UN CAPTEUR A ALCOOL POUR L'INTERFACE ORPHY
2ème partie : Utilisation pour le suivi de fermentations

Guy DURLIAT, Sophie LOGNON, Marcelle LACROIX

L'étude de la réponse de ce capteur à gaz à des solutions d'alcool a conduit au protocole d'étalonnage pour des utilisations quantitatives (1ère partie, référence 1). Nous l'appliquons pour suivre la fermentation du glucose par les levures et étudier l'effet de la concentration du sucre. Le dosage de l'alcool dans le milieu permettra d'apprécier la réponse du capteur dans ces conditions d'expérience.

Matériel et réactifs.

- capteur "pour fermentation", interface ORPHY GTS et logiciel REGRESSI (version Regorphy 6.0) (2).
- micro-ordinateur compatible PC.
- dispositif thermostaté pour fermentation : figure 1.
- solution d'alcool à 25 %.
- suspension de levures de boulanger à 5 g/100ml dans un tampon phosphate pH 7 0,1 M.
- solutions de glucose de 22,5 à 450 g/l (soit 0,125 M à 2,5 M).
- pour le dosage de l'alcool :
  - coffret pour le dosage enzymatique de l'alcool par l'alcool- déshydrogénase (Boehringer par exemple) ou réactifs pour ce dosage (tampon, ADH, NAD, acide perchlorique).
  - solution étalon d'alcool à 3 g/l.

I - ETALONNAGE PREALABLE DU CAPTEUR

Le montage de la figure 1, est étalonné dans les conditions qui seront celles de la fermentation :

température 37 °C
20 ml d'eau distillée
additions de 50 à 2000 µl d'alcool à 25 %.

Les résultats sont regroupés dans la figure 2. On voit que la relation $\log \frac{V_o - V}{V} = f\left(\log \frac{C}{C1}\right)$* est bien linéaire ; l'équation C = f(V) [1] paramétrée pourra être retenue pour traduire la tension produite par le capteur en concentration d'alcool.

V_o = tension appliquée (5V)
V = tension produite
C = concentration de l'alcool
C_1 = concentration d'alcool
donnant $V=V_o/2$

II - SUIVI DE FERMENTATIONS AVEC LE CAPTEUR

La suspension de levures à 5 g/100 ml dans le tampon phosphate est agitée au préalable à l'air (une demi-heure avant la première expérience, puis pendant que se déroulent les suivantes), et si possible à la température choisie (ici 37°C).

Un volume connu - 20 ml prélevés avec une grosse seringue dans la suspension stock sans cesser de l'agiter pour avoir des suspensions homogènes - est introduit dans la cellule thermostatée de la figure 1 et agitée doucement. Le capteur - éventuellement protégé par une toile de nylon, voir (1) - et la seringue contenant la solution de glucose sont mis en place.

Après un temps d'équilibrage de température, on déclenche l'aquisition (durée prévue : 1 heure) puis on ajoute 2 ml de la solution de glucose en marquant l'instant (touche F2).

II.1 - Courbe d'acquisition et exploitation.

La figure 3 montre les résultats obtenus avec une addition de 2 ml de glucose 0,75 M aux 20 ml de suspension. La courbe V = f(t) met en évidence une production d'alcool qui s'arrête après 25 minutes (figure 3a).

En prenant comme hypothèse de travail que la réaction du capteur est essentiellement due à l'ethanol produit par la fermentation du gluco

[1] voir la 1ère partie

se, la relation établie au paragraphe I permet de créer la nouvelle variable C (concentration d'alcool dans le milieu) et de représenter son évolution en fonction du temps (figure 3b). Une partie droite apparaît nettement, on borne et fait la régression de cette phase linéaire pour obtenir la vitesse initiale de production d'alcool de cette fermentation (voir 3 ou 4 pour les modélisations avec Régressi).

L'expérience peut être complétée en faisant une nouvelle addition de glucose dans la phase d'arrêt. La figure 4 montre que, malgré le taux d'alcool, la fermentation reprend ; l'arrêt observé s'interprétait par un épuisement du substrat.

II.2 - Effet de la concentration initiale du glucose (figure 5).

L'expérience précédente est reproduite en déclenchant la fermentation avec des solutions de glucose de concentration croissante.

II.2.1 - Famille des courbes V = f(t) et C = f(t) :

Une gamme de concentrations initiales de glucose dans la suspension de levures de l'ordre de 2 à 40 g/l (ici 11,36 à 227 mM) est réalisée par des solutions déclenchantes de 22,5 à 450 g/l.

La figure 5a donne les résultats des acquisitions V = f(t) regroupées dans un fichier à pages de Régressi et superposées. Ces données brutes montrent un effet manifeste sur la fin de réaction : l'augmentation de la concentration initiale du glucose accroît la production d'alcool et retarde l'arrêt. Par contre un éventuel effet sur la vitesse n'est pas lisible.

Comme au II1, on traduit ces données en C = f(t) et modélise les phases linéaires. La figure 5b révèle cette fois très nettement un effet du glucose sur la vitesse : l'augmentation de la concentration accélère la fermentation.

II.2.2 - Relation vi/C :

Le tableau et le graphe secondaires produits par Régressi (voir 3 ou 4) permettent l'étude de la relation entre la vitesse initiale et la concentration C du substrat. L'équation de Michaèlis est proposée comme modèle, avec des ordres de grandeur lus à l'écran pour les paramètres Vm et Km. La figure 5c montre qu'elle s'ajuste assez bien aux résultats expérimentaux.

Une linéarisation peut être testée pour confirmer l'adéquation. L'encart de la figure 5c donne le résultat de la linéarisation vi = f(vi/C) d'Eadie Hofstee.

N.B. Cette méthode présente le double avantage par rapport à celle des inverses de pondérer les vitesses en les relativisant et, pour le traitement informatique, d'obtenir directement les constantes cinétiques tout en n'ayant qu'une variable à créer.

III - SUIVI D'UNE FERMENTATION AVEC LE CAPTEUR ET PAR DOSAGE DE L'ALCOOL.

Comme dans les expériences précédentes, le capteur suit en continu la teneur de l'alcool dans la phase gazeuse. La figure 6a reproduit les résultats d'une fermentation déclenchée par 2 ml de glucose 1,5 M.

La seringue sert cette fois à prélever le milieu à différents temps pour en doser l'alcool. Le tableau résume le principe et le protocole du dosage enzymatique employé ici en point final (voir 5 pour ce type de méthode). Les figures 6b et 6c reproduisent les résultats de l'étalonnage par les solutions d'alcool et du dosage des prélèvements. Les prélèvements ultérieurs à 45 minutes dépassant la gamme, ils ont été calculés par extrapolation (fonction de calcul sur modélisation de Régressi) tout en connaissant le défaut de ce genre de détermination. La concentration en pourcentage du milieu est exprimée à partir de la concentration massique à l'aide de la masse volumique de l'éthanol à 37°C (0,775 g/cm^3).

On voit que :

- les courbes [alcool] en fonction du temps produites par ces deux modes de suivi sont sensiblement parallèles (6a et 6c),
- mais l'évaluation de l'alcool dans la suspension de levures par le capteur (détectant dans la phase gazeuse) donne une concentration de l'ordre de deux fois supérieure à celle du dosage enzymatique (seuls ont été retenus pour cette comparaison les points compris dans la gamme d'alcool). Il faudrait analyser cet écart en considérant :
  - les modalités d'étalonnage du capteur (différence eau/suspension de levures),
  - et surtout la spécificité de détection dans les deux cas : dosage enzymatique très spécifique de l'éthanol à opposer à la sensibili

té du capteur à d'autres gaz. L'effet du dioxyde de carbone et d'autres produits de la fermentation serait à étudier.

CONCLUSIONS

Les intérêts de ce capteur à gaz sont évidents. Ils peuvent être mis à profit à des niveaux très différents de démonstration et d'expérimentation :

- La mise en évidence de fermentations avec le dispositif décrit - qui peut être simplifié - devient très facile, puisqu'on n'a pas de dosages à mettre en oeuvre, et spectaculaire : la production d'alcool est suivie en temps réel et en continu à l'écran de l'ordinateur. Ce qui ouvre aussi le champ des études de comparaison de substrats glucidiques ou non (6) ou d'inhibitions.
- Ce capteur repose le problème général d'une acquisition continue, numérisée par une interface et traitée par un logiciel (la chaîne Orphy-Régressi ici), avec cette difficulté particulière par rapport au capteur oxygène par exemple (5) qu'on peut utiliser pour la respiration des levures d'une réponse non linéaire. On voit que des études quantitatives ne peuvent se faire sans les fonctions de modélisation d'un logiciel comme Régressi.
- Les caractéristiques de la réponse du capteur aux produits volatils de la fermentation par rapport à un dosage spécifique de l'éthanol pourrait faire l'objet d'une étude plus approfondie.

Guy DURLIAT *, Sophie LOGNON
Marcelle LACROIX

Ecole Normale Supérieure de Cachan,
Département de Biochimie Génie
Biologique, 61, avenue du président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX.

* membre du groupe Evariste.

BIBLIOGRAPHIE

1 : référence de parution de la 1ère partie de l'article dans le bulletin de l'EPI.

2 : L'interface Orphy, le logiciel Régressi (J-M. Millet), le capteur "fermentation" (et d'autres tels que sondes de température, de pH, lux-mètre, oxymètre...), conçus par le groupe Evariste (CNAM-DLC 15), sont fabriqués et distribués par Micrélec, 4, place Abel Leblanc, 77120 Coulommiers.

3 : G. Durliat : "Acquisition et traitement de données à l'aide de l'interface Orphy et du logiciel Régressi". *Bulletin de l'EPI* n°59, septembre 90 (Association Enseignement Public et Informatique, 13, rue du Jura, 75013 Paris).

4 : G. Durliat et J-M. Millet : "Acquisition et exploitation de données expérimentales : la solution interface Orphy-logiciel Régressi". *L'Opéron spécial informatique* XVI, 1990, n° 3-4 (Bulletin de l'UPBM, Union des Professeurs de Physiologie, Biochimie et Microbiologie, Lycée La Martinière-Duchère, avenue A-Sakharov, 69338 Lyon Cedex 9).

5 : G. Durliat : "Expériences d'enzymologie avec l'électrode à oxygène et le système Orphy-Régressi". Article en trois parties paru dans les n°s 70, 71 et 72 du *bulletin de l'EPI*.

6 : D. Pol : "Quelques manipulations assistées ou non par ordinateur sur les levures". *Biologie-Géologie* (bulletin de l'APBG) n°4, 1992.

Tableau : **Principe et protocole du dosage enzymatique de l'alcool en point final. ADH: alcool-déshydrogénase. NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.**

$$\text{alcool} + NAD^+ \xrightarrow{ADH} \text{éthanal} + NADH,H^+$$

En fin de réaction, on dose le NAD réduit du milieu par son absorbance U.V. à 340 nm.
Le traitement parallèle des échantillons (déprotéinisés par l'acide perchlorique) et d'étalons-alcool permet le calcul.

Réactifs	Témoin	Etalons	Echantillons
Acide perchlorique 0,33 M glacé	1 ml	1 ml	1 ml
Eau distillée	100 µl		
Solutions étalons d'alcool (0,5 à 3 g/l)		100 µl	
Echantillons prélevés			100 µl
Centrifugation des échantillons en tubes ou cônes bouchés.			
tampon pyrophosphate pH=8,7	4,80 ml	4,80 ml	4,80 ml
NAD 24 mM	100 µl	100 µl	100 µl
dilutions ou surnageants	100 µl	100 µl	100 µl
ADH 8000 U/ml	20 µl	20 µl	20 µl
Mélanger, boucher. Incuber 75 minutes à 25 °C ou 30 minutes à 37 °C. Lire l'absorbance des étalons et des essais en réglant le zéro de l'appareil sur le témoin.			

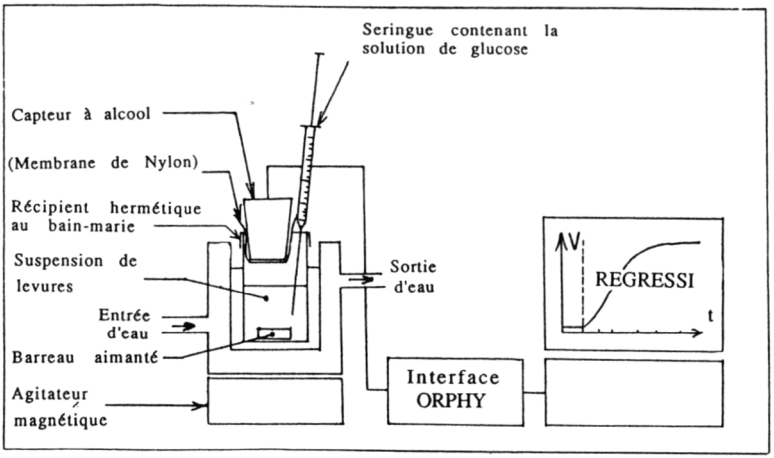

Figure 1 : **Schéma du dispositif utilisé pour suivre une fermentation à l'aide de la chaîne d'acquisition : capteur alcool - interface ORPHY - logiciel REGRESSI.**

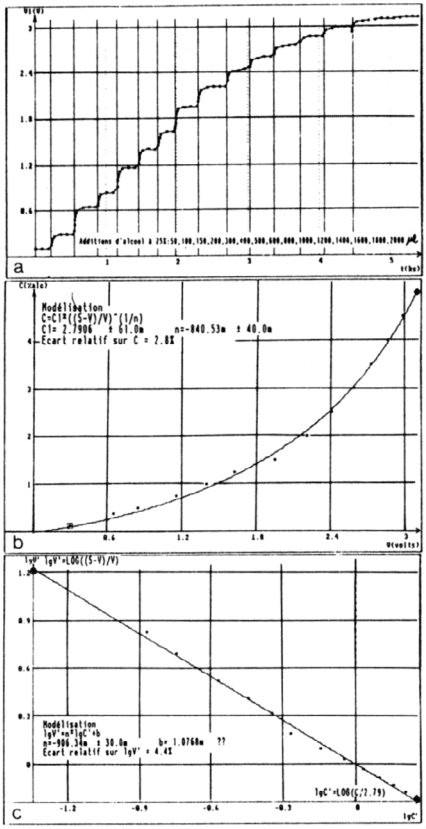

Figure 2 : Etalonnage du capteur : dans la figure 1, la suspension de levures est remplacée par de l'eau et la seringue contient l'alcool. La relation C/V établie est vérifiée par linéarisation.

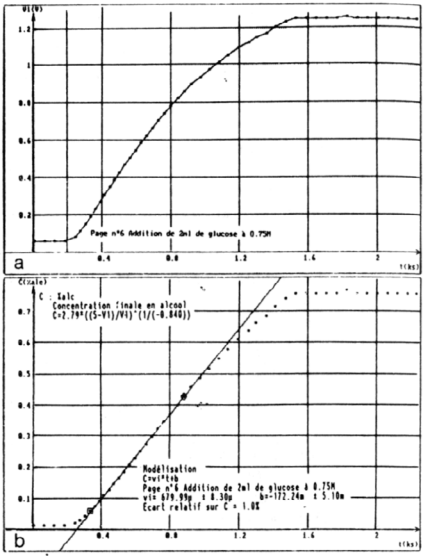

Figure 3 : Acquisition (a) et traitement (b) d'une fermentation suivie par le capteur à gaz alcool.

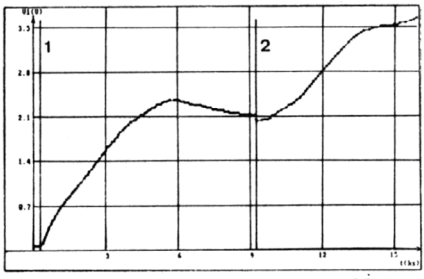

Figure 4 : Après une première addition de glucose à la suspension de levures (1: 2 ml glc 1,5 M), la fermentation reprend sous l'effet d'un deuxième apport malgré le taux d'alcool (2: 3 ml glc 1,5 M).

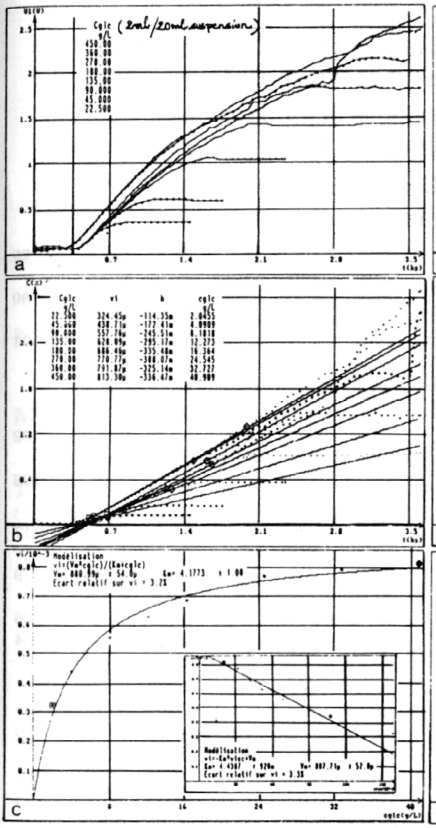

Figure 5 : Etude de l'effet de la concentration du glucose sur la vitesse de fermentation.

a : Acquisitions continues V/t à différentes concentrations déclenchantes de glucose.

b : Traduction des courbes en C = f(t) et détermination des vitesses initiales.

c : Graphe et modélisation secondaires vi = f(C): la loi de Michaëlis s'ajuste assez bien. En encart: linéarisation vi = f(vi/C) d'Eadie Hofstee.

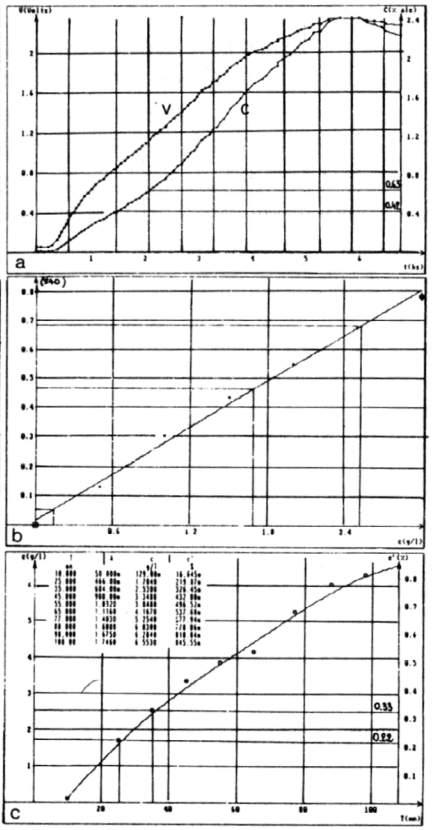

Figure 6 : Comparaison de suivis d'une fermentation par le capteur à gaz « alcool » et par dosage enzymatique sur des prélèvements.

a: Courbes données par le capteur.

b et c: Etalonnage et résultats du dosage de l'alcool par l'alcool déshydrogénase sur les prélèvements du milieu.