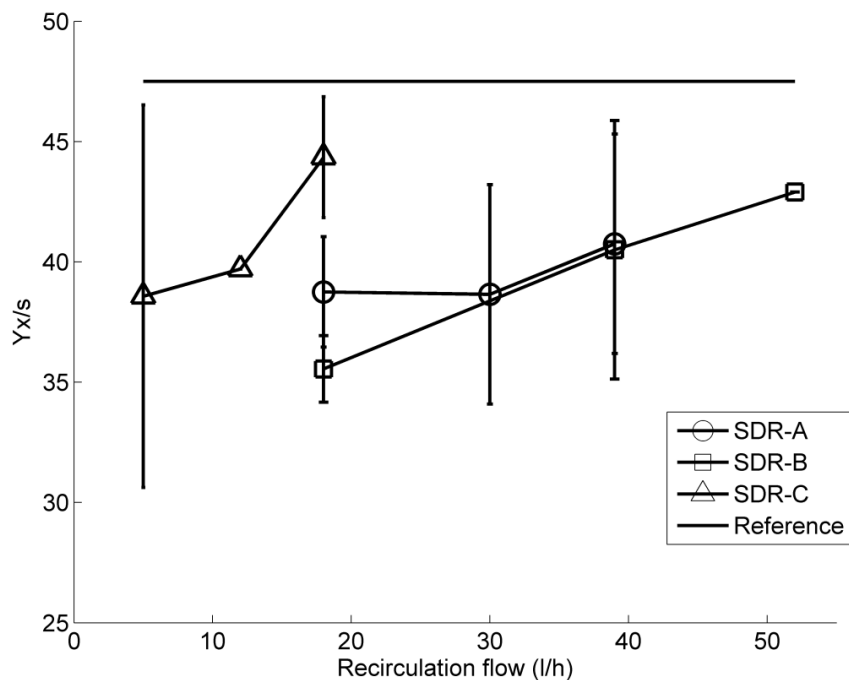


Figure 4.3 : Biomass yield (%) of the scale-down tests: circle: scale-down reactor type A, square: scale-down reactor type B, triangle: scale-down reactor type C, solid line: reference reactor

The results of intracellular trehalose measurement for the three scale-down reactors are presented in figure 4.4. The trehalose concentration in the reference reactor reached a value close to those found in the literature [6]. In all cases, there is an impact of the recirculation flow rate. When it increases, the intracellular trehalose content of cells increases and tends to the curve of the reference reactor. The trehalose content has the same behaviour as the biomass yield. It can also be observed that the trehalose content of the cells decreased after

the batch period but it re-increases during the fed-batch mode, leading to a higher content of trehalose in the cells. This fact has been related in the literature [2, 7, 8].

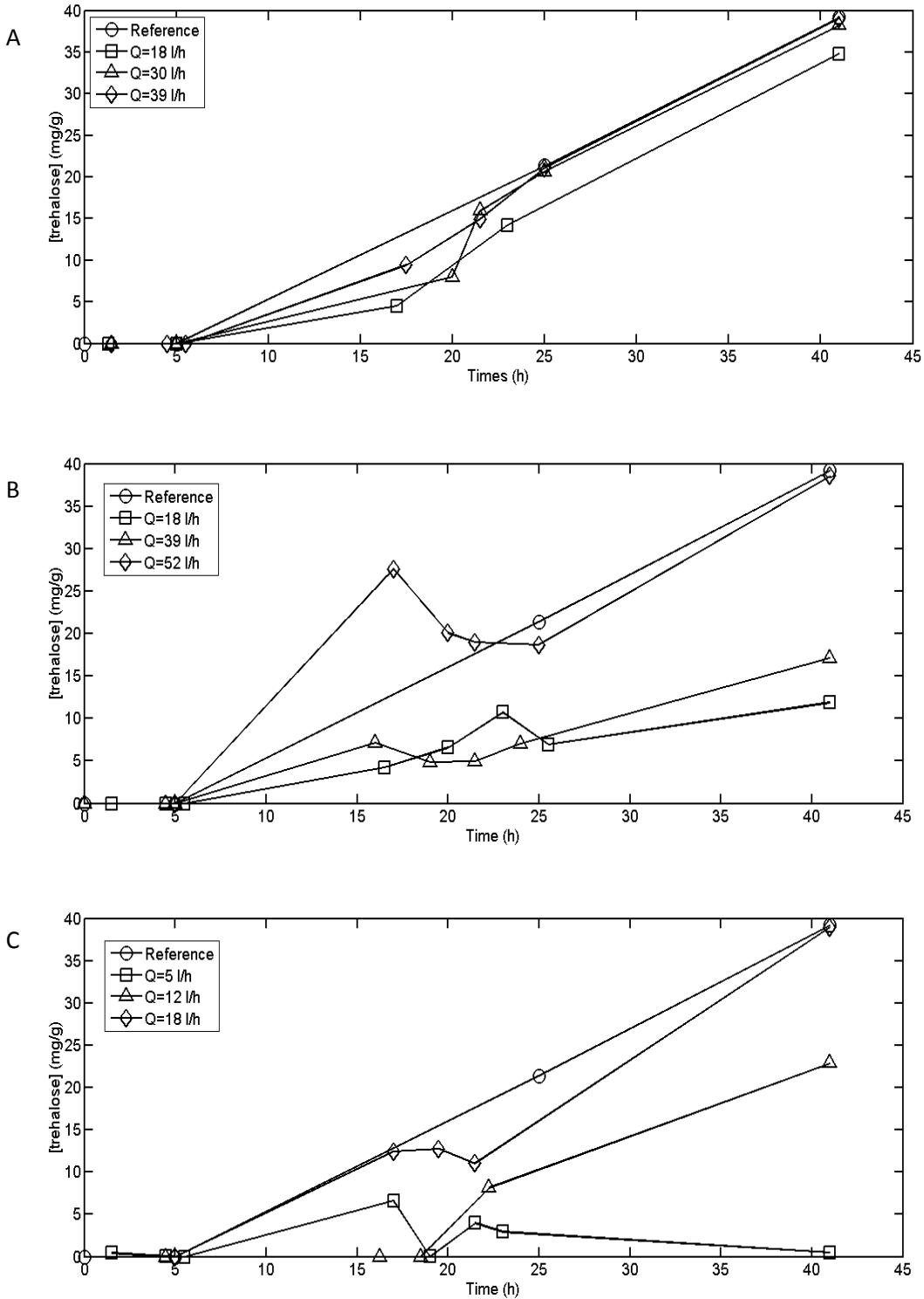


Figure 4.4 : Evolution of intracellular trehalose concentration (mg g⁻¹) during the fermentation in scale-down reactor type A (A), type B (B) and type C (C) (Q=recirculation flow rate (l h⁻¹))

In an industrial reactor, the mixing efficiency is low, resulting in the appearance of substrate concentration gradients, temperature or pH. In the SDR, the impact of a glucose concentration

gradient on yeast growth was tested. The environmental conditions encountered by the cells are constantly changing. Indeed, the cells pass from zones of high glucose concentration to zones of low glucose concentration. These changes disturb the enzymatic cascade of the cells, leading to a biomass yield drop. Here we show that it also causes a lower production of intracellular trehalose. These cells are less protected in case of downstream processing, such as lyophilisation. This fact is observed in yeast produced industrially where the addition of glucose during the growing is unchecked. The measurement of the intracellular trehalose content of the cells confirms that the scale-down reactors that we used can mimic the industrial reactor.

The use of a GFP reporter strain permits to go further in the explanation. Two feeding strategies have been used for the mini-bioreactor experiments, leading to an excess of glucose in the first test and to a starvation of glucose in the second test. The biomass and glucose concentrations have been measured for the two tests and are presented in figure 4.5. The glucose excess reaches in the first test a value of 3.5 g l^{-1} . At this concentration, yeast cells exhibit a fermentative metabolism. In the second experiment, the cells exhibit mainly an oxydative metabolism.

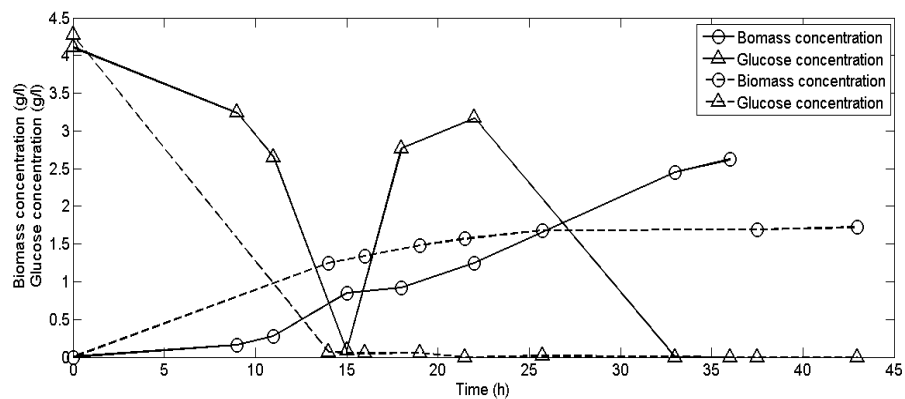


Figure 4.5: Evolution of biomass and glucose concentration for two tests in mini-bioreactor, solid line: test with glucose excess, dashed line: test with no glucose excess

Figure 4.6 shows the analysis of the fluorescent intensity of the green fluorescent protein coupled with the TPS2 promoter. The GFP synthesis is more induced in the case of test 2, where there is no glucose excess. The cells are then able to synthesize trehalose in greater quantity. They are therefore able to resist better to conditioning treatments, such as lyophilisation.

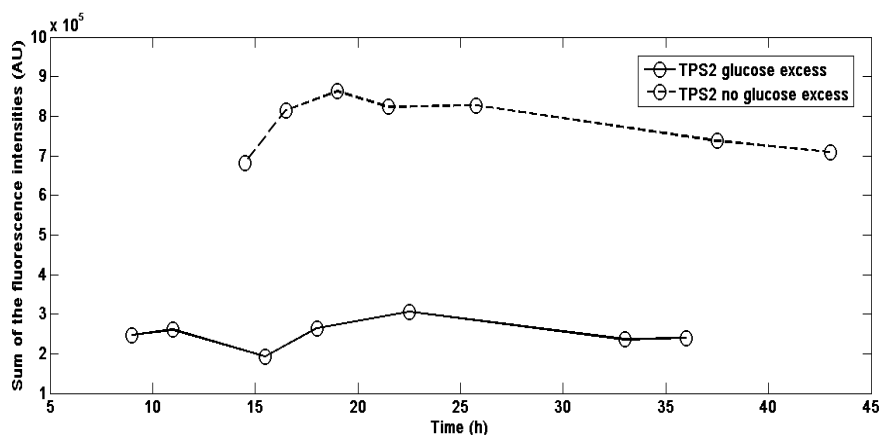


Figure 4.6: Evolution of the fluorescence intensity of the TPS2 – GFP gene, solid line: test with glucose excess, dashed line: test with no glucose excess

4.5. CONCLUSION

Trehalose is an important metabolite involved at the level of yeast metabolism. It plays a role of cryoprotectant and makes the cells able of withstanding conditioning treatment, such as lyophilisation. It is an important parameter to take into account in the industrial production of yeast where the conservation is a main element of the process. In this paper, we studied the trehalose production in scale-down reactors. The results showed that a poor mixing efficiency leads to a lower trehalose production. The mini-bioreactor experiments show that a yeast cell produced with a glucose excess in the medium expresses less the TPS2 gene, allowing the production of trehalose. In front of these results, it can be concluded that the constantly changing environmental conditions experienced by cells in industrial bioreactor have an impact on the enzymatic reactions of the cell and perturb its normal growth.

4.6. REFERENCES

1. Higashiyama T., *Novel functions and applications of trehalose*. Pure and Applied Chemistry, 2002. **74**(7): p. 1269-1269.
2. Thevelein J.M., *Regulation of trehalose mobilization in Fungi*. Microbiological Reviews, 1984. **48**(1): p. 42-59.
3. van Dijck P., C.D., Smet P., Thevelein J.M., *Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting Saccharomyces cerevisiae cells*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(1): p. 109-115.
4. Hounsa C.-G., B.E.V., Thevelein J.M., Hohmann S., Prior B.A., *Role of trehalose in survival of Saccharomyces cerevisiae under osmotic stress*. Microbiology, 1998. **144**: p. 671-680.
5. Diniz-Mendes L., B.E., de Araujo P.S., Panek A.D., Paschoalin V.M.F., *Preservation of frozen yeast cells by trehalose*. Biotechnology and Bioengineering, 1999. **65**(5): p. 572-578.
6. Aranda J.S., S.E., Taillandier P., *Trehalose accumulation in Saccharomyces cerevisiae cells: experimental data and structured modeling*. Biochemical Engineering Journal, 2004. **17**: p. 129-140.
7. Lillie S.H., P.J.R., *Reserve carbohydrate metabolism in Saccharomyces cerevisiae: responses to nutrient limitation*. Journal of Bacteriology, 1980. **143**: p. 1384-1394.

8. Ertugay N., H.H., Bayindirli A., *Fed-batch cultivation of baker's yeast: effect of nutrient depletion and heat stress on cell composition*. Folia Microbiology, 1997. **42**: p. 214-218.
9. Gélinas P., F.G., LeDuy A., Goulet J., *Effect of growth conditions and trehalose content on cryotolerance of baker's yeast in frozen doughs*. Applied and Environmental Microbiology, 1989. **55**(10): p. 2453-2459.
10. Jem, J.K., *Scale-down techniques for fermentation*. Biopharmacy, 1989: p. 30-39.
11. George, S., et al., *Comparison of the Baker's yeast performance in laboratory and production scale*. Bioprocess Engineering, 1998. **18**: p. 135-142.
12. Li, F., et al., *A systematic approach for scale-down model development and characterization of commercial cell culture processes*. Biotechnology Progress, 2006. **22**: p. 696-703.
13. Namdev, P.K., B.G. Thompson, and M.R. Gray, *Effect of feed zone in fed-batch fermentations of Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 1992. **40**: p. 235-246.
14. Neubauer, P., L. Haggstrom, and S.O. Enfors, *Influence in substrate oscillations on acetate formation and growth yield in E. coli glucose limited fed-batch cultivations*. Biotechnology and Bioengineering, 1995. **47**: p. 139-146.
15. Delvigne, F., et al., *Stochastic models to study the impact of mixing on a fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Progress, 2006. **22**(259-269).
16. Guillard F., T.C., *Modeling of the performance of industrial bioreactors with a dynamic microenvironment approach: a critical review*. Chemical Engineering Journal, 1999. **22**(3): p. 187-195.
17. Enfors S.O., J.M., Rozkov A., Xu B., Hecker M., Jürgen B., Krüger E., Schweder T., Hamer G., O'Beirne D., et al., *Physiological responses to mixing in large scale bioreactors*. Journal of Biotechnology, 2001. **85**(2): p. 175-185.
18. Sweere A.P.J., et al., *Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production: I. One-fermentor system*. Biotechnology and Bioengineering, 1988. **31**: p. 567-578.
19. Ferreira J.C., P.V.M.F., Panek A.D., Trugo L.C., *Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts*. Food Chemistry, 1997. **60**(2): p. 251-254.
20. Cabib, E., Leloir, L.F., *The biosynthesis of trehalose phosphate*. Journal of Biological Chemistry, 1958. **231**: p. 259-275.
21. De Virgilio, C., et al., *Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in Saccharomyces cerevisiae, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity*. European Journal of Biochemistry, 1993. **212**: p. 315-323.
22. Winderickx, J., de Winde, J.H. , Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., van Dijck, P., Thevelein, J.M., *Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in Saccharomyces cerevisiae: novel variations of STRE-mediated transcription control?* Molecular and General Genetics, 1996. **252**(4): p. 470-482.
23. Ronkart S., P.M., Fougnyes C., Deroanne C., Van Herck J-C., Bleker C., *Determination of total water content in inulin using the volumetric Karl Fischer titration*. Talanta, 2006. **70**: p. 1006-1010.
24. Ronkart S., B.C., Fougnyes C., Van Herck J.C., Wouters J., Paquot M., *Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: An X-ray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and environmental scanning electron microscopy study*. Carbohydrates Polymers, 2006. **63**: p. 210-217.
25. Lejeune, A., Delvigne, F., Thonart, P., *Influence of bioreactor hydraulic characteristics on a Saccharomyces cerevisiae fed-batch culture: hydrodynamic modelling and scale-down investigations*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010. **37**: p. 225-236.

**CHAPITRE 5 : ETUDE DE TRACEURS
PHYSIOLOGIQUES DES CONDITIONS DE
STRESS EN BIO-REACTEURS : PARAMETRES
SEGREGES**

CHAPITRE 5.1. UTILISATION DE MARQUEURS CELLULAIRES POUR L'ANALYSE EN LIGNE DE LA VIABILITE MICROBIENNE EN COURS DE PROCEDE

Extrait de :

Delvigne F., Baer J., Gofflot S., Lejeune A., Telek S., Johanson T., Lantz A.E., *Dynamic single-cell analysis of Saccharomyces cerevisiae under process perturbation: comparison of different methods for monitoring the intensity of population heterogeneity*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **In Press**

5.1.1. ABSTRACT

BACKGROUND: Single cell biology has attracted a lot of attention these past few years and has led to numerous fundamental results pointing out the heterogeneity of clonal cell populations. In this context, microbial phenotypic heterogeneity under bioprocessing conditions needs to be further investigated. In this study, yeast based processes have been investigated by using on-line flow cytometry in combination with a fluorescent transcriptional reporter (GFP) and viability fluorescence tags (propidium iodide, PI). Methods aiming at expressing the dispersion of these fluorescence tags among the yeast populations have been investigated for different bioreactor operating conditions. **RESULTS:** Yeast viability was determined on the basis of PI uptake. Segregation between PI negative and positive subpopulations could be efficiently quantified on the basis of the mean-to-median ratio or the amplitude of the interquartile range. On the other hand, the same quantification could not be made for the segregation occurring at the level of GFP synthesis. Indeed, when cells were exposed to sub-lethal or mild stresses (such as in scale-down reactors) two GFP subpopulations could be visualized by real-time FC, but quantification by one of the above-mentioned methods was not possible. **CONCLUSIONS:** Yeast population heterogeneity was observed in representative bioreactor operating conditions. Difficulties for the determination of segregation at the level of GFP synthesis point out the fact that one needs to understand the segregation mechanisms for the applied fluorescent reporters, to judge whether simple mathematical tools may be applied or if more sophisticated computational tools are needed for the quantification of the microbial population segregation.

5.1.2. INTRODUCTION

Standard biochemical analyses for physiological monitoring of bioprocesses provide data, which is an average for the microbial population. The existence of unproductive or less robust sub-populations may have a significant effect on the overall process performance and hence, the microbial cell phenotypic heterogeneity lately become a focus for many researches aiming at improving bioprocess robustness [1-3]. Flow cytometry (FC) is a powerful tool for analysis of microbial cell properties at single-cell level and previous studies have shown that microbial population segregation can be followed by on-line FC [4, 5]. More recently, simplified FC systems have been released on the market allowing more widespread use of this promising

technique to monitor population dynamics in the field of microbial analysis [6] and industrial biotechnology [7, 8].

To gain more physiological knowledge than just information about cell size and cell complexity, FC analysis needs to be combined with the use of fluorescent tags, enabling monitoring of different important cellular properties. In this work, a dual fluorescent biomarker based on external propidium iodide (PI) uptake and internal GFP synthesis has been used in order to assess viability and metabolic activity of a yeast population. PI is a fluorescent marker broadly used for the assessment of cell viability on the basis of membrane permeability [1]. Indeed, PI exhibits a relatively high molecular weight (668 Da [2]) and can in principle only be taken up by microbial cells exhibiting compromised membranes. However, several reports have shown that PI can enter healthy cells [9, 10]. As an example, *Escherichia coli* cells have been shown to exhibit a transient increase in PI uptake when exposed to substrate limitation [11, 12]. Recently, it has also been reported that, in some cases, PI stained yeast cells were viable and able to recover membrane integrity after re-incubation on fresh medium [10, 13]. Another important element that must be taken into account is the fact that the viable and non-viable states cannot be interpreted as a binary mechanism as there are many intermediate states between these two extremes [14]. In order to gain more insight about the physiological processes associated with yeast viability and metabolic activity during process conditions, PI uptake analysis was in our study combined with a fluorescent transcriptional reporter. This second marker depends on the activity of the *rpl22a* promoter involved in ribosome synthesis and has earlier been seen to reveal different growth phases [15]. This way, a higher resolution is expected for the characterization of the intermediate physiological states. Indeed, the interest in combining such biomarkers, rely on the potential to highlight four phenotypes (i.e. GFP-PI-, GFP-PI+, GFP+PI+ and GFP+PI-), the GFP+PI+ state representing the transition between viable and non-viable phenotypes.

Traditionally FC data is depicted as histograms illustrating the population distribution and/or dotplots where two different properties are plotted against each other. Different mathematical approaches have then been applied to classify cells into categories [16]. The different FC parameters can also easily be followed on the basis of their statistical variables, such as mean and median values. However, very few reports exist where FC data has been used to in a quantitative way describe population distributions and segregation. It is not straightforward to express this segregation and new tools are needed in order to quantify this phenomenon with regards to biological significance.

In this study we have applied on-line flow cytometry in combination with a boxplot representation of the data, aiming at in a high-throughput manner enable determination of microbial population dynamics over time in bioprocesses. In addition, subpopulation distributions over time were considered. Cultivations with *Saccharomyces cerevisiae* in both rich and minimal media are used to illustrate possibilities and limitations with the suggested data treatment approaches. Population segregation and dynamics during batch to chemostat transition and during fed-batch cultivation were investigated.

5.1.3. MATERIAL AND METHODS

5.1.3.1. YEAST STRAIN AND CULTIVATION MEDIA

Saccharomyces cerevisiae reporter strain FE440 was used throughout this study. The integrated *S. cerevisiae* reporter system (FE440) is based on expression of the stable GFP, exhibiting a bright signal, under the control of the ribosomal RPL22a promoter[15]. The cultivations were carried out either on rich YPD medium (glucose 10g/L; casein pepton 10g/L; yeast extract 10 g/L) or in Verduyn minimal medium[17]. For the precultivation procedure, 1 mL of a frozen stock solution (-80°C) was added in 100 mL of the appropriate medium. Precultivation was carried out overnight at 30°C under orbital shaking (140 rpm) in 1L baffled flask, before being transferred to stirred bioreactors.

5.1.3.2. BIOREACTOR SET-UP AND RELATED ANALYTICS

The yeast GFP reporter strain was cultivated in a lab-scale stirred bioreactors (Biostat B-Twin, Sartorius) operated in either chemostat or fed-batch mode (remote control by the MFCS/win 3.0 software). Bioreactor experiments were carried out by considering an initial optical density of 0.2. Chemostat was started when the initial batch glucose content was entirely consumed (when dissolved oxygen signal rises). At this time, the bioreactor was run with a continuous feeding of fresh medium and withdrawal of spent medium at a dilution rate of 0.25 h^{-1} . For the fed-batch experiments, two different approaches were used, the first one by considering a culture performed in the classical stirred vessel and another one conducted with the stirred vessel connected to a recycle loop (silicon pipe; diameter 0.005 m ; length 6 m or 12 m in order to modulate the residence time in the recycle loop). This last apparatus corresponds to a scale-down strategy allowing to reproduce heterogeneities expected in large-scale bioreactors. A continuous recirculation of the broth between the stirred reactor and the recycle loop was ensured by a peristaltic pump (Watson Marlow 323) with the glucose feed solution being added at the inlet of the recycle loop in order to generate a concentration

gradient. During all experiments, pH was maintained at 5 (regulation by ammonia and phosphoric acid) and temperature at 30°C. Stirrer rate was maintained at 1000 rpm with a RDT6 impeller and air flow rate was set to 1 L/min at the beginning of the culture. When fed-batch phase started, agitation rate and air flow rate were progressively raised to 1000 rpm and 1 L/min respectively. The culture was fed with 500 mL of a solution containing 400 g/L of glucose diluted either in rich or minimal medium on the basis of a predefined feeding profile. Growth was monitored by measuring the OD_{600nm} with a Genesys 10S spectrophotometer (Thermo Scientific, Belgium). The concentrations of glucose was determined by YSI and the concentration of ethanol by HPLC (1100, Agilent) equipped with a differential refraction index detector.

5.1.3.3. ON-LINE FLOW CYTOMETRY PROTOCOL

The interfacing system between the bioreactor and a BD Accuri C6 Flow cytometer (FC) was constructed on the basis of the in-line mixing principle. Detailed information about the Accuri C6 FC can be found online [18]. A first peristaltic pump (sampling pump, Watson Marlow 040.DP1D.N2R operating at a rate of 32 mL/min) extracted a cell suspension sample directly from the bioreactor and injected it in a diluting flow of water (milliQ water as the sheat fluid of the C6 FC). The dilution fluid was carried forward by a second peristaltic pump (dilution pump, Watson Marlow 040.DP1D.N2R operating at a rate of 32 mL/min). In line mixing was achieved by a polypropylene T-mixer. Silicon tubing (internal diameter: 1 mm) was used except for the direct insertion into the peristaltic pump, where marprene was used in order to increase the shelf life of the tubing. All the connections were made using male polypropylene luer lock systems (internal diameter: 1.6 mm). The sequence of activation of the peristaltic pumps was controlled automatically by a PIC18F microcontroller. The PIC microcontroller was embedded in a full PICPLC16 control card provided by Mikroelektronika. This card comprised several relays that were programmed in order to activate or deactivate the peristaltic pumps. The control procedure was designed on the basis of a C code written using the MikroC pro for PIC controller software. These sequences of activation/deactivation were set up on the basis of two constraints. The first constraint involved full cleaning of the sampling lines in order to avoid cross-contamination between successive samples. The second constraint implies an appropriate dilution of the cell suspension before FC analysis. The in-line mixing system was adjusted so that samples for FC analysis always comprised less than 3.10^6 cells/mL in order to be in the linear range of analysis and to achieve an effective separation of the events. The sampling sequence was repeated each 15 minutes. For each

sequence, the FC analysis was activated automatically. The sample was pumped through the FC at a flow rate of 33 $\mu\text{L}/\text{min}$ and the resulting events were recorded for 1 minute. Propidium iodide (PI) staining was performed by adding PI directly into the milliQ reservoir at a concentration of 10 mg/L. Detailed on-line FC procedures can be found elsewhere [8]. The raw data was extracted as fcs files and loaded into MatLab with the help of the readfsc function (by L. Balkay, University of Debrecen, Hungary, available on MatLab central file sharing). Data were exported from the FC software (CFlowplus) as .fcs file and treated by using the boxplot function.

5.1.3.4. CELL SORTING AND CONFOCAL MICROSCOPY

In order to assess the viability of the four subpopulations, i.e. GFP+PI-, GFP+PI+, GFP-PI- and GFP-PI+, cell sorting was carried out on samples coming from bioreactors (FACSaria, BectonDickinson) and plated onto agar medium (glucose 10 g/L, yeast extract 10 g/L, casein peptone 10 g/L, agar 15 g/L) in order to assess their viability on the basis of colony forming unit measurement. The occurrence of the four subpopulations was also checked visually by using confocal microscopy (Leica TCS SP5).

5.1.4. RESULTS AND DISCUSSION

5.1.4.1. ON-LINE PROFILING OF YEAST POPULATION BY AUTOMATED FLOW CYTOMETRY: OVERALL TRENDS FOR BATCH TO CHEMOSTAT TRANSITION AT TWO NUTRITIONAL STATES (RICH OR MINIMAL MEDIUM)

As a first attempt, yeast cell physiology was followed by an on-line flow cytometry protocol developed previously [8] allowing the automated processing of yeast samples each 15 minutes directly from bioreactors. Yeast population dynamics was followed in chemostat cultivations running at a dilution rate of 0.25 h^{-1} and with either minimal (Verduyn) or rich (YPD) medium (Figure 5.1).

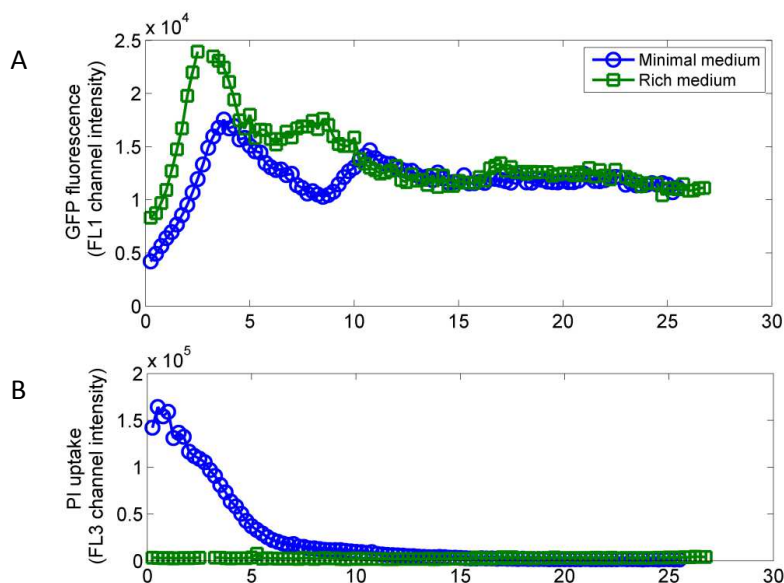


Figure 5.1: Evolution of A) GFP synthesis under the control of the *rpl22a* ribosomal promoter and B) PI uptake during a batch culture followed by a chemostat at $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$. The chemostat was started after 8 hours and 6 hours for the minimal (Verduyn) and rich (YPD) medium, respectively. Samples were taken each 15 minutes by an automated system and sent for analysis to an on-line flow cytometer. Only mean values for GFP and PI uptake distribution are displayed in the figure.

Induction of GFP expression arose at the beginning of the cultivation, just after the inoculation of the bioreactor. This result is in accordance with previously reported behavior, since the *rpl22a* promoter is activated at the onset of exponential phase [15]. GFP signal decayed after 3 or 4 hours, depending on the cultivation medium and rose again when the bioreactor was shifted to chemostat mode at a dilution rate D of 0.25 h^{-1} . The relationship between the growth curve and the response of the *rpl22a* is given in figure 5.2.

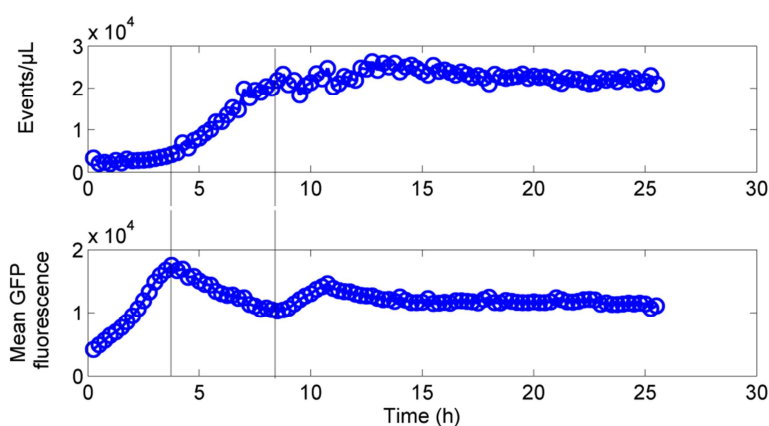


Figure 5.2: Relationship between microbial growth and GFP synthesis under the control of a ribosomal promoter. The number of events per μL is directly displayed on the FC software and is in accordance with optical density measurements (results not shown), as well as the mean green fluorescence (FL1 channel). These parameters were recorded every 15 minutes on the basis of at least 40,000 yeast cells. The cultivation displayed here correspond to a batch culture on Verduyn medium followed by a chemostat phase at $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$ on the same medium

Chemostat mode was started when all glucose was consumed after the batch phase, i.e. after 6 hours for the cultivation carried out on rich medium and 8 hours for the cultivation carried out on minimal medium. It can be seen, that GFP expression was more intensive when yeast was cultivated in rich medium, which was in accordance with the growth profiles recorded for the two conditions. However, the respective metabolic activity of yeast cells on media with different nutritional value is perhaps not the only factor that can be considered for explaining the differences observed at the level of growth rates and GFP profiles. Indeed, the PI uptake profiles were significantly different at the beginning of the batch phase for the two conditions. Yeast cells cultivated on minimal medium displayed a relatively high PI uptake signal, suggesting the occurrence of damaged membranes and viability loss. This loss of viability (see next section for more details) can most likely be attributed to the precultivation phase where cells are exposed to stressful conditions. More specifically, pH dropped significantly for the preculture carried out on minimal medium (pH 4.1 measured at the end of the precultivation phase). However, PI uptake was strongly attenuated during the batch phase and was almost completely absent when the bioreactor was shifted to chemostat mode. At this moment, rich medium and minimal medium displayed similar GFP profiles, suggesting similar physiological states. These results suggest a potential importance of cell population dynamics for the recovery of viability and metabolic activity. These mechanisms, as well as the biological meaning of corresponding subpopulations, will be further discussed in the next section.

5.1.4.2. BIOLOGICAL VERIFICATION OF DIFFERENT YEAST PHENOTYPIC SUB-POPULATIONS

In order to confirm the viability of the different phenotypes observed at the beginning of the cultivation (figure 5.3) performed on minimal medium, cell sorting was performed. Cell suspensions obtained after cell sorting were plated on agar medium for colony counting. For the GFP+PI-, 100% of the cells sorted were recovered by growth on agar. As expected, the GFP-PI+ fraction displayed 0% of recovery. The intermediate subpopulation, i.e. GFP+PI+, displayed various recovery ratios ranging from 60% to 75% (four replicates from two independent reactors). This intermediate subpopulation has been observed in previous studies for different operating conditions and was named red-but-not-dead [10] or fragile [13] subpopulation. The presence of a GFP-PI- subpopulation suggests the presence of another phenotype being not physiologically active (no GFP synthesis), but not permeable to PI according to membrane robustness. However, this sub-population was not able to grow on

agar plates (either in rich or in minimal medium). These cells were also visualized by confocal microscopy and cannot be considered as artifacts (figure 5.3). This new phenotype could be named dead-but-not-red and implies new perspectives at the level of the interpretation of the PI-based test for yeast viability. These cells can be potentially considered as ghosts having lost their genetic material and this way being unable to bind PI.

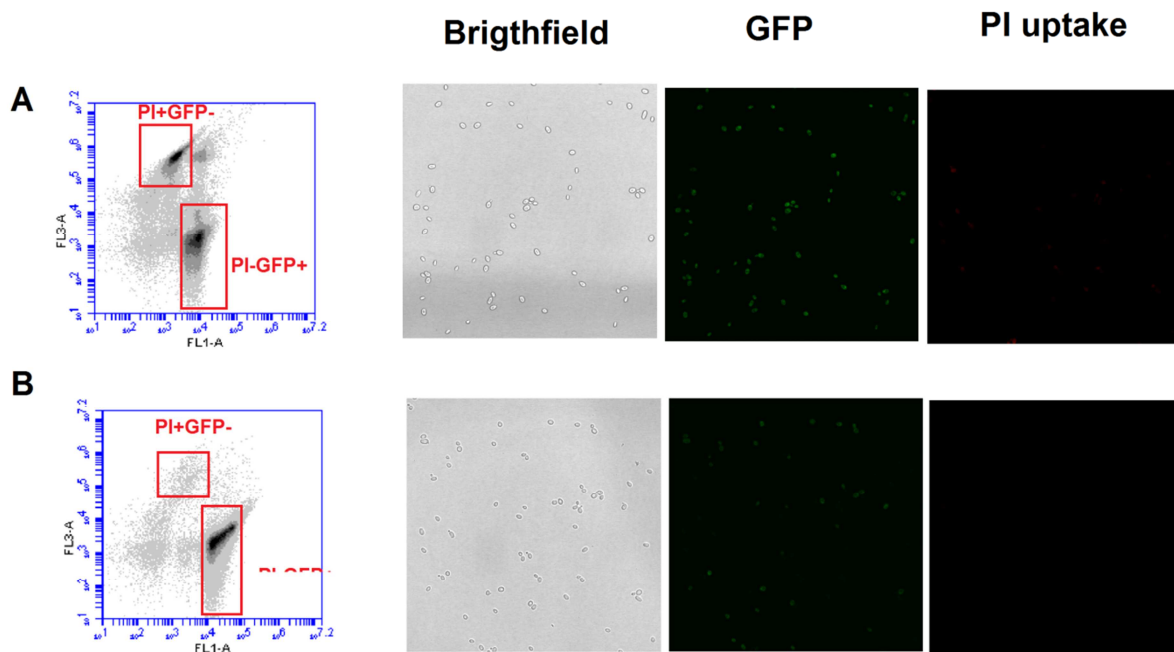


Figure 5.3: Flow cytometry and confocal microscopy analyses of *S. cerevisiae* cultivated A) in minimal medium (Verduyn) and B) in rich medium (YPD). Samples were taken at the beginning of the cultivation (after one hour during the initial batch phase). Flow cytometry results are displayed in dotplots with FL1 channel corresponding to GFP synthesis and FL3 channel corresponding to PI uptake. Only the regions corresponding to the PI-GFP+ subpopulation and PI+GFP- subpopulation are displayed

5.1.4.3. MATHEMATICAL METHODS FOR REAL-TIME QUANTIFICATION OF THE DEGREE OF HETEROGENEITY

In the previous sections, we have shown that on-line FC is an efficient tool for tracking microbial population dynamics during the course of bioreactor operations. However, only the mean fluorescence signal was considered so far and the interest of FC relies on its capability to deliver single cell measurements and thus give access to the measurement of microbial population heterogeneity.

It is quite difficult to express the degree of segregation by considering the whole dotplot data showing the distribution of PI uptake and GFP synthesis related fluorescence (an example of dotplot representation is given a figure 5.4 along with the corresponding frequency histograms). The expression of heterogeneity from these dotplot data depends on appropriate

gating of the different subpopulations, which typically is operator dependent and can lead to systematic errors. In our previous work, we have demonstrated that the ratio between the mean and the median of the distribution of a given fluorescence parameter is a simple way to express the degree of heterogeneity without the need of gating. However, besides this parameter, there are several other indicators of dispersion among a population.

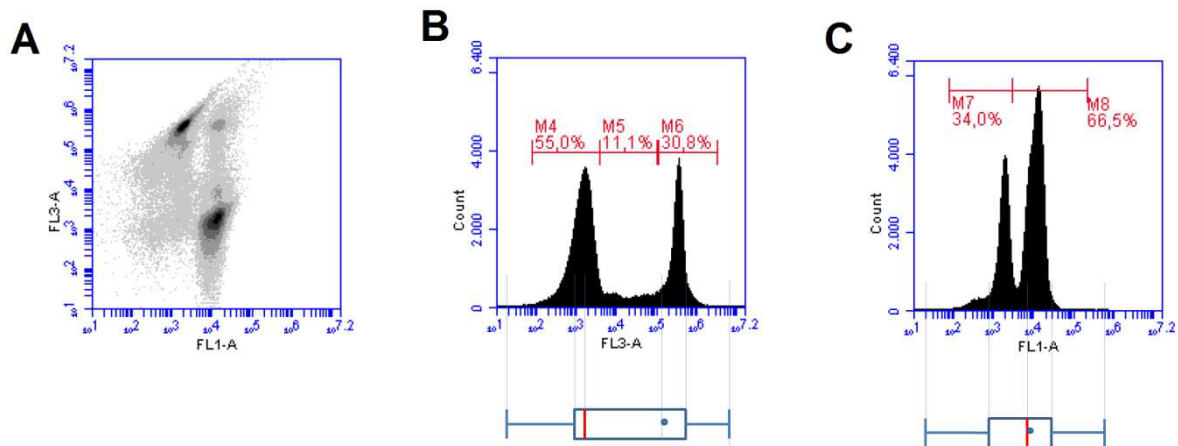


Figure 5.4: A) Dotplot expressing the GFP fluorescence intensity (FL1 channel) in function of PI-uptake related fluorescence (FL3 channel). FC analysis performed after 2 h of cultivation in batch bioreactor on minimal medium. B) Histogram showing the distribution of Pi-uptake related fluorescence among the yeast population. C) Histogram showing the distribution of GFP fluorescence among the yeast population. For each histogram, a boxplot is shown. The box represents the interquartile range, the whiskers represent the range, the bar represents the median and the dot represents the mean.

A boxplot representation can be used to in an efficient and compact way express data distribution and dispersion. With this representation, each distribution, either for PI uptake or for GFP synthesis, can be represented by a box flanked by whiskers. The box represents the interquartile range, i.e. the fraction of the distribution occupied by the central half of the cells belonging to the yeast population. The whiskers represent the range, i.e. the extreme values of the distribution. In addition, the mean (represented by a dot) and the median (represented by a bar inside the box) can also be added to the representation and the boxplot obtained can be compacted on a single figure, leading to a dynamic representation of the dispersion of the yeast population during the process. The principle of this method is illustrated in figure 5.4.

The evolution of the boxplot was computed for the whole set of data corresponding to the development of PI uptake and GFP synthesis during cultivation of yeast either in rich or minimal medium (Figure 5.5 and 5.6). It can be observed that the interquartile range is a good approximation of the cell population heterogeneity, working for both the GFP dispersion and the PI uptake dispersion.

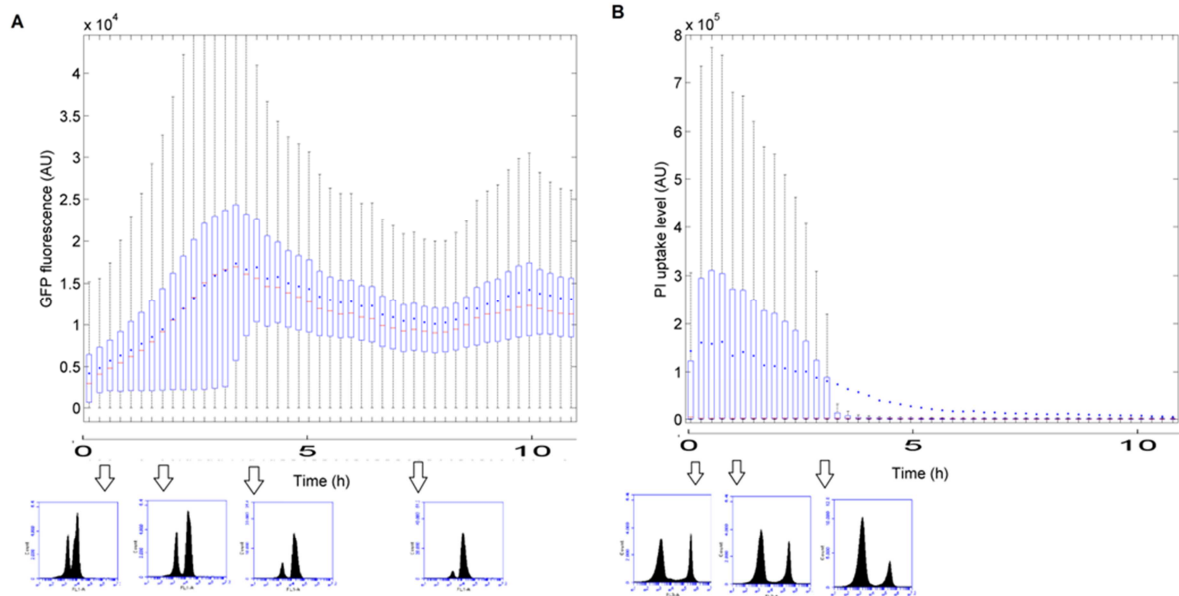


Figure 5.5: Evolution of the boxplot parameters (box : interquartile range ; bar : mean; dot : median; whiskers : extreme values) for the yeast population cultivated on minimal medium (Verduyn). The transition from the batch phase to the chemostat phase at a dilution rate of 0.25 h^{-1} occurs after 8 hours of culture. A) evolution of the GFP synthesis distribution as function of time. B) evolution of the PI-uptake related fluorescence distribution as function of time. For each case, samples were automatically taken each 15 minutes and were analyzed by on-line FC. Representative frequency distribution are shown for some time points

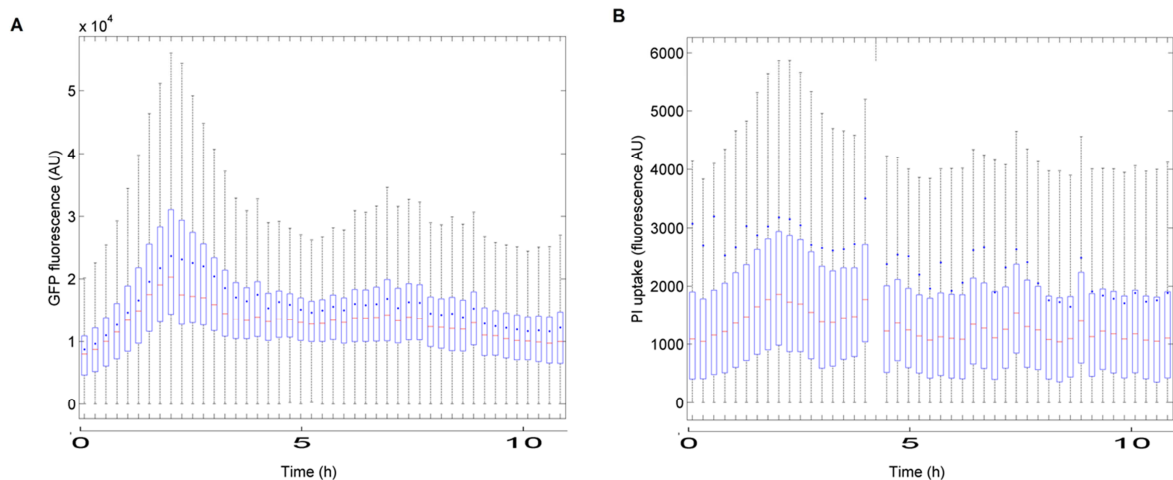


Figure 5.6: Evolution of the boxplot parameters (box : interquartile range ; bar : mean; dot : median; whiskers : extreme values) for the yeast population cultivated on rich medium (YPD). The transition from the batch phase to the chemostat phase at a dilution rate of 0.25 h^{-1} occurs after 8 hours of culture. A) evolution of the GFP synthesis distribution in function of time. B) evolution of the PI-uptake related fluorescence distribution in function of time. For each case, samples were automatically taken each 15 minutes and were analyzed by on-line FC

The mean-to-median ratio has been proposed previously as a good parameter for the quantification of the cell population segregation, rising well above a value of 1 when the population is highly heterogeneous [8]. However, it can be observed that, in the case of the GFP distribution at the beginning of the cultivation carried out on minimal medium, the mean-to-median ratio remained close to one (Figure 5.7), even if the population presented two

distinct peaks at the level of the GFP content. This observation points out the limitation of the mean-to-median ratio approach when the distance between the two subpopulations is too small. Yet, this parameter can be used in the case of subpopulations exhibiting different level of PI staining since PI induces a strong shift in fluorescence when incorporated in membrane-damaged cells.

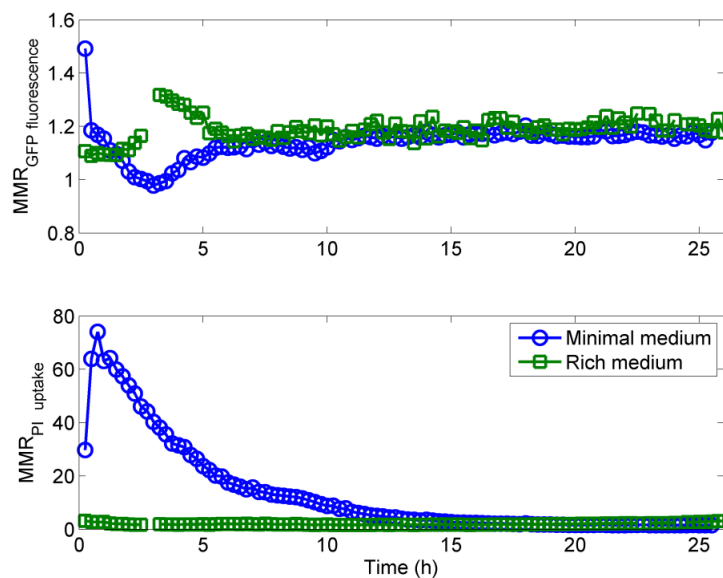


Figure 5.7: Evolution of the mean-to-median ratio (MMR) for GFP synthesis and PI uptake during the cultivation of yeast carried out either in minimal or in rich medium. In theory, when the mean and the median of a distribution are close (MMR close to one), the population can be considered as homogeneous. However, this rule does not apply for GFP distribution of the yeast population at the beginning of the batch phase on minimal medium

5.1.4.4. IMPACT OF PROCESS PERTURBATIONS ON YEAST POPULATION HETEROGENEITY

In large scale bioreactors, yeast cells are exposed to substrate fluctuations due to the lack of mixing efficiency [19]. These environmental fluctuations are known to induce profound physiological changes [20], but the impact at the level of yeast population heterogeneity is still poorly understood [15]. Since these fluctuations can be of importance for yeast based bioprocesses carried out under aerobic conditions (i.e. for starter and probiotics production or for recombinant bioprocesses), a series of fed-batch cultivations were performed and microbial population heterogeneity analyzed using on-line FC combined with boxplot representation of the data. In addition to standard laboratory scale fed-batch cultivations also a scale-down configuration was applied, which aimed at representing the substrate heterogeneities perceived at the cellular level in large scale cultivations. It was composed of

the same vessel as used for the ordinary fed-batch cultivations, but also comprised a recycle loop in which glucose was injected to promote gradient formation. This way, yeast cells crossing the recycle loop are exposed to excess glucose concentrations as those encountered in large-scale fed-batch bioreactors in the zone close to the feeding point [21, 22]. Compared to the batch-chemostat experiments conducted in the previous section, the yeast population will be exposed to different environmental conditions. Indeed, in the fed-batch mode, the entire yeast population is kept during the process, whereas in chemostat mode old cells normally are removed from the system. In addition to the effect of cell age, substrate competition will thus be higher in fed-batch mode as cell density increases. In the scale-down configuration, yeast cell passing through the recycle loop are exposed to local glucose excess, potentially limiting the effect of substrate limitation in this special case [23]. All these additional stimuli are susceptible to affect yeast population heterogeneity [24]. A special emphasis will thus be given to the quantification of yeast population heterogeneity for the fed-batch bioreactor cultivations considered in this work.

The mean fluorescence profiles showed the same overall trends as for the batch to chemostat transition experiments discussed previously (Figure 5.8). Anew, the process was slower in minimal medium than in rich medium on the basis of the peak of GFP fluorescence during the batch phase. However, contrary to the earlier experiments, cells cultivated on rich medium exhibited an increase of PI uptake when the culture was shifted to fed-batch mode. This observation is in accordance with the trade-off principle advanced in order to explain the robustness of yeast to stress response [25, 26], and by which yeast has to choose between fast growth or stress resistance. According to this principle, yeast grown on rich medium display a faster growth, but are more sensitive to stress arising during the fed-batch phase (i.e., cell accumulation, competition for the substrate etc).

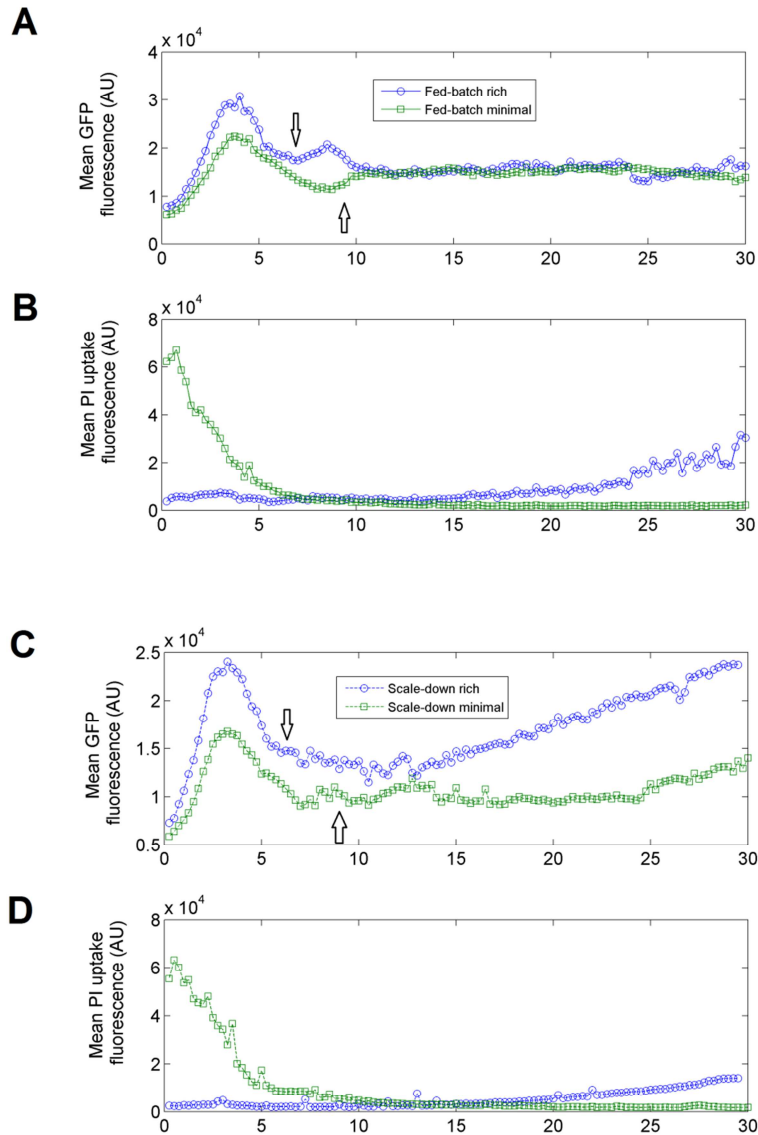


Figure 5.8: Evolution of A) the mean GFP fluorescence intensity under the *rpl22a* ribosomal promoter in the case of fed-batch cultivations carried out either on rich (YPD) or minimal (Verduyn) medium B) the mean PI uptake related fluorescence in the case of fed-batch cultivations carried out either on rich (YPD) or minimal (Verduyn) medium C) the mean GFP fluorescence intensity under the *rpl22a* ribosomal promoter in the case of cultivations carried out in scale-down reactors either on rich (YPD) or minimal (Verduyn) medium D) the mean PI uptake related fluorescence in the case of cultivations carried out in scale-down reactor either on rich (YPD) or minimal (Verduyn) medium. For each case, at least 40,000 microbial cells were considered to compute the mean. Samples were taken each 15 minutes by using on-line FC. The transition from the batch phase to the fed-batch phase is indicated by an arrow.

It is also interesting to note that this phenomenon was attenuated when yeasts were grown in the scale-down reactor system on the same medium. Previous results have pointed out the stimulatory effect of the scale-down system where cells are exposed to stress at a given frequency (generally when crossing the recycle loop), giving them the opportunity to develop stress response strategies [27, 28].

What is of particular importance in the context of this work is that this increase of the mean PI uptake was accompanied by an increase of the segregation of the yeast population, not only on the basis of the PI uptake, but also at the level of GFP synthesis (Figure 5.9). This observation points out the fact that cells grown on rich medium exhibit a reduced fitness when exposed to scale-down conditions. It will thus be interesting to further explore this set of data for evaluation of methods for the quantification of microbial heterogeneity under these process relevant conditions.

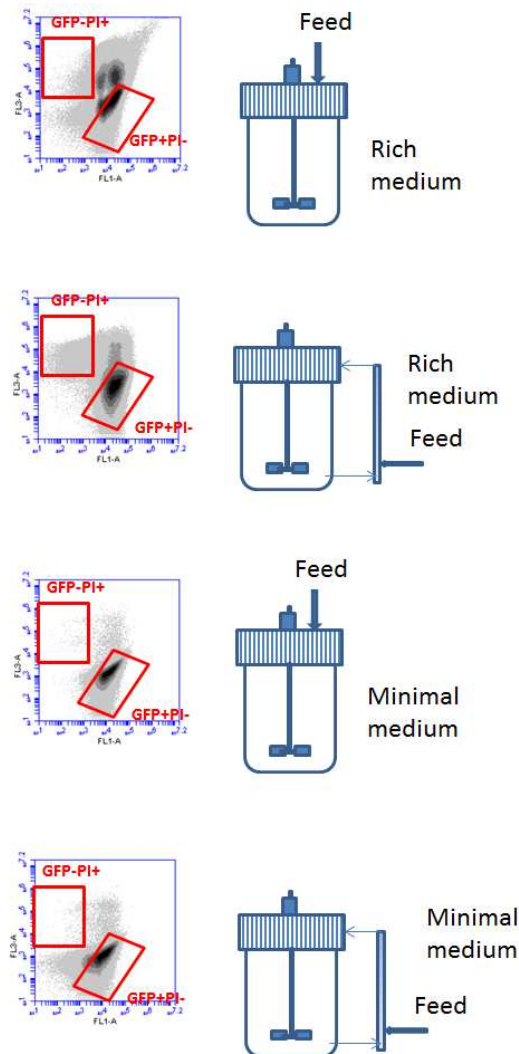


Figure 5.9: Flow cytograms at the end of the cultivation for the standard fed-batch and the scale-down bioreactor carried-out either on rich or minimal medium. Flow cytograms are displayed in dotplot format showing the FL1 channel (GFP fluorescence) as function of the FL3 channel (PI uptake). Only the regions showing the GFP+PI- and GFP+PI+ subpopulations are displayed. The results point out the fact that cells growing on rich medium displayed reduced fitness to the conditions imposed by the fed-batch mode as shown by a progressive rise of the PI uptake by cells located in the GFP+PI- region

Boxplot analysis was performed for the last 7 hours of the fed-batch cultivation carried out on rich medium (Figure 5.10 and 5.11), where a segregation of the population was seen for both the GFP content and PI content. In the case of GFP (Figure 5.10) the segregation led to two

distinct subpopulations emerging from the GFP+PI- region. These two subpopulations were actually located in the GFP+PI+ region and corresponded to yeast cells exhibiting distinct budding index (these two subpopulations exhibit different forward scatter (FSC) value correlated to cell size of budding index in the case of yeasts [29], results not shown). However, the two subpopulations were too close in terms of GFP intensity and the segregation could not be parameterized either on the basis of the mean-to-median ratio nor on the amplitude of the interquartile range. This observation points out the fact that segregation leading to small differences in fluorescence for subpopulations cannot be easily detected on the basis of standard statistical analysis and advanced methods are needed in this case. This is an important finding related to the implementation of on-line FC at the level of bioreactor control loops since this case study is industrially relevant.

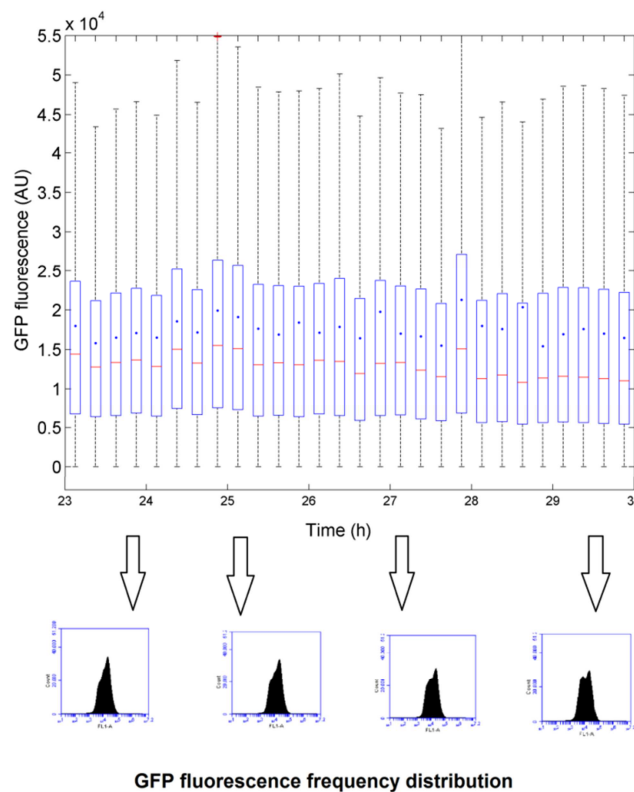


Figure 5.10: Evolution of the boxplot representation (box: interquartile range ; bar : mean; dot : median; whiskers : extreme values) for the GFP distribution among the yeast population during the last 7 hours of the cultivation carried out in fed-batch bioreactor on rich (YPD) medium. During this phase, yeast cells were exposed to stress and exhibited a progressive increase of the population segregation for the GFP content as displayed on the frequency distribution acquired by on-line FC

The same computations were carried out for the PI uptake parameter (Figure 5.11). In this case, the segregation was more marked and led to a clear segregation that could be quantified both on the basis of the mean-to-median ratio and the amplitude of the interquartile range.

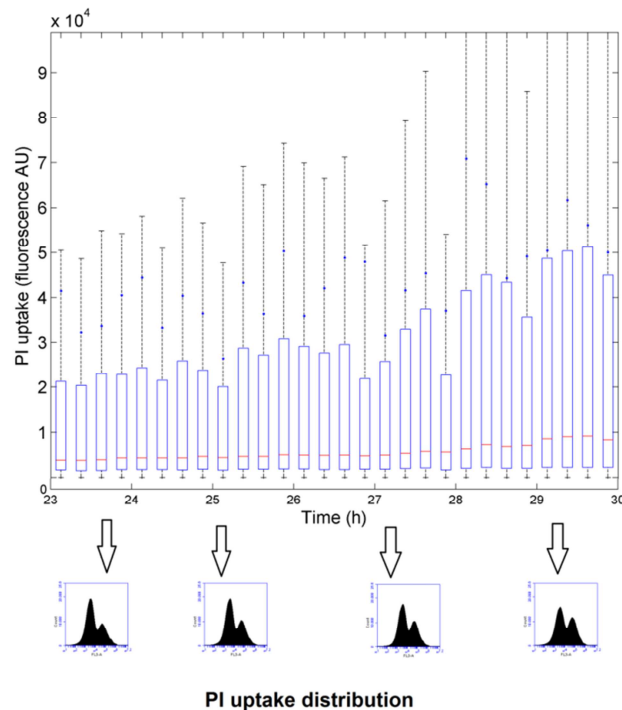


Figure 5.11: Evolution of the boxplot representation (box: interquartile range ; bar : mean; dot : median; whiskers : extreme values) for the PI uptake distribution among the yeast population during the last 7 hours of the cultivation carried out in fed-batch bioreactor on rich (YPD) medium. During this phase, yeast cells were exposed to stress and exhibited a progressive increase in PI uptake as displayed on the GFP frequency distribution acquired by on-line FC

5.1.5. CONCLUSIONS

The main goal of this work was the evaluation of different methods aimed at expressing the cell population heterogeneity. Indeed, on-line flow cytometry allows for a fast and reliable monitoring of cell population heterogeneity directly inside a bioreactor [7, 8, 30], but new computational tools are needed in order to quantify the degree of heterogeneity and the appearance of specific subpopulations. In this context, it is important to find the simplest parameters that can be extracted directly from the different FC data and expresses the intensity of segregation in a reliable way. The simplest parameter is the mean-to-median ratio, but its use is limited to specific cases, i.e. it works quite well for PI stained cells since the difference between PI negative and PI positive cells is significant, but it does not work for the loss of GFP since the difference between the corresponding sub-populations is less marked. In a second attempt, a boxplot analysis can be performed, but require more computational effort. However, all the relevant dispersion parameters, i.e. mean, median and interquartile range, can be displayed in a compact format allowing the visualization of the process dynamics. The evolution of the interquartile range leads indeed to a clear visualization of the dispersion of

the population, but also has limitations when subpopulations only are slightly segregated as demonstrated in the experiment carried out in fed-batch mode on rich medium. These observations point out the fact that one needs to understand the segregation mechanisms for the applied fluorescent reporters, to judge whether simple mathematical tools may be applied or if more sophisticated computational tools are needed for the quantification of the microbial population segregation.

5.1.6. ACKNOWLEDGEMENT

FD and AL gratefully acknowledge the Belgian fund for scientific research (FRS-FNRS) for financial support through a FRFC grant and a FRIA PhD grant respectively. TJ was supported by ERA-IB (ERA-NET Industrial Biotechnology) in the frame of the project “Targeting population heterogeneity at microscale for robust fermentation processes” (project number EIB.08.031).

5.1.7. REFERENCES

1. Joux, F., Lebaron, P., Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and infections*, 2000. 2: p. 1523-1535.
2. Hammes, F., Berney, M., Egli, T., Cultivation-independent assessment of bacterial viability. *Advances in biochemical engineering/Biotechnology*, 2011. 124: p. 123-150.
3. Diaz, M., Herrero, M., Garcia, L.A., Quiros, C., Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical engineering journal*, 2010. 48: p. 385-407.
4. Patkar, A., Vijayasankaran, N., Urry, D.W., Srienc, F., Flow cytometry as a useful tool for process development : rapid evaluation of expression systems. *Journal of biotechnology*, 2002. 93: p. 217-229.
5. Abu-Absi, N.R., Zamamiri, A., Kacmar, J., Balogh, S.J., Srienc, F., Automated flow cytometry for acquisition of time-dependent population data. *Cytometry Part A*, 2003. 51A: p. 87-96.
6. Van Nevel, S., Koetzsch, S., Weilenmann, HU, Boon, N, Hammes, F., Routine bacterial analysis with automated flow cytometry. *Journal of microbiological methods*, 2013. 94(2): p. 73-76.
7. Arnoldini, M., Heck, T, Blanco-Fernández, A, Hammes, F., Monitoring of dynamic microbiological processes using real-time flow cytometry. *Plos One*, 2013. 8(11): p. e80117.
8. Broгнаux, A., Han, S, Sørensen, SJ, Lebeau, F, Thonart, P, Delvigne, F., A low-cost, multiplexable, automated flow cytometry procedure for the characterization of microbial stress dynamics in bioreactors. *Microbial cell factories*, 2013. 12(1): p. 100.
9. Shi, L., Günther, S, Hübschmann, T, Wick, LY, Harms, H, Müller, S., Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry Part A*, 2007. 71(8): p. 592-598.
10. Davey, H.M., Hexley, P., Red but not dead ? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *environmental microbiology*, 2011. 13(1): p. 163-171.
11. Delvigne, F., Broгнаux, A., Francis, F., Twizere, J.C., Gorret, N., Sorensen, S.J., Thonart, P., Green Fluorescent Protein (GFP) leakage from microbial biosensors provides useful information for the estimation of the scale-down effect. *Biotechnology journal*, 2011. 6: p. 968-978.
12. Broгнаux, A., Neubauer, P., Twizere, J.C., Francis, F., Gorret, N., Thonart, P., Delvigne, F., Direct and indirect use of GFP whole cell biosensors for the assessment of bioprocess performances: Design of milliliter scale-down bioreactors. *Biotechnology progress*, 2012. 29(1): p. 48-59.

13. Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., Tesniere, C., A 'fragile cell' sub-population revealed during cytometric assessment of *Saccharomyces cerevisiae* viability in lipid-limited alcoholic fermentation. *Letters in applied microbiology*, 2012. 55: p. 338-344.
14. Davey, H.M., *Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology*. Applied and environmental microbiology, 2011. 77(16): p. 5571-5576.
15. Carlquist, M., Fernandes, R.L., Helmark, S., Heins, A.L., Lundin, L., Sørensen, S.J., Gernaey, K.V., Lantz, A.E., Physiological heterogeneities in microbial populations and implications for physical stress tolerance. *Microbial cell factories*, 2012. 11: p. 94.
16. Lencastre Fernandes, R., M., Nierychlo, L., Lundin, A.E., Pedersen, P.E., PuentesTellez, A., Dutta, M., Carlquist, A., Bolic, D., Schapper, A.C., Brunetti, S., Helmark, A.-L., Heins, A.D., Jensen, I., Nopens, K., Rottwitt, N., Szita, J.D., van Elsas, P.H., Nielsen, J., Martinussen, S.J., Sørensen, A.E., Lantz, K.V., Gernaey, Experimental methods and modeling techniques for description of cell population heterogeneity. *Biotechnology advances*, 2011. 29: p. 575-599.
17. Verduyn, C., et al., Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, 1992. 8(7): p. 501-17.
18. BD Biosciences. Guidelines for journal authors using the BD Accuri C6. 2013 [cited 2013 03/10/2013]; http://static.bdbiosciences.com/documents/accuri/BD_Accuri_Journal_Guidelines_TechBulletin.pdf.
19. Neubauer, P. and S. Junne, Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Current opinion in biotechnology*, 2010. 21(1): p. 114-21.
20. Lara, A.R., Galindo, E., Ramirez, O.T., Palomares, L.A., Living with heterogeneities in bioreactors - Understanding the effects of environmental gradients on cells. *Molecular biotechnology*, 2006. 34: p. 355-381.
21. Delvigne, F., Lejeune, A., Destain, J., Thonart, P., Modelling of the substrate heterogeneities experienced by a limited microbial population in scale-down and in large-scale bioreactors. *Chemical engineering journal*, 2006. 120: p. 157-167.
22. Takors, R., Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions. *Journal of biotechnology*, 2012. 160: p. 3-9.
23. Delvigne, F., Lejeune, A., Destain, J., Thonart, P., Stochastic models to study the impact of mixing on a fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology progress*, 2006. 22: p. 259-269.
24. Sumner, E., Avery, S.V., Phenotypic heterogeneity: differential stress resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 2002. 148: p. 345-351.
25. Zakrzewska, A., van Eikenhorst, G., Burggraaff, J.E., Vis, D.J., Hoefsloot, H., Delneri, D., Oliver, S.G., Brul, S., Smits, G.J., Genome-wide analysis of yeast stress survival and tolerance acquisition to analyze the central trade-off between growth rate and cellular robustness. *Molecular biology of the cell*, 2011. 22: p. 4435-4446.
26. Molenaar, D., van Berlo, R., de Ridder, D., Teusink, B., Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Molecular system biology*, 2009. 5: p. 1-10.
27. Hewitt, C.J., Nienow, A.W., The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes, in *Advances in applied microbiology*. 2007, Vol. 62. p. 105-135.
28. Reijnga K.A., B.B.M., van der Weijden C.C., Westerhoff H.V., Training of yeast cell dynamics. *FEBS Journal*, 2005. 272: p. 1616-1624.
29. Porro, D., Vai, M., Vanoni, M., Alberghina, L., Hatzis, C., Analysis and modeling of growing budding yeast populations at the single cell level. *Cytometry Part A*, 2009. 75(2): p. 114-120.
30. Broger, T., Odermatt, R.P., Huber, P., Sonnleitner, B., Real-time on-line flow cytometry for bioprocess monitoring. *Journal of biotechnology*, 2011. 154(4): p. 240-247.

CHAPITRE 5.2. UTILISATION DE SOUCHES DE LEVURES EXPRIMANT UNE PROTEINE FLUORESCENTE

Extrait de :

Lejeune A., Delvigne F., Thonart P., 2013, *Physiological response of yeast to process perturbations: a mini-bioreactor approach*, *Cerevisia*, **38** (1), 15-19

5.2.1. ABSTRACT

Large-scale production of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is difficult to control, considering the drop of mixing and mass transfer efficiency during scale-up. The drop of hydrodynamic efficiency in large-scale bioreactors induces the formation of heterogeneities, i.e. mainly substrate and dissolved oxygen in process conditions. These extracellular fluctuations have several impacts at the level of the physiology of microorganisms, from metabolic shift to specific gene expression (stress response). Microbial cell responses to extracellular fluctuations are actually not fully understood. In this work, we propose to reproduce the main extracellular fluctuations at the level of a mini bioreactor platform. These mini-reactors are shake flasks equipped with dissolved oxygen probes. The cultures are realized with different fed-batch control strategies. A scale-down approach has been developed by considering slow release techniques and intermittent feeding, in order to reproduce the glucose and dissolved oxygen fluctuations experienced in large-scale reactors. The mini-reactor has been used to screen the response of several green fluorescent protein (GFP) reporter strains (*adh2*, *tps2*, *pdc6* and *hxt2*). The GFP content of cells has been determined by flow cytometry in order to take into account population heterogeneity. In front of these results, the methodology presented in this work can be proposed as a scale-down tool.

5.2.2. INTRODUCTION

Industrial production of microorganisms is difficult to optimize due to several limiting phenomenon that appears with the increase of volume. The increase of mixing time in large-scale reactors induces concentration gradients (nutriments, oxygen, pH, temperature, etc.) in the growth medium of microorganisms. They have to adapt their metabolism to withstand these changing conditions. The shift of metabolism causes several perturbations in the growth of microorganisms. The cells cannot growth as much and as fast than in ideal conditions of culture. Drop of yield and increase of fermentation time are two important consequences. The study of these perturbations can be realized in scale-down reactors. These reactors are known to permit the representation of hydrodynamic conditions of the industrial scale in a laboratory reactor. It is an interesting tool for the scale-up [1]. Different geometry of scale-down reactor (SDR) can be used. They can be composed by one or two compartments. The two compartments SDR have been widely used to study the hydrodynamic conditions at the industrial scale [2]. These reactors comprised a mixed part, usually a well-mixed reactor, and

a second part that can be mixed or not and the medium circulate between the two parts thanks to a peristaltic pump [3, 4]. This type of configuration has been used to study the impact of glucose feeding in culture of *Saccharomyces cerevisiae* [5] or *Escherichia coli* [4, 6, 7]. Delvigne et al. [8] has shown that this system can mimic concentration gradients as they can be observed in a reactor of high volume with the same impact on yield [9]. The choice of the geometry of the second part depends on the type of microorganism and on the limiting phenomenon studied [10-12]. The one compartment SDR is a classic reactor in which the operational growth conditions are changing with time. The cells are therefore faced with growing conditions that change over time. A gradient concentration of nutriment can be mimicked by adding the nutriment by pulse in the medium. So the cells encountered high concentration and low concentration zones when they circulate in the reactor [2].

In this paper, we used a single compartment scale-down reactor in order to study the impact of a glucose concentration gradient on *S. cerevisiae* cultures. The mini-bioreactor platform is composed by shake flasks equipped with non-invasive dissolved oxygen probes. This system shows several advantages: easy-to-use, non-expensive and permit to study several parameters and/or microorganisms in the same time. Operational parameters of mini bioreactor platform are described in the literature [13-15]. The experimental set-up is presented at figure 5.12.

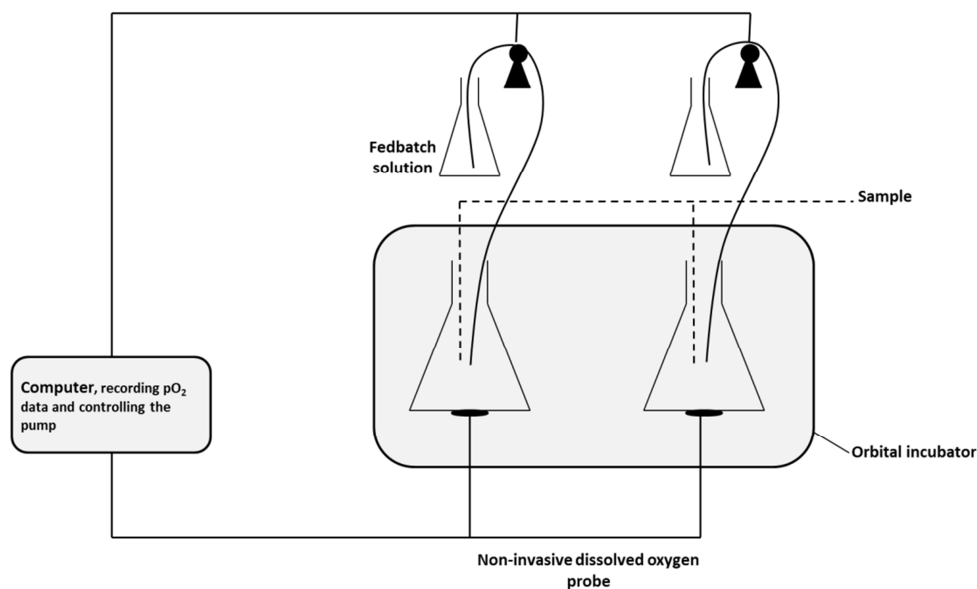


Figure 5.12 : Mini bioreactor platform

The study was made in mini-bioreactors where the feeding is made intermittently. The mini-bioreactors are composed of shake flasks equipped with dissolved oxygen probes. The changing growth conditions are realized by the application of intermittent glucose feeding.

This fed-batch strategy permits to mimic the glucose and dissolved oxygen fluctuations experienced by cells in large-scale reactor. As shown at figure 5.13, the pump works intermittently. It adds glucose to growth medium on the basis of a frequency calculated for each test (part A). When the pump adds glucose, dissolved oxygen is depleted according to the respiration of substrate. When the pump turns off, the cells use the remaining glucose and when it is exhausted, the rate of dissolved oxygen in the medium increases (part B). This system permits to mimic the gradients of glucose and oxygen appearing in large-scale bioreactors (part C).

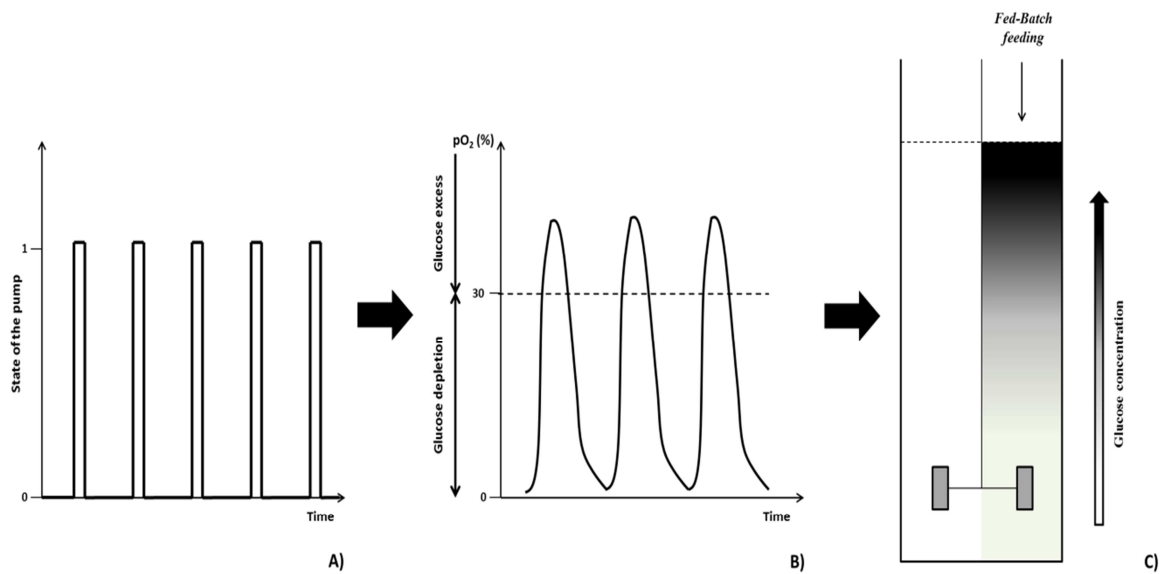


Figure 5.13 : A: Diagram of heterogeneities zones in an industrial reactor, B: Diagram of the feeding strategy used in the experiments (0: pump OFF, 1: pump ON), C: Evolution of dissolved oxygen during a fed-batch of *S. cerevisiae*

In response to these perturbations, all the cells are not in the same physiological states. The heterogeneity of the population can be observed by following the expression of a GFP protein expressed by cells in particular conditions. The GFP content of cells can be measured by flow cytometry technique. It is a very useful technique in this case since it permits to analyze rapidly the individual GFP content of cells [16]. The experimental strategy presented here has been used to screen the response of several green fluorescent protein (GFP) reporter strains: ADH2, TPS2, PDC6 and HXT2. These strains came from the Yeast GFP Clones Collection of Invitrogen and were chosen for their behaviour toward glucose concentration. The first target gene selected is ADH2. There are five genes that encode alcohol dehydrogenases in *S. cerevisiae*: ADH1 to ADH5 but ADH2 is the only one that converts ethanol to acetaldehyde [17, 18]. The others reduced acetaldehyde to ethanol during glucose fermentation [19]. When

the cells encounter a depletion of glucose, *adh2p* permit the initiation of the first step of ethanol consumption [20] A cell without *ADH2* cannot grow on ethanol [21]. *TPS2* encodes for the phosphatase subunit of the trehalose-6-phosphatase synthase complex. Its expression, induced by stress conditions, causes the synthesis of a storage carbohydrates, trehalose [22, 23]. *PDC6* encodes an isozyme of pyruvate decarboxylase, catalyzing the degradation of pyruvate into acetaldehyde and carbon dioxide. It is a key enzyme of the alcoholic fermentation. The protein *pdc6p* is not expressed during glucose fermentation [24]. Finally *HXT2* is a high affinity glucose transporter. Its expression is induced under glucose depletion [25, 26]. Coupling the use of mini-bioreactors with flow cytometry techniques, measuring the content of GFP cells, provides many information in a short time. Furthermore, the cells labeled with GFP can be considered as physiological tracers, enabling us to monitor the state of cells during the fermentation.

5.2.3. MATERIAL AND METHODS

5.2.3.1. FERMENTATION IN MINI-BIORECTORS AND STRAINS DESCRIPTIONS

Mini-bioreactors are shake flasks (1 l), equipped with a dissolved oxygen sensor. The culture is incubated in an orbital incubator (Orbi-Safe, Sanyo) at 30 °C and at 110rpm of orbital speed. The dissolved oxygen is recorded using the software “Oxy 4v2”. The GFP strains are *S. cerevisiae* strains from the Yeast GFP Clones Collection of Invitrogen (Tableau 5.1).

Tableau 5.1 : Presentation of the GFP strains used in this work and their corresponding target genes

GFP Strain	Target Gene
YMR303C	ADH2
YDR074W	TPS2
YGR087C	PDC6
YMR011W	HXT2

The medium used was the CFM mineral medium, composed of (all compounds are expressed in $g\ l^{-1}$): KH_2PO_4 , 6.0; $(NH_4)_2SO_4$, 12.0; $MgSO_4$, 1.0; EDTA, 0.015; $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0.0045; $MnCl_2 \times 4H_2O$, 0.001; $CoCl_2 \times 6H_2O$, 0.0003; $CuSO_4 \times 5H_2O$, 0.0003; $Na_2MoSO_4 \times 2H_2O$, 0.004; $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.0045; $FeSO_4 \times 7H_2O$, 0.003; H_3BO_3 , 0.001; d-biotin, 0.1; d,l-pantothenic acid, 0.001; nicotinic acid, 0.001; myo-inositol, 0.0025; thiamin, 0.001; pyridoxin, 0.001; para-aminobenzoic acid, 0.0002. Glucose and yeast extract were added at final concentration of $5\ g\ l^{-1}$ each. Mini-bioreactors were filled with 200 ml of CFM medium, and were inoculated with 50 ml of a 10 h preculture (30 °C, 110 rpm). The fed-batch solution was added after 15 h and was composed of (all compounds are expressed in $g\ l^{-1}$): $(NH_4)_2SO_4$,

10.0; KH_2PO_4 , 5.0; MgSO_4 , 0.9; yeast extract, 5.0. Glucose was added at final concentration of 30 g l^{-1} . The glucose addition was made using a MatLab® program. The profile was calculated using older data set. Two feeding strategies were used: one leading to glucose excess in the medium and one to no glucose excess in the mini-bioreactor which can be considered as a reference. The comparison of these two strategies permits to estimate the impact of poor mixing conditions on the expression of the GFP proteins by the strains.

5.2.3.2. FERMENTATION FOLLOW-UP

Different measurements were realized on samples taken during the fermentation tests in mini-bioreactors. The growth of the yeast GFP strains was measured by optical density measurement ($\lambda = 540 \text{ nm}$, spectrophotometer GENESYS 2). Biomass concentration has been determined by a correlation between optical density and dry matter. Glucose concentration was determined by enzymatic method (YSI model 2700 Select).

The analysis of the GFP expression level has been performed with a FACscan (Becton Dickinson) flow cytometer. Samples are taken directly from the reactor and diluted in $900 \mu\text{l}$ of phosphate buffer solution (PBS) and $100 \mu\text{l}$ of a cycloheximide solution (1 mg ml^{-1}) in order to stop protein synthesis. For each measurement, 30,000 cells are analyzed GFP is excited at 488 nm and emission signals are collected by using filters at 530 nm . The results have been analyzed by the CellQuest (Becton Dickinson) software and are subsequently exported to WinMDI (R) and MatLab (R) for further analysis.

5.2.4. RESULTS AND DISCUSSION

5.2.4.1. MINI-BIOREACTOR PERFORMANCES

As said previously, the mini-bioreactors considered in this work are based on shake flasks equipped with a dissolved oxygen probe. During the fermentation, several samples are taken from the flasks and the biomass and glucose concentrations are measured. The results obtained for the four strains during tests without glucose excess are shown in Fig. 5.14.

The glucose concentration decreases rapidly and stays at a zero level for the four fermentation test. The growth of cells is progressive and follows the addition of glucose. The glucose is not in excess in the medium and the cultures can be considered as ideal: the cells growth correctly with an oxidative metabolism.

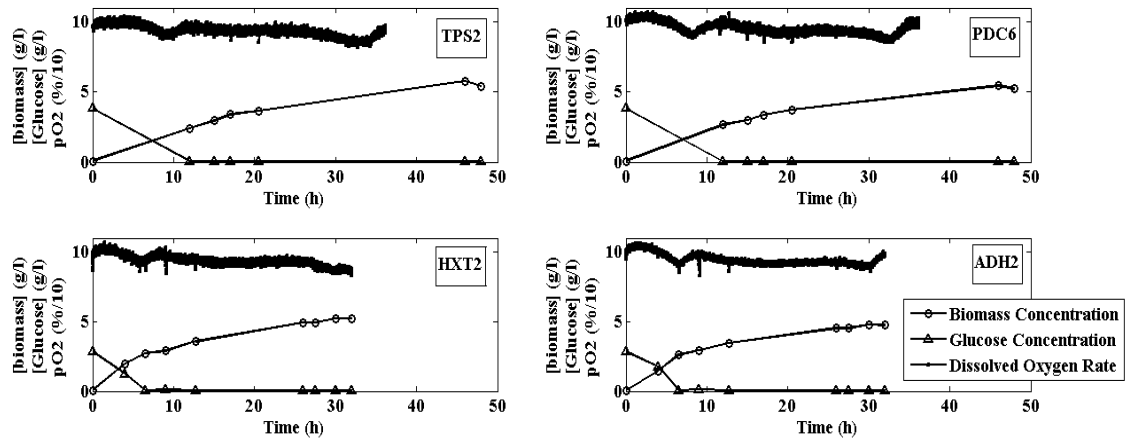


Figure 5.14 : Evolution of biomass concentration (circle), glucose concentration (triangle) and dissolved oxygen rate (square) for the four GFP strain (TPS2, PDC6 HXT2 and ADH2) during fermentation with no glucose excess

Moreover the dissolved oxygen levels remained constant, close to 100%, in the four fermentations, indicating that dissolved oxygen is not limiting. Similarly the pH remains close to the initial value, 5.5 (data not shown). The evolution of the same parameters but in case of a glucose excess in the medium can be seen at Fig. 5.15.

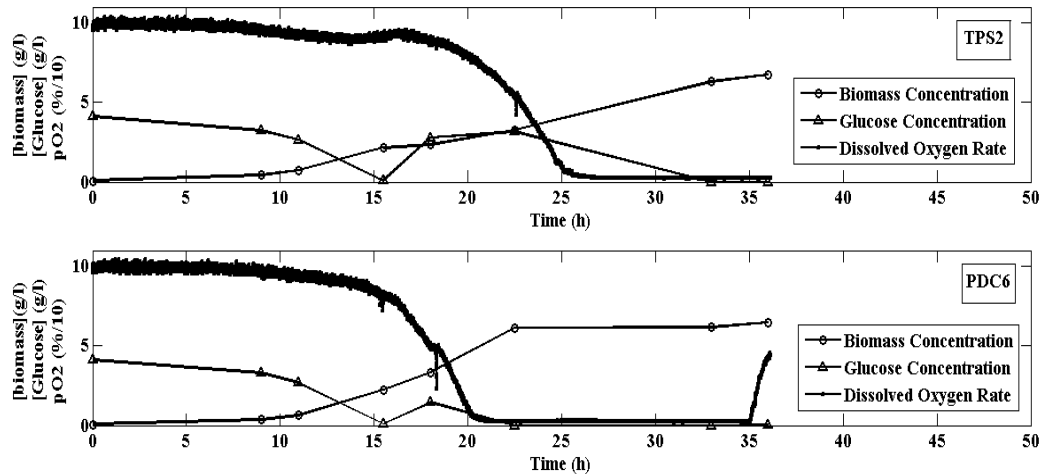


Figure 5.15 : Evolution of biomass concentration (circle), glucose concentration (triangle) and dissolved oxygen rate (square) for two GFP strain (TPS2 and PDC6) during fermentation with glucose excess

The feeding is more rapid and the cells cannot use it as well as in the first case. The capacity of cells to convert glucose in biomass is altered. The dissolved oxygen rate decrease rapidly when the glucose begins to be in excess and re-increases when the glucose is consumed.

The mini-bioreactors platform is a useful tool to study different hydrodynamic conditions in small volume. It is a simple and rapid way to reproduce with little material a high range of

environmental conditions. In this study, we only act on the feeding pump rate but the platform can be also used to study environmental perturbations in dissolved oxygen, pH, etc. This strategy can be compared to those using scale-down reactors with two compartments. In this SDR type, different hydrodynamic conditions have been created and we observed the scale-down effect [9].

5.2.4.2. STUDY OF PHYSIOLOGICAL PARAMETERS

In the previous section, we see the mini-bioreactor performances but monitoring these parameters is not enough to understand the effect of environmental perturbations on the cells. We decide to study the impact of glucose excess with different strains of yeast containing a gene encoding for a green fluorescent protein. This gene is under the influence of promoter triggering the synthesis of the target gene. So the recombinant protein is expressed together with the gene of interest (in this case TPS2, PDC6, Hxt2 or ADH2).

When the gene of interest is expressed, the cells produce the fluorescent protein inducing the fluorescence of cells. The fluorescence intensity depends on the amount of recombinant protein produced and each cell has its own fluorescence intensity. This intensity can be observed thanks to a fluorescence microscope but it is more precise to measure it by flow cytometry. The result is a histogram showing the number of cells according to their intensity. Fig. 5.16 shows an example of results obtained by flow cytometry for the TPS2 strain at three main stages of the fermentation: lag, exponential and stationary stages in the case of an ideal culture, i.e. without glucose excess in the medium. We can see that the GFP is produced during glucose fermentation. So the TPS2 gene is produced too. The cells are then capable of synthesizing trehalose and can convert glucose to energy and protection reserves.

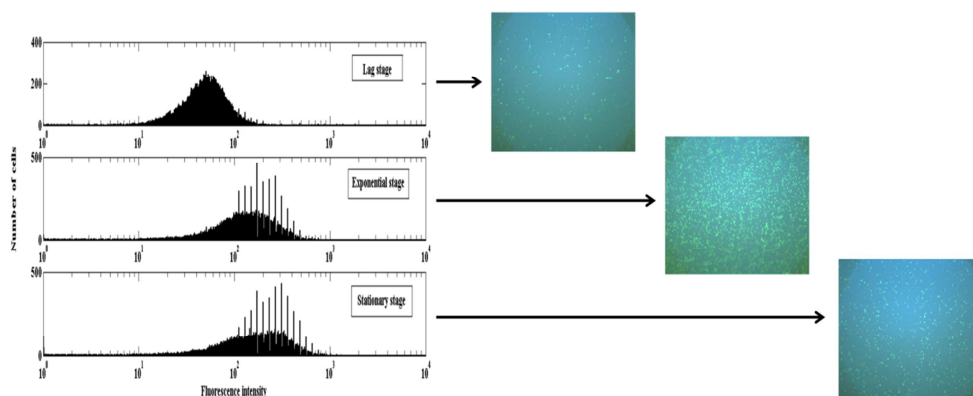


Figure 5.16 : GFP intensities for the three main stages of yeast growth: lag, exponential and stationary stages and Pictures of the three samples presented at figure 4, showing the GFP induction

A MatLab® program has been used to calculate the sum of the fluorescence intensities for each sample. This sum is then expressed as a function of time. Fig. 5.17 shows the results for the four strains. In case of no glucose excess, only the TPS2 gene has been expressed. This gene encodes for a protein that step in the trehalose synthesis. During ideal fermentation, cells are capable to synthesize trehalose in order to constitute reserves. These reserves can, for example, serve in the case of freeze drying treatment to protect the cells. The second part of Fig. 5.17 shows that in case of glucose excess in the medium, the TPS2 gene is not expressed. So the cells do not synthesize trehalose and are therefore less resistant to subsequent stress. The expression of the PDC6 gene stays at a basal value in the two cases studied. In fact, this gene is not expressed during the glucose fermentation. The expression of HXT2 and ADH2 genes stay also at a basal value in case of no glucose excess in the medium. For the ADH2 gene, it is logical because it permit to convert ethanol to acetaldehyde. We are in presence of an ideal fermentation on glucose, the ethanol production is then limited. ADH2 has no reason to be expressed.

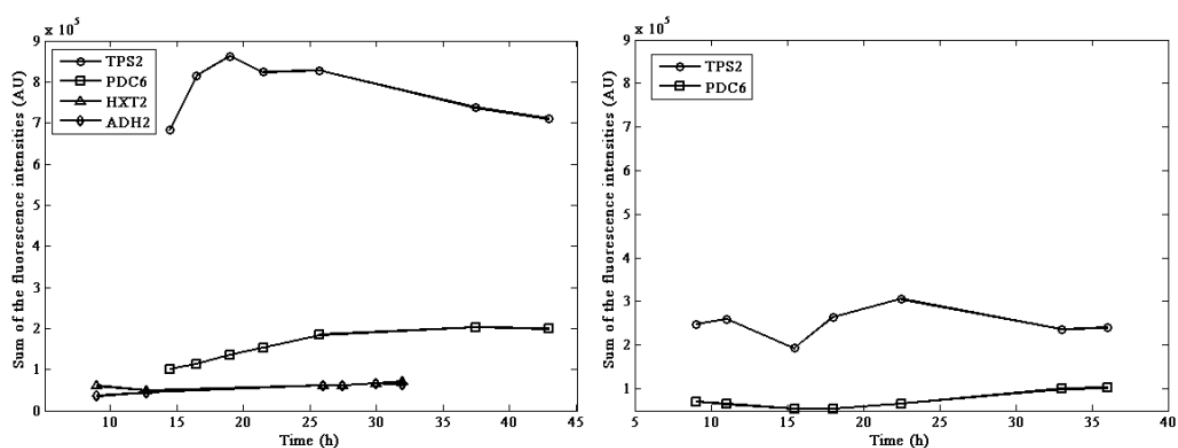


Figure 5.17 : Evolution of the GFP contents of the cells for the four GFP strains (TPS2, PDC6, HXT2 and ADH2) in case of no glucose excess (left side) and in case of glucose excess (right side)

In front of these results, GFP strains are an interesting tool to screen the response of cells to various environmental conditions. Then the combination of these strains with the mini-bioreactors platform becomes a complete tool to study a high range of environmental conditions and their impacts at different levels of the microorganisms metabolism. In the case of *S. cerevisiae*, the GFP database is complete enough so that we can obtain many results on the behaviour of this yeast encountered hydrodynamic conditions close to those of industrial reactors.

5.2.5. CONCLUSION

The methodology presented in this work can be proposed as a scale-down tool. The use of mini-bioreactors permits the creation of a large game of different stress conditions. A high number of data can be acquired in a short time. It is a simple technique that requires little equipment and investment. Its use is easy and many strains can be observed in parallel. By coupling this method of fermentation to techniques that estimate the physiological state of cells, the effects of scale-up can be understood to the level of each cell. The GFP strains are very useful in this case. It is possible to study different strains in the same time to obtain different response of the gene expression when the cells encounter different hydrodynamic conditions. Our approach is focused on the effect of glucose excess in the medium but it can be extended to other stresses and other microorganisms.

5.2.6. REFERENCES

1. George, S., et al., *Comparison of the Baker's yeast performance in laboratory and production scale*. Bioprocess Engineering, 1998. **18**: p. 135-142.
2. Neubauer, P. and S. Junne, *Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses*. Current Opinion in Biotechnology, 2010. **21**(1): p. 114-121.
3. Namdev, P.K., B.G. Thompson, and M.R. Gray, *Effect of feed zone in fed-batch fermentations of Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 1992. **40**: p. 235-246.
4. Neubauer, P., L. Haggstrom, and S.O. Enfors, *Influence in substrate oscillations on acetate formation and growth yield in E. coli glucose limited fed-batch cultivations*. Biotechnology and Bioengineering, 1995. **47**: p. 139-146.
5. George, S., G. Larsson, and S.O. Enfors, *A scale-down two-compartment reactor with controlled substrate oscillations: Metabolic response of Saccharomyces cerevisiae*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1993. **9**(6): p. 249-257.
6. Bylund, F., et al., *Influence of scale-up on the quality of recombinant human growth hormone*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. **69**(2): p. 119-128.
7. Schweder, T., et al., *Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses*. Biotechnology and Bioengineering, 1999. **65**(2): p. 151-159.
8. Delvigne, F., et al., *Stochastic models to study the impact of mixing on a fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Progress, 2006. **22**(259-269).
9. Lejeune A., Delvigne F., and Thonart P., *Influence of bioreactor hydraulic characteristics on a Saccharomyces cerevisiae fed-batch culture: hydrodynamic modelling and scale-down investigations*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010. **37**(3): p. 225-236.
10. Sweere, A.P.J., L. Janse, and K.C.A.M. Luyben, *Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production: II. Two-fermentor system*. Biotechnology and Bioengineering, 1988. **31**: p. 579-586.
11. Oosterhuis, N.M.G., et al., *Scale-down aspects of the gluconic acid fermentations*. Biotechnology Letters, 1983. **5**(3): p. 141-146.
12. Sandoval-Basurto, E.A., et al., *Culture of Escherichia coli under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: Metabolic response and production of recombinant protein*. Biotechnology and Bioengineering, 2004. **89**(4): p. 453-463.

13. Peter Cyril P., S., Yusuke, Rachinskiy Kirill, Lotter Stefan, Büchs Jochen, *Volumetric power consumption in baffled shake flasks*. Chemical Engineering Science, 2006. **61**(11): p. 3771-3779.
14. Lotter, S. and J. Büchs, *Utilization of specific power input measurements for optimization of culture conditions in shaking flasks*. Biochemical Engineering Journal, 2004. **17**(3): p. 195-203.
15. Peter, C.P., et al., *Volumetric power consumption in baffled shake flasks*. Chemical Engineering Science, 2006. **61**(11): p. 3771-3779.
16. Attfield, P.V., et al., *Heterogeneity of stress gene expression and stress resistance among individual cells of Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology, 2001. **40**(4): p. 1000-1008.
17. Bennetzen J.L., H.B.D., *The primary structure of the Saccharomyces cerevisiae gene for alcohol dehydrogenase*. The Journal of Biological Chemistry, 1982. **257**(6): p. 3018-3025.
18. Russell, D.W., et al., *Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene*. The Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(4): p. 2674-2682.
19. Smith, M.G., S.G. Des Etages, and M. Snyder, *Microbial Synergy via an Ethanol-Triggered Pathway*. Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(9): p. 3874-3884.
20. Ciriacy, M., *Genetics of alcohol dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and General Genetics MGG, 1975. **138**(2): p. 157-164.
21. Wills, C. and J. Phelps, *A technique for the isolation of yeast alcohol dehydrogenase mutants with altered substrate specificity*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1975. **167**(2): p. 627-637.
22. De Virgilio, C., et al., *Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in Saccharomyces cerevisiae, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity*. European Journal of Biochemistry, 1993. **212**: p. 315-323.
23. Winderickx, J., et al., *Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in Saccharomyces cerevisiae: novel variations of STRE-mediated transcription control?* Molecular and General Genetics MGG, 1996. **252**(4): p. 470-482.
24. Hohmann, S., *Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 1991. **173**(24): p. 7963-7969.
25. Ozcan, S. and M. Johnston, *Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose*. Molecular and Cellular Biology, 1995. **15**(3): p. 1564-72.
26. Ozcan, S. and M. Johnston, *Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999. **63**(3): p. 554-569.

CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6.1. PRÉAMBULE

Le domaine abordé dans ce travail concerne l'extrapolation des bioprocédés à l'échelle industrielle. Comme décrit dans la partie bibliographique, différents phénomènes sont à prendre en considération pour aborder le problème de manière globale. Tous les paramètres n'ont pas pu être abordés dans ce travail. Cependant, celui-ci a permis de progresser dans la description et la compréhension des phénomènes intervenant lors du *scale-up* d'une production de levure. Le schéma 2.1 présenté au cours du chapitre 2 synthétisait les facteurs et les techniques à contrôler lors du *scale-up*. Ce schéma a été adapté en fonction des résultats obtenus au cours de ce travail et est présenté à la figure 6.1.

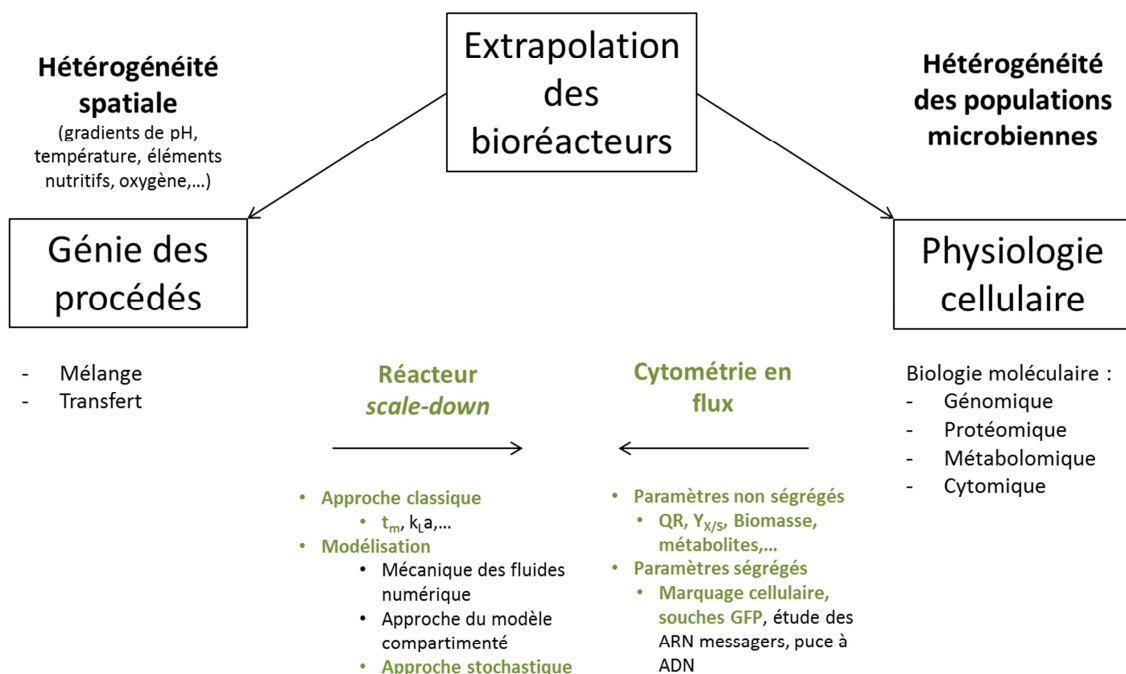


Figure 6.1 : Schéma général des paramètres physiques et physiologiques à prendre en compte pour la réalisation de l'extrapolation d'une culture de microorganismes en bioréacteur de volume industriel et des techniques permettant le suivi de ces paramètres avec, en vert, les éléments abordés dans ce travail

Différents types de réacteurs (*scale-down*, plate-forme de mini-bioréacteurs), différentes techniques (dosage, marquage cellulaire, cytométrie en flux) ont été utilisés. Ils ont permis de reproduire à petite échelle les conditions hydrodynamiques de réacteurs de taille industrielle. A côté des paramètres habituellement étudiés lors d'un suivi de production (biomasse, glucose,...), des traceurs propres aux cellules ont été proposés (marquage cellulaire, souches GFP). Les résultats obtenus sont résumés et discutés dans les paragraphes suivants. Ensuite une conclusion générale et des perspectives sont présentées.

6.2. UTILISATION DE RÉACTEURS *SCALE-DOWN* COMME OUTIL D'EXTRAPOLATION

Les conditions hydrodynamiques présentes dans un réacteur de grand volume peuvent être étudiées au laboratoire grâce au design de réacteurs *scale-down*. Il s'agit de réacteur de taille réduite (du litre au millilitre) possédant un ou plusieurs compartiments. Le type de réacteur *scale-down*, le nombre de compartiments, la taille, la vitesse de recirculation entre les différentes parties,... déterminent le type de conditions hydrodynamiques développées dans le réacteur. Il existe donc autant de réacteurs *scale-down* qu'il existe d'applications à étudier. Dans ce travail sont présentés des réacteurs *scale-down* à un ou deux compartiments.

Les chapitres 3, 4 et 5.1 abordent l'utilisation de réacteurs *scale-down* en 2 compartiments : un agité et l'autre non agité, reliés par une pompe péristaltique. La géométrie de la partie non agitée et la vitesse de la pompe peuvent être modifiées et permettent de décrire des conditions de mélange différentes au sein des réacteurs. Lorsque *Saccharomyces cerevisiae* est produite dans ces réacteurs, différents effets sont observés. D'un côté, le rendement de bioconversion du substrat en biomasse diminue, ainsi que la production de tréhalose. D'un autre côté, le temps de fermentation et la production en éthanol augmentent. Ces effets sont ceux pouvant être observés lors de l'extrapolation de la production de *Saccharomyces cerevisiae* à l'échelle industrielle. Les effets observés sont influencés par le débit de recirculation entre les 2 parties du réacteur *scale-down*. Le temps de circulation a été utilisé comme élément de comparaison des différents tests réalisés. Il permet aussi de définir le type d'écoulement dans les parties non agitées. Un tuyau étroit est le siège d'un écoulement piston tandis la dispersion est le phénomène responsable du mélange au sein d'une ampoule ou d'un tuyau de section plus large. Une relation entre l'augmentation du temps de mélange et la diminution du rendement de bioconversion a été mise en évidence. Le chapitre 5.1 a permis de mettre en évidence le caractère « stimulant » des réacteurs *scale-down*. En effet, les cellules soumises à un stress continu sont capables d'établir des stratégies pour résister à celui-ci et répondre efficacement. Elles ne se développent peut être pas de manière optimale, la biomasse chute mais les cellules sont plus résistantes aux stress encourus en cours de production.

A côté des paramètres classiques mesurés lors du suivi d'une production de microorganismes comme la concentration en biomasse ou en substrat, la production de tréhalose par les cellules de levure a également été mesurée. Ce sucre de réserve joue un rôle important au niveau du métabolisme de la levure, notamment en tant que cryoprotecteur. Il permet aux cellules de

résister aux traitements de séchage, comme la lyophilisation. Les résultats présentés dans le chapitre 4 montrent qu'une perte d'efficacité du mélange dans le bioréacteur conduit à une plus faible production de tréhalose. Les cellules ne stockent plus le tréhalose lorsqu'elles sont confrontées à de mauvaises conditions de culture. Cela peut conduire à une mauvaise conservation des cellules.

L'utilisation d'un réacteur *scale-down* à un compartiment est présentée au chapitre 5.2. Dans ce cas, le gradient de concentration en glucose n'est plus créé par le passage des cellules dans une zone peu agitée mais est reproduit au sein d'un mini-réacteur. L'ajout de glucose est modulé de façon à créer des zones à fortes concentrations en glucose et d'autres à faibles concentrations. L'ajout se fait de manière intermittente. Lors de l'ajout du glucose, la concentration augmente localement, au point d'ajout. Les cellules utilisent le substrat puis, avant le nouvel ajout, elles sont confrontées à une période de manque en substrat. Ce système est plus simple puisque que le réacteur *scale-down* n'est composé que d'une seule partie. Aucune pompe n'est nécessaire à la mise en mouvement du milieu de culture. De plus, les tests sont réalisés en mini-bioréacteurs. Avec ce genre de réacteurs, il est possible de travailler en parallèle sur plusieurs paramètres, plusieurs souches,... et ainsi acquérir un grand nombre de données. Cependant il faut noter que le stress encouru pour les cellules dans un réacteur *scale-down* à un compartiment n'est pas comparable à celui présent dans un SDR à deux compartiments. En effet, dans le premier cas, toutes les cellules sont confrontées au même stress, aux mêmes variations extracellulaires en substrat par exemple. Dans le cas d'un réacteur *scale-down* à deux compartiments, toutes les cellules ne passent pas forcément dans la partie non agitée. Elles ne sont donc pas toutes soumises aux fluctuations de concentration en substrat. Le premier cas prend réellement en compte le caractère hétérogène de la réponse cellulaire vis-à-vis d'un stress extracellulaire.

Il peut paraître absurde d'étudier les phénomènes intervenant lors du *scale-up* dans des réacteurs de plus en plus petits. Cependant cette méthode présente de nombreux avantages. La réduction du volume de production permet de travailler plus vite et dans de meilleures conditions. Les coûts d'investissement et de tests sont réduits. Il est possible de travailler simultanément pour comparer l'effet de différents paramètres sur la croissance d'une souche ou pour comparer, en parallèle, le comportement de plusieurs souches face à un même stress. Les réacteurs *scale-down* sont un outil puissant dans le domaine de la compréhension des phénomènes se produisant lors du *scale-up*.

6.3. MODÉLISATION DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES DES BIORÉACTEURS

Le modèle hydrodynamique présenté au chapitre 3 décrit le profil de concentration en glucose rencontré par les cellules pendant leur séjour dans le réacteur. Il est divisé en deux parties : d'une part, un sous-modèle décrivant la circulation des microorganismes dans le réacteur et d'autre part, un sous-modèle décrivant l'apparition du gradient de concentrations en glucose dans le bioréacteur, en prenant en compte le caractère discontinu de l'ajout dû à l'utilisation d'une pompe péristaltique. Pour expliquer la perte de rendement de bioconversion, deux cas sont à distinguer :

- Dans le cas où le mélange est gouverné par la dispersion (partie non agitée = ampoule ou tuyau de grande section), l'étude des résultats des simulations permettent de montrer que la perte de rendement est corrélée à l'augmentation du nombre de cellules soumises aux fortes concentrations en glucose, retrouvées dans la partie non agitée du système *scale-down*.
- Dans le cas où le mélange est un écoulement piston, la perte de rendement peut être expliquée par l'amplitude des fluctuations des concentrations en glucose rencontrées par les cellules de levure lorsqu'elles entrent dans la partie non agitée.

Outre le nombre de compartiments considérés dans le modèle, les autres paramètres pouvant être modifiés sont le nombre de cellules soumises aux variations de concentrations en glucose et le temps d'exposition aux pulses. Plus ces deux paramètres sont élevés, plus le modèle s'approchera de la réalité. Or les résultats présentés sont des simulations réalisées avec comme paramètres : 3500 cellules et 1000 secondes d'exposition aux pulses, ce qui est peu comparé aux nombres de cellules présentes dans un réacteur et à la durée d'une fermentation. Le modèle développé dans ce travail ne permet donc pas de donner une explication complète aux observations réalisées lors de la culture en réacteur *scale-down*.

6.4. PROPOSITION DE BIO-MARQUEURS POUR LE SUIVI DE L'IMPACT DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LES CELLULES

Les techniques classiques de dénombrement cellulaire ne sont pas toujours adaptées à la conduite d'une production industrielle. Le dénombrement sur boîte ou à la cellule de Burkner donne des informations incomplètes ou différées par rapport à la culture. Ainsi lorsqu'un

échantillon est prélevé et étalé sur boîte de Pétri, après dilutions décimales adéquates, les résultats ne seront connus que 24 à 48 heures après. La culture est souvent finie lorsque le comptage des colonies est effectué. La cellule de Burkner, quant à elle, donne une information globale, elle dénombre le nombre de cellules totales présentes à un instant donné dans le réacteur, ne discriminant pas les cellules mortes des cellules vivantes. Ces techniques, utiles pour certaines applications, ne sont pas adéquates pour étudier l'impact des conditions hydrodynamiques au niveau de la cellule.

Les bio-marqueurs sont donc en plein développement. Qu'il s'agisse de l'utilisation de marqueurs fluorescents ou de souches exprimant une protéine recombinante fluorescente, les résultats présentés dans ce travail ont montré que ces techniques permettent de suivre l'évolution de différentes caractéristiques propres à chaque cellule. Les marquages cellulaires permettent par exemple d'estimer la viabilité des cellules mais d'autres paramètres cellulaires peuvent être connus, en fonction du marqueur choisi. Il est possible d'utiliser deux marqueurs simultanément, pour autant que leur fluorescence propre ne se superpose pas. Cette technique, couplée à la cytométrie en flux, permet d'obtenir beaucoup d'informations sur les caractéristiques propres à chaque cellule. La possibilité de placer le cytomètre en flux en ligne sur les réacteurs et l'automatisation par l'appareil du prélèvement et de la préparation de l'échantillon décuplent encore les informations pouvant être recueillies au sujet des caractéristiques ciblées (fluorescence propre à un marqueur ou due à l'expression d'une protéine recombinante, informations sur la forme ou sur des propriétés de structure propres à chaque cellule).

Le chapitre 5.1 décrit l'utilisation de souches de levure exprimant une GFP, sous le contrôle du promoteur ribosomal RPL22a, couplée au marquage à l'iodure de propidium (Pi). Le suivi de ces deux paramètres est réalisé en ligne par cytométrie en flux. Différents types de culture ont été réalisés : chemostat, *fed-batch*, *fed-batch* avec *scale-down*. Une comparaison est également réalisée entre des cultures sur milieu riche et sur milieu minimum. Les différentes productions réalisées ont permis de mettre en évidence que les sous-populations cellulaires sont dynamiques et qu'il existe des mécanismes de rétablissement de la viabilité et des activités métaboliques. Dans le cas des cultures réalisées en mode *fed-batch*, la croissance est plus rapide dans le cas du milieu riche, par rapport au milieu minimum. Mais il est également observé que la croissance sur milieu riche induit une augmentation de la fluorescence due au PI. Ce phénomène illustre le principe du « *trade-off* » qui exprime la balance entre la résistance au stress des cellules et la croissance rapide. Les cellules produites sur milieu riche

se développent plus vite mais sont plus sensibles aux stress rencontrés pendant la culture. Dans le cas de la culture en mode *scale-down*, le phénomène est atténué. Il semblerait que les cellules, soumises à différents stress au sein du réacteur, sont stimulées et réagissent en développant des stratégies de réponses vis-à-vis de ces stress.

La connexion en ligne du cytomètre en flux permet de suivre le procédé de manière plus rapide et plus fine et d'ainsi estimer l'hétérogénéité de la population présente au sein du réacteur. La cytométrie en flux comporte de nombreux avantages déjà décrits précédemment mais il faut pouvoir retirer l'information pertinente, celle qui permettra d'estimer rapidement le caractère ségrégé ou non de la population, de la masse d'informations récoltées en cours de culture. Classiquement les résultats de cytométrie en flux sont présentés sous la forme d'un cytogramme reprenant, par exemple, en abscisse la fluorescence exprimée par la GFP et en ordonnée la fluorescence exprimée par les cellules marquées au PI. Dans ce graphique, des zones sont définies pour délimiter les différents états cellulaires (GFP+/PI-, GFP-/PI-,...). Cette représentation peut amener des biais dans l'analyse des résultats puisque le manipulateur définit les limites des différentes classes. Il est donc intéressant de rechercher d'autres méthodes de représentation des résultats obtenues par voie cytométrique. La manière la plus simple d'exprimer le caractère ségrégé d'une population est de calculer le rapport entre la moyenne et la médiane des mesures réalisées pour un paramètre donné, comme la fluorescence due au PI par exemple. Mais ce type de représentation ne permet pas toujours de donner une bonne idée de la ségrégation d'une population, notamment lorsque les écarts entre les mesures sont faibles. Dans le cas de la perte de fluorescence de la GFP en cours de culture, les écarts entre les cellules positives et négatives sont faibles. Le rapport moyenne sur médiane n'est donc plus approprié. Une autre méthode de représentation est la « boxplot », dans la moyenne, la médiane et l'écart interquartile sont représentés. Cette analyse permet de représenter les paramètres de dispersion et ainsi visualiser la dynamique de la population. Cependant, elle n'est pas toujours efficace et peut comporter certaines limitations. Il est donc important de connaître l'hétérogénéité des populations étudiées pour définir les analyses mathématiques à réaliser pour exprimer au mieux la ségrégation des cellules au sein du réacteur.

Les souches GFP peuvent également être utilisées comme bio-capteurs de l'expression d'un gène particulier. Il existe une collection de souches GFP pour *Saccharomyces cerevisiae*, correspondant chacune à un gène cible. Le gène codant pour la protéine recombinante est placé sous le contrôle du promoteur du gène cible. Au chapitre 5.2, différents gènes cibles ont

été suivis : TPS2, PDC6, ADH2, par exemple. Il a été démontré que l'utilisation de ces souches permet de voir la différence entre une culture réalisée sous excès de glucose d'une culture réalisée en conditions idéales. L'étude du gène TPS2 a aussi montré que ce sont les fluctuations continues des conditions de culture qui ont un impact sur les réactions enzymatiques des cellules et qui perturbent leur développement normal. Elles pourraient donc être utilisées pour suivre l'évolution de l'expression du gène pendant une culture en réacteur. Néanmoins, il est à noter que ces souches montrent des caractéristiques de croissance qui s'éloignent légèrement d'une souche qui pourrait être produite industriellement. Les nombreux tests réalisés dans le cadre de ce travail ont indiqué que le comportement de *Saccharomyces cerevisiae* modifiée avec une GFP était différent de celui de *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*.

6.5. CONCLUSION

Le contexte de ce travail de thèse est l'extrapolation de la production de microorganismes à l'échelle industrielle, adapté au cas particulier de *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*. L'augmentation du volume de production induit de nombreux phénomènes limitants pouvant perturber le développement du microorganisme. La revue bibliographique présentée au chapitre 2 explicite les différents paramètres à prendre en considération lorsqu'une production doit être extrapolée, comme par exemple la production de biomasse de *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* pour être utilisée comme probiotique. Il n'est plus uniquement question de fixer un temps de mélange et de recalculer les paramètres opérationnels pour l'atteindre. Des modèles mathématiques, découpant le volume réactionnel en fractions plus petites, permettent de prédire les conditions hydrodynamiques développées dans les réacteurs de grands volumes. L'impact de ces conditions hydrodynamiques sur la croissance et le métabolisme du microorganisme produit sont également pris en compte, surtout depuis le développement de nouvelles techniques de suivi en ligne, comme la possibilité de coupler un cytomètre en flux sur le réacteur. Il est ainsi possible de distinguer plusieurs phénotypes au sein de la population cellulaire présente dans le réacteur grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques ou de souches exprimant une protéine recombinante fluorescente. Cette technique permet de mettre en évidence la dynamique cellulaire qui se déroule lors d'une production. Les conditions opératoires peuvent ainsi être ajustées en cours de culture de façon à maximiser la population active ou à favoriser une voie métabolique plutôt qu'une autre.

Les différents résultats présentés dans ce travail se placent donc dans ce contexte. Des réacteurs *scale-down*, de différentes configurations, ont été utilisés. Ils ont permis d'étudier à plusieurs niveaux les conditions hydrodynamiques présentes au sein des bio-réacteurs de grands volumes. Les stress encourus par les cellules lors de la production sont proches de ceux perçus lors d'une production industrielle : passage de zones de fortes concentrations en substrat à des zones de faibles concentrations en substrat, ainsi que des perturbations au niveau de la disponibilité en oxygène. Différentes configurations de réacteurs *scale-down* ont été testées, à un ou à deux compartiments. Le plus utilisé dans ce travail est le réacteur *scale-down* à deux compartiments composés d'un réacteur agité et d'une partie non agitée (ampoule en verre ou tuyau en silicone). La partie non agitée représente la zone d'ajout du substrat dans les réacteurs de grands volumes. La circulation des cellules entre les deux parties représente donc leur circulation dans le volume d'un réacteur industriel. Des réacteurs *scale-down* à un compartiment ont également été utilisés. Dans ce cas, la production se fait dans un réacteur agité (de volume pouvant être limité) au sein duquel l'ajout en glucose se réalise de manière intermittente. Le passage des cellules d'une zone concentrée à une zone limitée en substrat ne se fait plus spatialement mais temporellement. L'intérêt des réacteurs *scale-down* dans le cadre de l'étude de l'extrapolation d'une production de microorganismes a été établi à de nombreuses reprises pendant ce travail. La réduction du volume permet de réaliser plus d'essais pour un coup plus réduit que si les tests devaient être réalisés à grande échelle.

Les conditions hydrodynamiques présentes au sein des réacteurs *scale-down* ont été modélisées par une approche stochastique. Deux sous-modèles ont été définis de manière à représenter le mélange de la solution de glucose au sein du réacteur et la circulation des cellules dans ce réacteur. La superposition des deux phénomènes conduit à un modèle qui décrit les concentrations en glucose rencontrées par les cellules lors de leur déplacement dans le réacteur. Ce modèle a permis d'expliquer partiellement l'impact des conditions hydrodynamiques sur les cellules pendant une production en réacteur *scale-down*.

L'impact de ces conditions sur la croissance cellulaire a été étudié à plusieurs niveaux : au niveau de la population et au niveau de la cellule. Les paramètres classiques suivis lors d'une production (concentration en biomasse, dénombrement cellulaire, concentration en divers métabolites secondaires,...) ont été mesurés et sont affectés par les perturbations hydrodynamiques. Par exemple, la concentration finale en biomasse est réduite dans le cas d'une production en réacteur *scale-down*. Cependant, la qualité de la levure peut ne pas être affectée dans le même sens. En effet, il a été montré que la production en réacteur *scale-down*

peut stimuler les cellules qui résistent mieux au stress. Les cellules choisissent entre la croissance cellulaire et la mise en place de mécanisme permettant de résister aux perturbations du milieu. Ce phénomène a pu être mis évidence en étudiant le niveau cellulaire atteint grâce à l'utilisation de souches exprimant une protéine recombinante fluorescente ou l'utilisation de marqueur cellulaire comme le PI. Le couplage de ces techniques avec la cytométrie en flux permet d'obtenir de nombreuses informations sur les caractéristiques cellulaires visées. Néanmoins, avoir beaucoup d'informations sans traitement adéquat ne pas utile. Il faut donc veiller à définir le type d'analyse à réaliser avec ces données. Différents types de représentation des données ont été présentés : cytogramme, ratio de ségrégation (rapport moyenne/médiane) ou boxplot. Chaque cas peut fournir une information utile mais ils ne peuvent pas être utilisés dans tous les cas. Il est donc nécessaire de connaître le caractère ségrégué ou non des sous-populations pour savoir quel type de représentation choisir.

6.6. PERSPECTIVES

Ce travail a permis d'investiguer plusieurs problématiques rencontrées dans le contexte de l'extrapolation des bioréacteurs dans le cadre de la production de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'approche développée au cours de cette thèse de doctorat est multidisciplinaire et met en œuvre la description de l'hétérogénéité spatiale des bioréacteurs (approche numérique basée sur une description de l'hydrodynamique des bioréacteurs selon une approche compartimentée), ainsi que la description de l'hétérogénéité phénotypique de la population microbienne (par l'utilisation de marqueurs moléculaires fluorescents combinée à la cytométrie en flux).

Plusieurs pistes restent à explorer, dont la première concerne l'amélioration des modèles hydrodynamiques utilisés pour la description des hétérogénéités de mélange rencontrées par les microorganismes au cours de leur déplacement dans le bioréacteur. Dans le cadre de ce travail, un modèle compartimenté a été utilisé pour simuler les perturbations extracellulaires rencontrées par les microorganismes. Cette approche est très simple et requiert peu de puissance de calcul, par comparaison aux méthodes de mécanique des fluides numériques et plus particulièrement par rapport à l'approche eulérienne-lagrangienne développée précédemment par l'équipe du Prof. Reuss dans la même thématique [1-4]. Néanmoins, cette approche souffre d'un manque de précision quant aux écoulements se déroulant dans le bioréacteur et demande des connaissances a priori afin d'estimer la direction de ceux-ci. Notre équipe est actuellement en train de travailler sur une approche hybride permettant de

simplifier les résultats de mécanique des fluides numériques en modèles compartimentés [5, 6]. De cette manière, un modèle simple peut être obtenu et pourra être combiné à des modèles de physiologie cellulaire.

La deuxième perspective de ce travail concerne la compréhension de la réponse cellulaire aux stress relatifs à une production industrielle. A ce niveau, plusieurs éléments peuvent être avancés. Lors d'une production industrielle d'un microorganisme, le rendement en biomasse est souvent un critère important et discriminant une production réussie, comme c'est le cas pour la levure *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*. Dans ce cas en effet, le producteur cherche à maximiser celui-ci par rapport au substrat mis en œuvre dans le procédé. Néanmoins, la qualité de la levure et sa capacité à répondre de façon appropriée aux stress post-production doivent entrer en ligne de compte. Pour cela, une meilleure connaissance des phénotypes cellulaires présents au cours d'une production est essentielle. Les études réalisées au cours de ce travail ont montré qu'il existe au sein d'une même population microbienne plusieurs types cellulaires dont les caractéristiques évoluent au cours du temps [7]. L'utilisation de la cytométrie en flux combinée à l'utilisation de biocapteurs produisant une protéine recombinante fluorescence (GFP) sous l'influence d'un promoteur cible, ou de marqueurs de réactions cellulaires intéressantes pour l'application ciblée constitue un outil puissant pour l'étude de la réponse physiologique des cellules aux stress environnementaux. Dans ce cadre, il est important de garder à l'esprit qu'un traitement mathématique adéquat des données est une garantie de la compréhension fine des phénomènes physiologiques se déroulant en cours de culture.

De manière générale, l'utilisation de réacteurs *scale-down* dimensionnés sur base de modèles hydrodynamiques robustes, combinée avec les technologies nouvelles d'analyses cellulaires, peut être appliquée à toutes productions, quel que soit le microorganisme concerné. Néanmoins, l'identification des paramètres critiques susceptibles de modifier la physiologie cellulaire (exemple : stress en nutriment, choc pH,...) est cruciale pour la réussite de l'expérience.

6.7. RÉFÉRENCES

1. Lapin, A., Schmid, J., Reuss, M., Modeling the dynamics of E. coli populations in the three-dimensional turbulent field of a stirred bioreactor - A structured-segregated approach. Chemical engineering science, 2006. **61**: p. 4783-4797.
2. Schmalzriedt, S., Jenne, M., Mauch, K., Reuss, M., Integration of physiology and fluid dynamics. Advances in biochemical engineering, 2003. **80**: p. 19-68.

3. Lapin, A., Müller, D., Reuss, M., Dynamic behavior of microbial populations in stirred bioreactors simulated with Euler-Lagrange methods : traveling along the lifelines of single cells. *Industrial and engineering chemistry research*, 2004. **43**: p. 4647-4656.
4. Lapin, A., Klann, M., Reuss, M., Multi-Scale Spatio-Temporal Modeling: Lifelines of Microorganisms in Bioreactors and Tracking Molecules in Cells. *Advances in biochemical engineering/Biotechnology*, 2010. **121**: p. 23-43.
5. Delafosse, A., Delvigne, F., Collignon, M.L., Crine, M., Thonart, P., Toye, D., Development of a compartment model based on CFD simulations for mixing description in bioreactors. *BASE*, 2010. **in press**.
6. Delafosse, A., Collignon, M.L., Calvo, S., Delvigne, F., Crine, M., Thonart, P., Toye, D., CFD-based compartment model for description of mixing in bioreactors. *Chemical engineering science*, 2014. **106**: p. 76-85.
7. Delvigne, F., Baert, J., Gofflot, S., Lejeune, A., Telek, S., Johanson, T., Lantz, A.E., Dynamic single-cell analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under process perturbation: comparison of different methods for monitoring the intensity of population heterogeneity. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 2014. **in press**.

CHAPITRE 7 : RAPPORT DE PUBLICATIONS

7.1. PUBLICATIONS

7.1.1. EN PREMIER AUTEUR :

- Lejeune A., Delvigne F., Thonart P., 2010, *Influence of bioreactor hydraulic characteristics on a Saccharomyces cerevisiae fed-batch culture: hydrodynamic modelling and scale-down investigations*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, **37**, 225-236
- Lejeune A., Delvigne F., Thonart P., 2010, *Trehalose content analysis of yeast cells during fermentation in scale-down reactors and in mini-bioreactors*, BASE, **14** (S2), 579-584
- Lejeune A., Delvigne F., Thonart P., 2013, *Physiological response of yeast to process perturbations: a mini-bioreactor approach*, Cerevisia, **38** (1), 15-19
- Lejeune A., Thonart P., Delvigne F., 2013, *Stress microbien lors du processus d'extrapolation : Approche physique et biologique*, Cerevisia, **38** (3), 89-101

7.1.2. EN SECOND AUTEUR :

- Delvigne F., Lejeune A., Destain J., Thonart P., 2006, *Stochastic models to study the impact of mixing on a fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae*, [Biotechnology Progress](#), 22 (1), 259-269
- Delvigne F., Lejeune A., Destain J., Thonart P., 2006, *Modelling of the substrate heterogeneities experienced by a limited microbial population in scale-down and in large-scale bioreactors*, [Chemical Engineering Journal](#), 120, 157-167

7.1.3. AUTRES

- Delvigne F., Destain J., Brognaux A., Kar T., Lejeune A., Thonart P., 2010, *L'extrapolation des bioréacteurs : un problème de génie des procédés ou de physiologie microbienne ?*, Chimie Nouvelle, 104, 7-14
- Delvigne F., Baer J., Gofflot S., Lejeune A., Telek S., Johanson T., Lantz A.E., *Dynamic single-cell analysis of Saccharomyces cerevisiae under process perturbations :*

comparison of different methods for monitoring the intensity of population heterogeneity,
Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **In Press**

7.2. ABSTRACTS DE COLLOQUES

- Lejeune A., Delvigne F., Thonart P., 2006, *Etude de l'effet scale-down sur la levure Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*, abstract de poster, colloque : « Levures, Modèles et Outils VII », Institut Pasteur, Paris
- Lejeune A., Delvigne F., Thonart P., 2009, *Physiological response of yeast to process perturbations : a mini bioreactor approach*, New Biotechnology, 225, s235-s236