



HAL
open science

Compréhension de la stabilité des levures sèches actives au travers des phénomènes de déshydratation et de réhydratation par des approches biophysiques et microbiologiques

Pauline Ribert

► **To cite this version:**

Pauline Ribert. Compréhension de la stabilité des levures sèches actives au travers des phénomènes de déshydratation et de réhydratation par des approches biophysiques et microbiologiques. Biologie végétale. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCK048 . tel-04266112

HAL Id: tel-04266112

<https://theses.hal.science/tel-04266112v1>

Submitted on 31 Oct 2023

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

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



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A AGROSUP DIJON**

Ecole doctorale n° 554

Environnement - Santé

Doctorat de Biotechnologies agro-alimentaires

Par **Pauline Ribert**

Compréhension de la stabilité de levures sèches actives au travers des phénomènes de déshydratation et de réhydratation par des approches biophysiques et microbiologiques

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 29 novembre 2021

Composition du Jury :

| | | | |
|------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|
| Mme. Claire Gaiani | Professeur | Université de Lorraine | Présidente du jury |
| Mme. Fernanda Fonseca | Directrice de recherches | INRAE - AgroParisTech | Rapporteur |
| M. Jean-Marie François | Professeur | INSA, Toulouse | Rapporteur |
| Mme. Gaëlle Roudaut | Maitre de conférences | AgroSup Dijon | Examineur |
| M. Laurent Beney | Professeur | AgroSup Dijon | Directeur de thèse |
| M. Sébastien Dupont | Maitre de conférences | AgroSup Dijon | Co-encadrant de thèse |
| Mme. Cécile Sampsonis | Docteur | Phileo by Lesaffre | Membre du jury invité |

Remerciements

Je tiens à remercier Phileo, filiale du groupe Lesaffre et l'association nationale de la recherche technologie (ANRT) pour avoir financé ce projet de thèse.

Je remercie également Madame Fonseca et Monsieur François d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse, ainsi que Madame Gaiani et Madame Roudaut d'avoir accepté de l'examiner.

Je suis sincèrement convaincu que la thèse n'est pas un travail solitaire de recherche mais un véritable travail d'équipe où chacun contribue à la construction et au développement du projet. Je tiens à remercier toute « mon équipe » avec qui j'ai pris plaisir à travailler et avec laquelle j'ai pu évoluer en tant « qu'apprentie chercheur ».

Mes premiers remerciements sont adressés à mon binôme de directeurs de thèse, Laurent Beney, directeur de l'UMR PAM et Sébastien Dupont, co-directeur de l'équipe PMB. Je tiens à les remercier et à leur exprimer ma sincère gratitude pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour le temps qu'ils m'ont accordé malgré leur emploi du temps extrêmement chargé. Merci pour vos précieux conseils et pour votre soutien tout au long de ces trois années de recherche. Je vous remercie également pour votre exigence et la liberté que vous m'avez laissé qui m'ont permis de progresser.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Cécile Sampsonis, responsable de la plateforme formulation de Phileo, pour son soutien, son écoute, son implication et ses précieux conseils. Evoluer à tes côtés a été un réel plaisir !

Je tiens également à remercier Jean-Bernard Souici, expert séchage du groupe Lesaffre, pour son implication dans ces travaux de thèse, ainsi que pour toutes les connaissances sur le séchage de la levure qu'il m'a transmises et pour tous ses précieux conseils !

Je remercie Gaëlle Roudaut pour s'être rendue disponible, pour m'avoir prodigué maints conseils dans l'encadrement des stagiaires et sur bien d'autres sujets ainsi que pour avoir accepté de me guider dans le monde de la thermophysique, qui était pour moi inconnu avant cette thèse.

Je remercie Pauline Peletier-Pain, Eric Auclair et Aurore Potel, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et pour leur investissement dans ces travaux.

Je remercie également Eric Lesniewska ainsi que la plateforme d'imagerie Dimacell, Laure Avoscan et Aline Bonnotte, pour leurs aides précieuses dans les observations des sphérules et des levures en microscopie AFM et microscopie électronique.

Je remercie mes collègues de Phileo, avec une dédicace spéciale à la plateforme formulation, pour les bons moments passés et les nombreuses discussions. Mes remerciements vont également à mes collègues du groupe Lesaffre avec qui j'ai eu la chance de travailler.

J'adresse également un grand merci aux membres de l'équipe PMB. Merci à Sylvie pour son soutien technique indispensable, à Florence pour sa gestion sans faille dans la jungle administrative et à Céline qui a pris la suite, à Pascale pour son aide en microscopie. Je tiens également à remercier Laetitia pour sa bonne humeur constante et sa joie de vivre !

Merci à ceux qui ont partagé mon quotidien durant ces trois dernières années : les doc' et post-doc' de l'équipe et des équipes d'à côté (je ne vous cite pas car vous êtes trop nombreux...). Je vous remercie pour tous les moments passés ensemble au labo et à l'extérieur. Spéciale dédicace aux doctorants du bureau 5bis qui ont commencé leur thèse en même temps que moi, Fafou & Jéjé, ainsi qu'à ceux qui l'ont rejoint après, Max & Jojo !

Et pour finir un énorme MERCI à ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille dans cette obscure et fabuleuse aventure du doctorat !

L'essence même de la science est l'opposition...

Table des matières

| | |
|--|----|
| Introduction | 15 |
| Synthèse bibliographique | 18 |
| 1. Conservation de micro-organismes : la stratégie de la déshydratation | 19 |
| 1.1. L'eau, une molécule essentielle à la vie | 19 |
| 1.1.1. La molécule d'eau : un élément structurant | 19 |
| 1.1.2. La molécule d'eau : un transporteur de composés dissous ou en suspension | 20 |
| 1.1.3. La molécule d'eau : un solvant permettant les réactions biochimiques | 21 |
| 1.2. Conservation de micro-organismes à différentes humidités relatives | 21 |
| 1.3. Procédés de déshydratation des micro-organismes | 22 |
| 1.3.1. La déshydratation : échange d'eau entre la cellule et son environnement | 22 |
| 1.3.2. La déshydratation : un panel de techniques de séchage | 25 |
| 1.4. Les levures sèches actives | 29 |
| 2. Effets des perturbations hydriques sur les cellules : déshydratation et réhydratation | 31 |
| 2.1. Effets de la déshydratation sur les cellules | 31 |
| 2.1.1. Effets mécaniques engendrés par la déshydratation | 32 |
| 2.1.2. Effets structuraux engendrés par la déshydratation | 36 |
| 2.1.3. Solidification de la matrice engendrée par la déshydratation | 38 |
| 2.1.4. Contraintes oxydatives engendrées par la déshydratation | 38 |
| 2.2. Effets de la réhydratation sur les cellules | 41 |
| 3. Conservation des levures sèches actives : le tréhalose une molécule incontournable | 44 |
| 3.1. Le tréhalose : une molécule clé dans la résistance à la déshydratation et la conservation dans le temps | 44 |
| 3.1.1. Le tréhalose : généralités | 44 |
| 3.1.2. Le tréhalose : un disaccharide aux propriétés particulières | 45 |
| 3.1.3. Résistance et tréhalose | 48 |
| 3.2. Etat vitreux : un système de conservation optimal | 49 |
| 3.2.1. Etat vitreux | 49 |
| 3.2.2. Conservation des cellules sur de longues périodes | 51 |
| 4. Conclusion et présentation des axes de la thèse | 53 |
| Matériel et Méthodes | 55 |
| 1. Levures sèches actives | 56 |
| 2. Réhydratation | 57 |
| 2.1. Protocole de réhydratation classique | 57 |
| 2.2. Protocole de réhydratation ménageant | 57 |

| | |
|--|----|
| 3. Mesure de la viabilité des levures | 57 |
| 3.1. Mesure de cultivabilité | 57 |
| 3.2. Estimation de l'intégrité membranaire | 58 |
| 4. Evaluation de la résistance au procédé de granulation | 58 |
| 4.1. Prémélanges | 58 |
| 4.2. Mélanges farines | 58 |
| 4.3. Procédé de granulation | 59 |
| 4.4. Réhydratation et mesure de la cultivabilité des levures | 59 |
| 5. Etude de stabilité de la viabilité | 60 |
| 6. Méthodes de caractérisation biochimique de la composition des levures sèches actives | 60 |
| 6.1. Détermination de l'activité de l'eau | 60 |
| 6.2. Détermination de la teneur en eau | 61 |
| 6.3. Détermination de la teneur en azote totale | 61 |
| 6.4. Détermination de la teneur en tréhalose total | 61 |
| 7. Méthodes de caractérisation physique des levures sèches actives | 61 |
| 7.1. Granulométrie laser | 61 |
| 7.2. Surface spécifique | 62 |
| 7.3. Porosité à intrusion de mercure | 62 |
| 7.4. Estimation de la porosité fermée par calcul de la masse volumique | 63 |
| 8. Méthodes de caractérisation des propriétés thermophysiques des levures sèches actives | 64 |
| 8.1. Calorimétrie à balayage différentiel | 64 |
| 8.2. Diffraction de rayons X | 66 |
| 9. Etude de la structure cellulaire des levures sèches actives par microscopie | 67 |
| 9.1. Microscopie électronique à balayage | 67 |
| 9.2. Microscopie de force atomique | 67 |
| Résultats et Discussion | 70 |
| Chapitre 1 : Effets des barèmes de séchage sur les caractéristiques biologiques et physico-chimiques des levures sèches actives | 71 |
| 1. Effets des conditions environnementales sur la viabilité des levures A, B et C | 72 |
| 1.1. Effets des conditions de réhydratation sur la viabilité des levures | 72 |
| 1.2. Effet du stockage à des humidités relatives intermédiaires sur la viabilité des levures | 75 |
| 1.2.1. Effets de la conservation à bas niveau d'hydratation sur la viabilité des levures | 75 |
| 1.2.2. Effets de la conservation à différents niveaux d'humidités intermédiaires sur la viabilité des levures pour des temps inférieurs à 2 mois | 76 |

| | | |
|--|---|-----|
| 1.2.3. | Effets de la conservation à différents niveaux d'humidités intermédiaires sur la viabilité des levures pour des temps supérieurs à 3 mois | 78 |
| 1.3. | Evaluation des propriétés de résistance aux contraintes thermomécaniques rencontrées lors du procédé de granulation. | 80 |
| 2. | Etude de la composition biochimique et biologique des levures sèches actives | 85 |
| 2.1. | Caractérisation biochimique : une différence de taux d'hydratation | 85 |
| 2.2. | Caractérisation biologique : effet du séchage sur le nombre de cellules totales | 86 |
| 2.3. | Caractérisation biologique : effet de la réhydratation sur les populations de levures | 87 |
| 3. | Etude des caractéristiques physiques des levures sèches actives | 90 |
| 3.1. | Granulométrie des sphérules de levures | 90 |
| 3.2. | Surface spécifique et porosités | 92 |
| 4. | Etude de la matrice vitrifiée des levures sèches actives | 94 |
| 4.1. | Levures sèches actives : une matrice vitrifiée | 94 |
| 4.2. | Etude de la relaxation enthalpique associée au vieillissement de la matrice vitrifiée des levures sèches actives | 96 |
| 5. | Discussion | 98 |
| Chapitre 2 : Effets des conditions environnementales sur la viabilité des levures sèches actives | | 101 |
| 1. | Etude de la dévitrification sur la stabilité et la résistance de levures sèches actives | 104 |
| 1.1. | Introduction | 105 |
| 1.2. | Materiel and method | 107 |
| 1.2.1. | Biological samples | 107 |
| 1.2.2. | Determination of trehalose content | 107 |
| 1.2.3. | Differential scanning calorimetry | 107 |
| 1.2.4. | Hydration of ADYs to intermediate a_w for long exposure in a supercooled state | 108 |
| 1.2.5. | Hydration of ADYs to intermediate a_w and thermal treatment for exposure in the supercooled state | 109 |
| 1.2.6. | Viability measurement | 109 |
| 1.2.7. | Determination of the decimal reduction time | 110 |
| 1.2.8. | Statistical analysis | 110 |
| 1.3. | Results | 110 |
| 1.3.1. | Glass transition of ADYs | 110 |
| 1.3.2. | Long exposure of hydrated yeasts to intermediate a_w in the supercooled state at room temperature: persistence of viability over time | 112 |

| | |
|---|-----|
| 1.3.3. Short transient exposure of yeasts to states ranging from the glassy to the supercooled states via thermal means: ADY resistance to high temperature | 115 |
| 1.3.4. Thermal resistance of yeasts hydrated at intermediate a_w in the supercooled state | 116 |
| 1.4. Discussion | 119 |
| 1.5. Acknowledgements | 123 |
| 2. Rôle des constituants cellulaires et du tréhalose dans la vitrification des levures au cours du séchage | 123 |
| 2.1.1. Introduction | 125 |
| 2.1.2. Material and methods | 127 |
| 2.1.2.1. Biological materials | 127 |
| 2.1.2.2. Formulations preparation | 127 |
| 2.1.2.3. Determination of water activity | 127 |
| 2.1.2.4. Differential scanning calorimetry | 127 |
| 2.1.2.5. Determination of the rate of crystallization | 128 |
| 2.1.3. Results | 128 |
| 2.1.4. Discussion | 131 |
| 2.1.5. Acknowledgements | 133 |
| 3. Discussion | 133 |
| Chapitre 3 : Evolution structurale et morphologique des levures au cours du séchage | 137 |
| 1. Conséquence de la déshydratation : passage de la sphère au dodécaèdre | 140 |
| 2. Effets de la déshydratation sur l'enveloppe cellulaire | 147 |
| 3. Discussion | 150 |
| Conclusion générale | 152 |
| Références bibliographiques | 158 |
| Annexe | 176 |
| Liste des communications | 177 |

Table des illustrations

- Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Simulation des interactions entre les molécules d'eau et les phospholipides d'une membrane plasmique | 20 |
| Figure 2. Diagramme d'état de l'eau | 26 |
| Figure 3. Diagramme d'état de l'eau | 27 |
| Figure 4. Diagramme d'état de l'eau | 28 |
| Figure 5. Conséquences de la déshydratation par évaporation sur la physiologie cellulaire | 31 |
| Figure 6. Variation de la pression osmotique et du volume cellulaire dans les cas d'un choc hypersmotique en fonction du temps | 32 |
| Figure 7. Observation de levure <i>S. cerevisiae</i> en MET après un choc hyperosmotique | 33 |
| Figure 8. Observation de levure <i>S. cerevisiae</i> en MET après une rampe osmotique | 35 |
| Figure 9. Explication schématique de l'élimination de l'eau d'une protéine repliée entraînant sa dénaturation | 36 |
| Figure 10. Organisation des membranes biologiques en condition hydratée (phase liquide désordonnée), en condition déshydratée (phase gel) | 37 |
| Figure 11. Schéma explicatif des contraintes oxydatives et des molécules de défenses impliquées | 40 |
| Figure 12. Structure moléculaire du tréhalose | 44 |
| Figure 13. Voie de biosynthèse du tréhalose | 45 |
| Figure 14. Hypothèse du remplacement de l'eau | 46 |
| Figure 15. Théorie de la vitrification | 47 |
| Figure 16. Diagramme de phase du tréhalose | 51 |
| Figure 17. Sphérules de levures observées à la loupe binoculaire | 56 |
| Figure 18. Schéma explicatif du procédé de granulation et paramètres utilisés | 59 |
| Figure 19. Phénomènes thermophysiques révélés par la DSC | 64 |
| Figure 20. Phénomène de transition vitreuse | 65 |
| Figure 21. Etapes d'un run de DSC | 66 |
| Figure 22. Principe du microscope électronique à balayage | 67 |
| Figure 23. Principe du microscope de force atomique | 68 |
| Figure 24. Organigramme de l'étude comparative des levures A, B et C | 71 |
| Figure 25. Effets de la température et de la composition de la solution de réhydratation sur le taux de survie des levures A, B et C | 73 |

| | |
|---|-----|
| Figure 26. Effet d'une réhydratation choc versus une réhydratation douce sur la viabilité des levures A, B et C | 74 |
| Figure 27. Effets de la conservation à 12% HR sur la viabilité des levures A, B et C | 76 |
| Figure 28. Effets de la conservation à différents niveaux d'humidités intermédiaires sur la viabilité des levures pour des temps inférieurs à 2 mois | 77 |
| Figure 29. Effets de la conservation à différents niveaux d'humidités intermédiaires sur la viabilité des levures pour des temps supérieurs à 3 mois | 79 |
| Figure 30. Organigramme de l'évaluation de la résistance des levures aux contraintes thermomécaniques du procédé de granulation | 81 |
| Figure 31. Observation d'une fraction de sphérule de levures à la périphérie de la sphérule au microscope électronique à balayage | 87 |
| Figure 32. Répartitions des classes granulométriques des sphérules de levures A, B et C | 91 |
| Figure 33. Observations de sphérules de levures après fracture au microscope électronique à balayage | 93 |
| Figure 34. Superposition des thermogrammes des levures A, B et C | 94 |
| Figure 35. Superposition des thermogrammes des levures A, B et C après équilibrage à une a_w de 0,33 | 95 |
| Figure 36. Diagramme de transition vitreuse | 96 |
| Figure 37. Evolution des relaxations enthalpiques de levures A, B et C | 97 |
| Figure 38. Position of samples $S_{0.12}$ (a_w , 0.12), $S_{0.33}$ (a_w , 0.33), $S_{0.43}$ (a_w , 0.43), $S_{0.55}$ (a_w , 0.55) and $S_{0.75}$ (a_w , 0.75) at 25 °C according to the ADY phase diagram | 108 |
| Figure 39. Glass transition of ADY hydrated at different RH values | 115 |
| Figure 40. Glass transition of ADY hydrated at different RH values | 111 |
| Figure 41. Long-term viability of hydrated yeast at intermediate a_w and 25 °C | 113 |
| Figure 42. Effect of long storage in the supercooled state on the D value at 25 °C | 114 |
| Figure 43. Effects of heat treatments on the viability of sample $S_{0.12}$ (a_w , 0.12) | 115 |
| Figure 44. Effects of heat treatments on ADY balanced at different RH values | 117 |
| Figure 45. Effect of transient exposure in the supercooled state on D values at 50 °C, 75 °C and 100 °C | 119 |
| Figure 46. Superposition of the glass transition curve of ADYs on the trehalose glass transition curve | 120 |
| Figure 47. Diagramme de transition vitreuse des levures sèches actives | 124 |
| Figure 48. Thermograms of different formulations after storage at different RH | 129 |
| Figure 49. Phase diagram of trehalose | 130 |

| | |
|--|-----|
| Figure 50. Diagram of the crystal rate in function of the yeast protein/ trehalose ratio and the RH | 131 |
| Figure 51. Consequences of dehydration in function of system | 132 |
| Figure 52. Digramme de transition vitreuse des levures sèches actives | 134 |
| Figure 53. Observation des levures à a_w 0,12 de la surface au centre d'une sphérule | 141 |
| Figure 54. Observation des levures à a_w 0,12 au microscope électronique à balayage après fracture de la sphérule. | 142 |
| Figure 55. Observation des levures à a_w 0,99 en microscopie confocale après marquage au calcofluor | 143 |
| Figure 56. Observation d'un rayon des levures hydratées à a_w 0,75 de la périphérie au centre d'une sphérule | 143 |
| Figure 57. Observation des levures à a_w 0,43 de la périphérie au centre d'une sphérule | 144 |
| Figure 58. Pourcentage du volume cellulaire initial en fonction de l' a_w , lors de la réhydratation de levures <i>S.cerevisiae</i> déshydratée osmotiquement en milieu liquide et de levures industrielles | 146 |
| Figure 59. Epaisseur moyenne de l'enveloppe cellulaire en fonction de l' a_w | 148 |
| Figure 60. Observation de la topographie de surface d'une paroi de levure par microscopie de force atomique | 149 |
| Figure 61. Scénario de la transition morphologique des cellules et de le l'enveloppe cellulaire, de la sphère au dodécaèdre, se produit durant le procédé de séchage | 151 |

- Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. Température de transition vitreuse des principaux sucres retrouvés chez les anhydrobiotes | 50 |
| Tableau 2. Viabilités des levures A, B et C lors du procédé de granulation avec différents supports | 82 |
| Tableau 3. Tableau de synthèse de l'étude comparative des levures A, B et C soumises à des perturbations environnementales | 84 |
| Tableau 4. Composition biochimique des sphérules de levures A, B et C | 85 |
| Tableau 5. Evolution du nombre de cellules totales au cours des procédés de séchage A, B et C, après réhydratation classique | 86 |
| Tableau 6. Comparaison des populations cultivables et perméabilisées de levures issues des sphérules A, B et C après réhydratation classique versus ménageante | 88 |
| Tableau 7. Tableau de synthèse de l'étude comparative des compositions biochimique et biologique des levures A, B et C | 90 |
| Tableau 8. Paramètres granulométriques des sphérules de levures A, B et C. | 91 |
| Tableau 9. Surfaces spécifiques et porosités de surface des sphérules de levures A, B et C | 92 |
| Tableau 10. Estimation de la présence d'inclusion au sein des sphérules A, B et C au travers d'une comparaison entre masse volumique théorique et masse volumique mesurée | 92 |
| Tableau 11. Tableau de synthèse de l'étude comparative caractéristiques physiques des levures A, B et C | 93 |
| Tableau 12. Températures de transition vitreuse des levures A, B et C | 95 |
| Tableau 13. Tableau de synthèse de l'étude comparative des propriétés thermophysiques des levures A, B et C | 98 |
| Tableau 14. Propriétés de résistance des levures C' et C lors de différentes études. | 135 |
| Tableau 15. Estimation des caractéristiques géométriques des levures agglomérées dans les sphérules en fonction de leur niveau d'hydratation | 145 |
| Tableau 16. Estimations du nombre de cellules par sphérule | 147 |

Introduction

Les premières observations d'organismes capables de survivre à une dessiccation ont été rapportées en 1702 par Anthony Van Leeuwenhoek. Plus de 300 ans après, des levures *Saccharomyces cerevisiae* ont été envoyées au-delà de l'orbite terrestre dans le cadre de la mission BioSentinel. Cet organisme a été choisi pour sa haute résistance à la dessiccation et sa robustesse à l'état déshydraté, ce qui lui permet de survivre à des conditions extrêmes comparables à celles d'une mission d'exploration sur Mars. L'anhydrobiose, c'est-à-dire la capacité de certains organismes à suspendre de manière temporaire et réversible leur métabolisme en conditions de sécheresse extrêmes, fascine les scientifiques. En effet, l'eau étant une molécule essentielle à la vie, son élimination provoque des modifications structurales et fonctionnelles qui sont plus fréquemment à l'origine de la mort cellulaire. Les anhydrobiotes mettent en place un arsenal de défenses leur permettant de résister à cet environnement extrême.

L'exploitation des levures de panification et de brasserie remonte au 18^{ème} siècle. Néanmoins leur conservation était courte et difficile en raison de leur taux d'hydratation très élevé. Avec l'essor des technologies et l'apparition des procédés de séchage, l'amélioration de la conservation des levures a été rendue possible. La suspension prolongée et réversible des activités cellulaires par déshydratation reste un objectif clé pour l'exploitation industrielle des micro-organismes d'intérêts comme *Saccharomyces cerevisiae*. Le procédé de séchage doit garantir la préservation optimale de la population et de son activité cellulaire. Les industriels ont su développer leur savoir-faire et exploiter de manière remarquable les propriétés de résistance à la déshydratation des levures, en améliorant progressivement leurs procédés par empirisme. Aujourd'hui les levures sèches actives présentent des taux de survie allant de 50 à 90% après séchage et réhydratation. Bien que ce taux soit déjà élevé, les industriels dans une optique d'amélioration constante de la qualité de leurs produits au cours du temps et dans leurs remises en œuvre, cherchent à augmenter ce dernier.

Ce projet de thèse est soutenu par Phileo, business unit du groupe Lesaffre dédiée à la santé et à la nutrition animale. Phileo développe et commercialise des micro-organismes séchés et actifs dont les levures probiotiques sur lesquelles portent nos travaux. Actuellement, les produits de type probiotique sont caractérisés essentiellement par leur nombre de cellules revivifiables. Les levures industrielles sont soumises à différentes perturbations de leur production à leur utilisation et plus particulièrement à des perturbations mécaniques, thermiques, oxydatives et osmotiques. Ces dernières ont pour conséquence d'impacter le nombre de cellules revivifiables. De plus, les levures sèches actives étudiées dans le cadre de cette thèse sont destinées à l'alimentation animale. Par conséquent, elles sont, avant leur ingestion, incorporées dans des

matrices alimentaires par des procédés pouvant également impacter fortement le nombre de cellules revivifiables. L'industriel est inscrit dans une démarche d'amélioration constante de ses produits afin d'augmenter leur qualité et sa productivité. Son objectif est donc d'augmenter et de garantir un nombre de cellules revivifiables maximum dans ses produits. Dans cette optique, une collaboration entre le groupe Lesaffre et l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM), ayant une forte expertise dans les domaines de la conservation de micro-organismes et du génie des procédés, a été établie depuis quelques années. Dans ce contexte et afin de répondre aux exigences industrielles, ces travaux de thèse ont été développés avec pour objectif de comprendre comment les paramètres de séchage affectent l'aptitude des levures sèches actives dans différentes conditions de remise en œuvre. Pour cela, trois générations de produits contenant des levures séchées et agglomérées sous forme de sphérules ont été fournies par l'industriel. Ils seront nommés A, B et C dans ce manuscrit.

Ce mémoire débute par une synthèse bibliographique dédiée à la conservation des micro-organismes et plus particulièrement des levures ainsi qu'aux mécanismes mis en place afin de les préserver. Une attention particulière a été portée au tréhalose, molécule essentielle dans la résistance à la déshydratation des organismes anhydrobiotes. Par ailleurs, cet état de l'art nous a permis de montrer la faible quantité de connaissances sur la viabilité des levures aux humidités relatives intermédiaires. Les objectifs et les axes de recherche de cette thèse seront présentés à la fin de la synthèse bibliographique. Les levures industrielles ainsi que les méthodes utilisées lors de ces travaux de recherche sont présentées dans la section matériel et méthodes de ce manuscrit. La troisième section est consacrée à la synthèse des résultats ainsi qu'à leur discussion. Pour finir, une conclusion générale est présentée, soulignant les principaux résultats de ces travaux de thèse.

Synthèse bibliographique

1. Conservation de micro-organismes : la stratégie de la déshydratation

L'eau est une molécule essentielle à la vie cellulaire (Ball 2008). Néanmoins, son implication dans les réactions chimiques de dégradation limite la conservation de cellules sur de longues périodes. En effet, la survie d'une population de cellules conservées en milieu hydraté décroît rapidement. Cette dégradation est principalement due à la mobilité moléculaire. La stratégie de conservation des cellules repose donc sur le retrait de l'eau, permettant ainsi la diminution de la mobilité moléculaire et donc l'augmentation du temps de conservation des cellules. Le retrait de l'eau est basé sur les échanges hydriques avec la phase gazeuse de l'air. La déshydratation est une méthode utilisée depuis des décennies par les industriels afin de commercialiser des micro-organismes stables dans le temps (Morgan et al. 2006).

1.1. L'eau, une molécule essentielle à la vie

Les molécules d'eau sont des constituants majeurs au sein de la cellule. Elles représentent 60 à 95 % du volume d'une cellule (Ellis and Minton 2003). L'eau est une petite molécule, composée d'un atome d'oxygène (chargé négativement) et de deux atomes d'hydrogène (chargés positivement). Ceci confère à la molécule une charge électrique non homogène lui permettant de former des liaisons hydrogène (interactions électrostatiques) entre molécules d'eau ou avec d'autres molécules. Ces liaisons hydrogène ont un temps de vie d'environ une picoseconde. Par conséquent, elles s'établissent et se rompent continuellement. Grâce à ces propriétés, trois rôles clés sont attribués à l'eau intracellulaire permettant à la cellule d'assurer son métabolisme et de pouvoir se diviser (Ball 2008). Ils seront décrits dans les paragraphes ci-dessous.

1.1.1. La molécule d'eau : un élément structurant

L'eau permet la structuration des membranes ainsi que des macromolécules, comme les protéines ou les acides nucléiques. Les membranes biologiques sont composées de phospholipides, organisés en bicouche lipidique dans lesquelles sont enchâssées des protéines. Les phospholipides ont la propriété d'être des molécules amphiphiles. Par conséquent, à l'état physiologique, les parties polaires sont hydratées et les parties hydrophobes interagissent entre elles (figure 1). Les bicouches sont alors dans un état liquide - cristallin désordonné, leur permettant d'assurer des fonctions physiologiques vitales à la cellule.

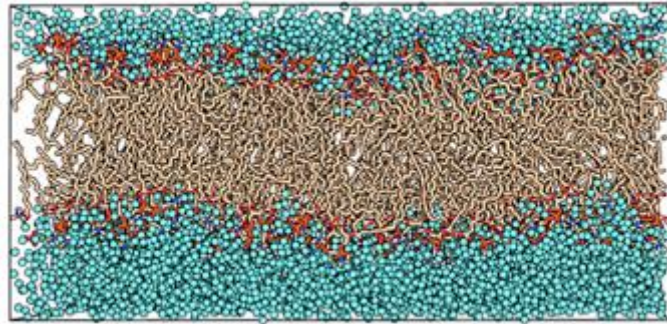


Figure 1. Simulation des interactions entre les molécules d'eau et les phospholipides d'une membrane plasmique (Golovina et al. 2010). Les cercles bleus représentent les molécules d'eau, les cercles rouges correspondent aux têtes polaires des phospholipides et les parties jaunes aux queues apolaires des phospholipides.

Les molécules d'eau présentes à la surface d'une macromolécule sont réparties de façon hétérogène. Ces clusters ont la capacité de former des liaisons hydrogènes avec des groupements hydrophiles et à répulser les groupements hydrophobes. Par exemple, les groupements d'acides aminés hydrophiles des protéines sont positionnés vers l'extérieur alors que les groupements hydrophobes sont répulsés vers l'intérieur de la structure (Tanford 1997). Le rôle de la couche d'hydratation présente à la surface de la double hélice d'ADN s'illustre en évitant l'écartement des deux brins grâce à la réduction des forces de répulsion entre les groupements phosphates permettant ainsi sa stabilisation (Fuller et al. 2004). Elle permet également les transitions structurales entre les différentes conformations de l'ADN (Brovchenko et al. 2007).

1.1.2. La molécule d'eau : un transporteur de composés dissous ou en suspension

L'eau intracellulaire permet le transport de composés dissous ou en suspension. Cette propriété est basée sur la mobilité de l'eau mais également sur sa capacité à dissoudre les molécules. En effet, les molécules d'eau sont d'excellents solvants d'ions et de molécules polaires. Les molécules polaires peuvent établir des liaisons hydrogènes avec des composés dipolaires comme l'eau. Les molécules d'eau forment alors une couche de solvatation autour de la molécule polaire, lui permettant d'augmenter sa solubilité.

1.1.3. La molécule d'eau : un solvant permettant les réactions biochimiques

Les nombreuses propriétés des molécules d'eau les placent dans un rôle central des réactions biochimiques intracellulaires. En effet, bien que l'encombrement moléculaire soit important dans une cellule hydratée (400 g.L⁻¹) (Ellis and Minton 2003), l'eau intracellulaire constitue un milieu réactionnel pour les réactions biochimiques. Elle peut également intervenir en tant qu'acide ou base dans les réactions acido-basiques ou encore comme catalyseur dans les réactions d'oxydo-réductions.

1.2. Conservation de micro-organismes à différentes humidités relatives

La viabilité de micro-organismes à des valeurs d'humidité relative (HR) intermédiaires est généralement considérée comme courte dans le temps. Elle peut s'étendre de quelques heures pour des bactéries comme *Lactobacillus acidophilus* (Kurtmann et al. 2009) à quelques mois pour *Lactobacillus bulgaricus* (Passot et al. 2012). Par exemple, l'étude de *Lactobacillus salivarius* conservé à 59% HR montre une perte totale de la population après 12 jours de stockage (Castro et al. 1995). Dans une autre étude, la survie de l'agent pathogène *Listeria monocytogenes* a été examinée à différentes valeurs d'HR (Zoz et al. 2016). Une exposition de 3 heures à 68% HR a engendré une perte de 3.2 log. La conservation de *Rhizobium japonicum* à différente HR a révélé la diminution de la survie avec l'augmentation de l'humidité de stockage (Mugnier and Jung 1985). La diminution de la viabilité est généralement expliquée par la présence de réactions biochimiques pouvant être associées à des réactions de dégradation cellulaire. La durée de conservation de cellules dans le temps est donc corrélée à leur niveau d'hydratation et à la mobilité moléculaire. Au sein d'une cellule, des molécules d'eau peuvent être impliquées dans des interactions fortes (rôle structurant) (Jasnin et al. 2008). Ces molécules d'eau présenteraient des mouvements plus lents. L'autre part des molécules d'eau se distinguerait par une mobilité moléculaire plus importante. Elle correspondrait aux molécules d'eau impliquées en tant que solvant dans les réactions biochimiques et comme transporteur. Réduire la quantité d'eau présente dans l'espace cellulaire a pour conséquence l'augmentation de la viscosité et donc la diminution des vitesses de réaction et de la mobilité moléculaire. Ces faits expliquent l'intérêt de retirer l'eau pour préserver les cellules.

1.3. Procédés de déshydratation des micro-organismes

1.3.1. La déshydratation : échange d'eau entre la cellule et son environnement

Le phénomène de déshydratation peut être engendré par le retrait d'une partie de l'eau ou par l'ajout de solutés dépresseurs (cas de la déshydratation osmotique). Elle entraîne des modifications d'hydratation mesurables par l'intermédiaire de paramètres physico-chimiques comme l'activité de l'eau (a_w), le potentiel chimique de l'eau (μ_w), le potentiel hydrique (ψ) et la pression osmotique (Π).

- *Activité de l'eau*

L'activité de l'eau est définie comme le rapport entre la pression partielle de vapeur de l'eau (p) dans l'environnement considérée et la pression de vapeur de l'eau pure (notée p_0) à une température donnée (Griffin 1981) (1).

$$(1) \quad a_w = \frac{p}{p_0}$$

L'ajout de solutés dans de l'eau pure provoque une diminution de l' a_w ayant pour conséquence la diminution de la quantité d'eau disponible pour les cellules. Une déshydratation poussée, permettant d'atteindre une a_w comprise entre 0,1 et 0,2, est nécessaire pour inhiber l'activité de certaines enzymes et conduire à une meilleure conservation des cellules.

- *Humidité relative de l'air*

L'HR de l'air correspond au rapport de la pression partielle de vapeur d'eau dans l'air (notée $p(vap)$) et de la capacité de vapeur d'eau maximale contenue dans l'air (notée $p(sat)$) à une température donnée (2).

$$(2) \quad HR = \frac{p(vap)}{p(sat)_{T_{donnée}}}$$

Au sein d'un système clos, le système va s'équilibrer permettant d'établir une relation entre a_w et HR telle que (3)

$$(3) \quad HR = a_w \times 100$$

- *Potentiel hydrique*

L'état hydrique de l'environnement influe directement l'hydratation des cellules. A l'origine de cet effet se trouvent les transferts d'eau entre l'environnement et les cellules, permettant l'établissement d'un équilibre. Ces transferts sont définis par des gradients de potentiel chimique établis entre la cellule et son environnement. Le potentiel chimique d'un constituant (noté μ_j et exprimé en $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) est défini par la fraction molaire d'énergie libre (noté G et exprimé en J) du constituant lorsque le nombre de moles des autres constituants (noté n_i), la température (noté T), la pression (noté P) et la force ionique (notée E) sont constants (4).

$$(4) \mu = \left(\frac{\delta G}{\delta n_j} \right)_{n_i, T, P, E}$$

Exprimons le potentiel chimique par rapport à un état standard initial (noté μ_j^0), défini par l'eau pure à une température donnée (5).

$$(5) \mu_j = \mu_j^0 + RT \ln a_w + \bar{V}_j P + z_j F E + m_j g h$$

avec R , la constante universelle des gaz ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; T , la température (K) ; a_w , l'activité de l'eau ; \bar{V}_j , le volume molaire partiel du constituant j ($\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$) ; z_j , la charge par mole du constituant j ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; F , la constante de Faraday ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; E , le potentiel électrique (V) ; m_j , la masse molaire du constituant j ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; g , l'accélération de la pesanteur ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$) ; h , la hauteur (m).

Considérons le cas de l'eau pure dans une situation microbiologique, la constante de Faraday peut être négligée et le terme gravitationnel ($m_j g h$) éliminé. Par conséquent le potentiel chimique de l'eau peut donc être défini par (6).

$$(6) \mu_w = \mu_w^0 + RT \ln a_w + \bar{V}_w P$$

Choisissons l'eau pure comme référence pour l'état standard initial (noté μ_w^0) (7).

$$(7) \frac{\mu_w - \mu_w^0}{\bar{V}_w} = \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w} + P$$

Un système à l'équilibre peut être défini par le potentiel hydrique (ψ), correspondant au terme $\frac{\mu_w - \mu_w^0}{\bar{V}_w}$. ψ est défini par la composante ψ_s (potentiel osmotique, part attribuable aux solutés

présents dans la solution) (8) et ψ_p (potentiel de pression, résultant de la pression hydrostatique) (9).

$$(8) \psi_s = \frac{RT}{V_w} \ln a_w$$

$$(9) \psi_p = P$$

Par conséquent et dans le cas d'une solution « idéale », l' a_w est égale à la fraction molaire en eau (noté N_w). Le potentiel osmotique peut donc s'écrire (10)

$$(10) \psi_s = RTC$$

Considérons un environnement plus complexe, le potentiel matriciel (noté ψ_m) et le potentiel gravitationnel (noté ψ_g) sont pris en considération, donnant alors la relation (11)

$$(11) \psi = \psi_s + \psi_p + \psi_m + \psi_g$$

Le potentiel matriciel correspond à la capacité d'une structure poreuse à retenir l'eau par capillarité. Il est considéré comme une composante majeure du potentiel de l'eau dans les milieux solides. En solution, le potentiel osmotique résulte de l' a_w de la solution. Il est défini par une pression. Par conséquent, la pression osmotique (notée Π) est égale à l'inverse du potentiel osmotique (12)

$$(12) \Pi = -\psi_s$$

L' a_w , le potentiel hydrique ou encore la pression osmotique permettent de caractériser le niveau énergétique de l'eau. Ils déterminent les gradients d'échange entre la cellule et son environnement. En effet, les potentiels de l'eau extra-et intra-cellulaires s'équilibrent. Par conséquent, lors d'une diminution du potentiel chimique de l'eau extracellulaire, l'eau intracellulaire va sortir de la cellule afin de rétablir l'équilibre : c'est le cas de la déshydratation. La diminution du potentiel hydrique, en lien avec la pression de turgescence comprise entre 0.05 et 0.2 MPa chez la levure (Martinez de Maranon et al. 1996) induira l'arrêt de la division cellulaire. De plus, la déshydratation entrainera également des perturbations mécaniques et biologiques des cellules et une solidification de la matrice participant à la diminution de l' a_w (Hills et al. 2001).

1.3.2. La déshydratation : un panel de techniques de séchage

Le séchage est une opération unitaire consistant à éliminer l'eau d'un composant, en partie ou en totalité, par changement d'état (évaporation ou sublimation) (Charreau et al. 1991). Il permet la stabilisation d'un système par ralentissement des réactions biochimiques et physico-chimiques. En revanche, les procédés de séchage génèrent des perturbations hydriques et thermiques et induisent également une contrainte oxydative, pouvant altérer la viabilité ou la fonctionnalité des cellules (Dupont et al. 2014).

Dans cette partie seront présentées différentes techniques de déshydratation couramment employées par les industriels (Morgan et al. 2006; Santivarangkna et al. 2007; Walters et al. 2014) ainsi que leurs conséquences sur les micro-organismes.

- *Lyophilisation*

La lyophilisation est une méthode de séchage consistant à éliminer l'eau à basse température et basse pression. Elle est composée de trois étapes : la congélation, la sublimation et la désorption (figure 2). Durant l'étape de congélation, les molécules d'eau sont transformées en cristaux de glace (passage de l'état liquide à l'état solide). La congélation est décrite comme une étape critique. En effet, la cinétique de congélation appliquée va directement influencer la taille des cristaux de glace formés pouvant fragiliser les membranes, mais également la structure du lyophilisat. La sublimation, également appelée désorption primaire, correspond au passage à l'état gazeux de la fraction d'eau congelée. Cette étape nécessite un apport d'énergie, par conséquent la température du lyophilisateur est progressivement augmentée. Pour finir, une étape permettant l'élimination de l'eau non congelée est réalisée : il s'agit de la dessiccation secondaire.

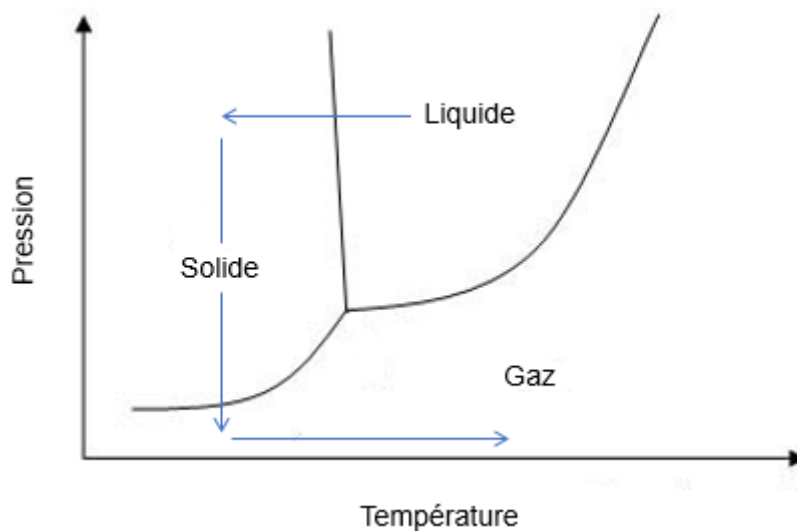


Figure 2. Diagramme d'état de l'eau. Les flèches bleues représentent les changements d'état correspondant aux étapes du procédé de lyophilisation.

Bien que la lyophilisation soit un procédé discontinu long et coûteux, son efficacité et les qualités des produits obtenus lui permettent une utilisation courante en industries agro-alimentaires et pharmaceutiques. Elle est la méthode de référence dans la production de bactéries (ferments ou probiotiques) sous forme sèche (Lodato et al. 1999; Barbosa et al. 2015; Broeckx et al. 2016). Elle permet d'obtenir des taux de cellules revivifiables compris entre 50 et 80%. En revanche, cette méthode n'est pas adaptée à tous les types cellulaires (Abadias et al. 2001). La perte de viabilité est majoritairement attribuée à la formation de cristaux de glace pouvant déstabiliser les membranes par exemple, ainsi qu'à la perturbation osmotique associée à la déshydratation. L'ajout de lyoprotectant, comme des disaccharides ou des polymères, permet la protection des cellules et donc d'augmenter la survie des micro-organismes (De Valdez et al. 1983; Conrad et al. 2000; Verlhac et al. 2019). Grâce à l'avancée des connaissances en lien notamment avec la contrainte oxydative et la gestion des conditions gazeuses en amont, au cours et post-procédé, la lyophilisation de cellules de plus en plus fragiles est désormais possible (Bodzen et al. 2020).

- *Atomisation*

L'atomisation est une technique de séchage reposant sur la nébulisation, puis la déshydratation d'une suspension par passage dans un flux d'air chaud à co-courant ou à contre-courant. La suspension est dispersée sous forme de gouttelettes dans une chambre de dessiccation

entraînant la formation de microgouttelettes (figure 3). Ces dernières sont entraînées et déshydratées dans un courant d'air chaud.

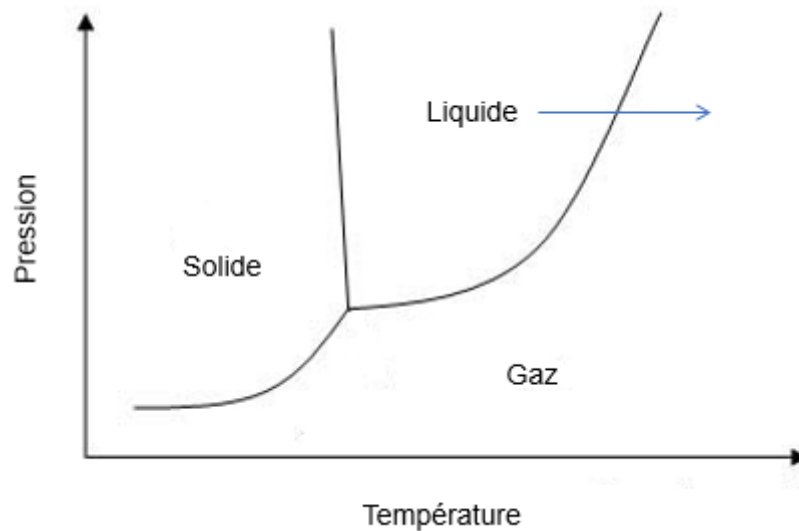


Figure 3. Diagramme d'état de l'eau. La flèche bleue représente le changement d'état correspondant à l'étape du procédé d'atomisation.

Cette technique, peu coûteuse et rapide, est très utilisée pour sécher des polymères, des pigments ou encore des poudres alimentaires comme le lait ou les flocons de purée (Millqvist-Fureby et al. 2000; Corcoran et al. 2004). Des micro-organismes peuvent également être déshydratés par atomisation, néanmoins leur survie dépend essentiellement de la souche considérée (100% de survie pour *Propionibacteria acidipropionici* (Schuck et al. 2013) ; 0,01 – 1,7 % de survie pour *Lactobacillus paracasei* (Desmond et al. 2002)), de l'utilisation de protectants et des conditions de déshydratation (Huang et al. 2017; Fu et al. 2018).

- *Séchage sur lit d'air fluidisé*

Le séchage sur lit d'air fluidisé permet la déshydratation de la matrice en suspension sur un coussin d'air chaud (compris entre 30 et 80 °C). La fluidisation induit l'augmentation de la surface de contact entre la matrice solide préalablement concentrée et l'environnement gazeux. En revanche, cette technique ne peut s'appliquer que sur des matrices granulaires. Le séchage sur lit d'air fluidisé est couramment utilisé par les industriels pour le séchage des levures. L'avantage majeur du séchage sur lit d'air fluidisé est la possibilité de travailler avec des températures de séchage peu élevées. Ce procédé permet d'obtenir des taux de survie allant de 50 à 90 % pour *Saccharomyces cerevisiae* (Bayrock and Ingledew 1997). En revanche, le

séchage par lit fluidisé ne permet pas d'atteindre des taux de survie comparable pour les bactéries (1 à 10 % de viabilité post séchage pour *Leuconostoc oenos* (Clementi and Rossi 1984). Mille et ses collaborateurs (Mille et al., 2004) ont proposé une amélioration de ce procédé permettant le séchage de bactéries lactiques *Lactobacillus plantarum*. Pour cela, le culot bactérien était mélangé à un support pulvérulent déshydraté (a_w 0,05) avant d'être séché. Cette optimisation a permis d'obtenir un taux de survie de 100% après réhydratation.

- *Séchage par formation de mousse sous vide*

Le séchage sous vide par formation de mousse est basé sur le principe d'ébullition sous vide (Bronshtein V. 2004). Elle est composée de deux étapes (figure 4). La première consiste à former une mousse par vaporisation du système sous vide à température ambiante. Cette étape permet la vitrification du système. La seconde étape permet la déshydratation de la mousse avec l'augmentation de la température. L'avantage majeur de cette technique est sa réalisation à des températures inférieures à 40 °C. Elle ne nécessite pas d'étape de congélation pouvant induire la mortalité des cellules. Le séchage par formation de mousse est utilisé pour la stabilisation d'enzymes ou de molécules thermolabiles ainsi que pour la conservation de rétrovirus (Hajare et al. 2009).

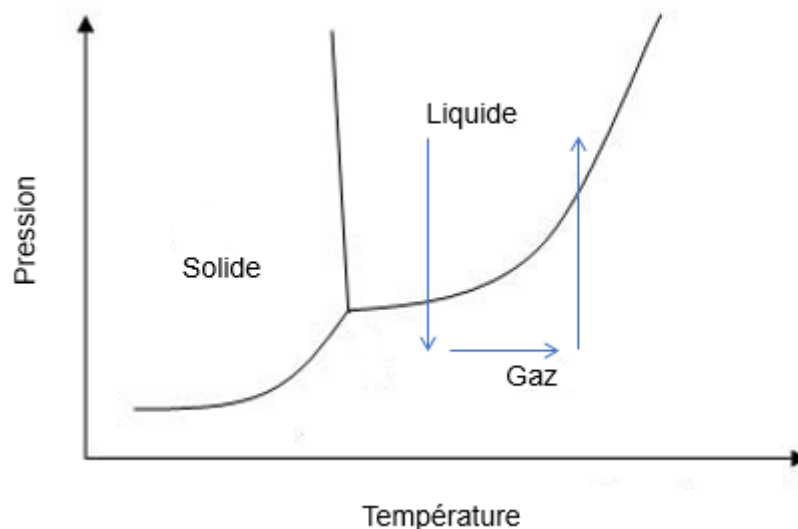


Figure 4. Diagramme d'état de l'eau. Les flèches bleues représentent les changements d'état correspondant aux étapes du procédé de séchage par formation de mousse.

1.4. Les levures sèches actives

Historiquement, les levures étaient très utilisées en boulangerie sous forme de levures fraîches pressées. Néanmoins, la conservation de ce produit n'était pas optimale. Elle dépendait de la période saisonnière et de la latitude géographique d'utilisation (Gélinas 2019). Au début du 20^{ème} siècle, Hammer montre qu'il peut conserver des bactéries vivantes durant 57 jours en évaporant l'eau contenue dans la suspension cellulaire. Les industriels ont donc cherché un moyen de retirer l'eau de leurs produits. La production industrielle de levures sèches actives (LSA) a ainsi débuté à la fin de la seconde guerre mondiale.

A l'origine de la production industrielle de LSA, les procédés ont été développés par empirisme. Les étapes en amont du procédé de séchage sont importantes pour la réussite du séchage. La première étape correspond à la production de la biomasse. Les schémas de fermentation sont établis en fonction de la souche produite et du procédé de séchage qui sera appliqué. Durant cette étape, les levures sont préparées métaboliquement. Les industriels appliquent des conditions particulières induisant la synthèse et l'accumulation de molécules impliquées dans la résistance à la déshydratation, comme le tréhalose par exemple (Pollock and Holmstrom 1951). Ce sucre protecteur s'accumule dans les cellules pendant la phase stationnaire de croissance (Lillie and Pringle 1980). Les cellules sont ensuite centrifugées et lavées partiellement de façon à éliminer le milieu de culture restant. Ce dernier pourrait impacter la survie des cellules lors du séchage (Perez-Torrado et al. 2015). Une première déshydratation est réalisée sur un filtre rotatif. La biomasse ne contient plus que 70 % d'eau. Après extrusion, l'eau est retirée de la biomasse par des procédés de séchage par entraînement. Deux procédés de séchage sont utilisés dans la production de LSA, conduisant à deux formes de produits :

- Un séchage sur lit d'air fluidisé permettra l'obtention de LSA sous forme cylindrique et poreuse, nommées IADY (Instant Active Dry Yeast). Cette forme se réhydrate très vite dans l'eau mais plus fragile vis-à-vis des traitements thermiques ou des phénomènes d'oxydation.
- Un séchage en tambour rotatif conduira à l'obtention de LSA agglomérées et sphérulées appelées ADY (Active Dry Yeast). La porosité de ce produit est plus faible, il est donc moins soluble à la réhydratation et plus résistant aux perturbations thermiques.

La teneur en eau des LSA en fin de séchage est comprise entre 4 et 7 %. Certains procédés de séchage nécessitent l'ajout de substances protectrices, comme le monostéarate de sorbitane (émulsifiant) ou l'acide ascorbique (anti-oxydant) (Colavizza and Quipourt-Isnard 2009). Le monostéarate de sorbitane permettrait la stabilisation de la membrane plasmique de la cellule

(Hasenhuettl 2008). Il est souvent utilisé dans le cas d'une production de LSA de type IADY. Un ajout d'acide ascorbique permet de neutraliser les radicaux libres (Comuzzo and Zironi 2013).

Les LSA sont traditionnellement utilisées en boulangerie, brasserie et vinification. Depuis quelques dizaines d'années, d'autres applications ont émergé. Les LSA sont également employées dans la lutte biologique, dans les procédés de biotransformation ou encore comme probiotiques en santé humaine ou animale (Rapoport et al. 2016). La production de LSA s'élevait à 1,5 millions de tonnes, toutes applications confondues en 2018. Aujourd'hui, ce marché est toujours en pleine expansion. L'interdiction d'utiliser des antibiotiques en prophylaxie dans les élevages, mis en place en Europe à partir de 2006 puis au Brésil et en Chine en 2020, a notamment permis le développement des LSA sur le marché de la nutrition et de la santé animale.

Les molécules d'eau sont des éléments clés à la vie cellulaire par leurs rôles structurant, de transporteur et de solvant dans les réactions biochimiques. La présence d'eau limite cependant la conservation et la stabilisation des micro-organismes sur de longues périodes. En effet, la mobilité moléculaire liée à l'eau est mise en cause dans les réactions de dégradation survenant lors de la conservation des micro-organismes. La stratégie de stabilisation employée par les industriels consiste donc à déshydrater les cellules, c'est-à-dire à retirer une partie de l'eau extra et intracellulaire. Différents procédés de déshydratation peuvent alors être utilisés, néanmoins ces méthodes peuvent altérer la viabilité et la fonctionnalité des micro-organismes. Nous verrons dans la partie suivante les effets de la déshydratation et de ses conséquences sur la physiologie des cellules, ainsi que les systèmes de protection des levures afin de résister aux perturbations hydriques.

2. Effets des perturbations hydriques sur les cellules : déshydratation et réhydratation

2.1. Effets de la déshydratation sur les cellules

L'environnement naturel ou industriel à l'origine du séchage induit des perturbations hydriques et oxydatives causées par le retrait de l'eau. Certains procédés engendrent également des perturbations thermiques. Toutes ces perturbations sont à l'origine de modifications physiologiques structurelles et fonctionnelles (figure 5) (Dupont et al. 2014; Rapoport et al. 2019) pouvant conduire à la mort cellulaire. La déshydratation entraîne également la solidification des cellules (figure 5). Bien qu'une déshydratation osmotique ainsi qu'une dessiccation diffèrent d'un point de vue mécanistique, les effets des perturbations hydriques causées par les procédés de séchage peuvent être comparés à ceux générés par la déshydratation osmotique décrite dans la littérature (Bosch et al. 2021).

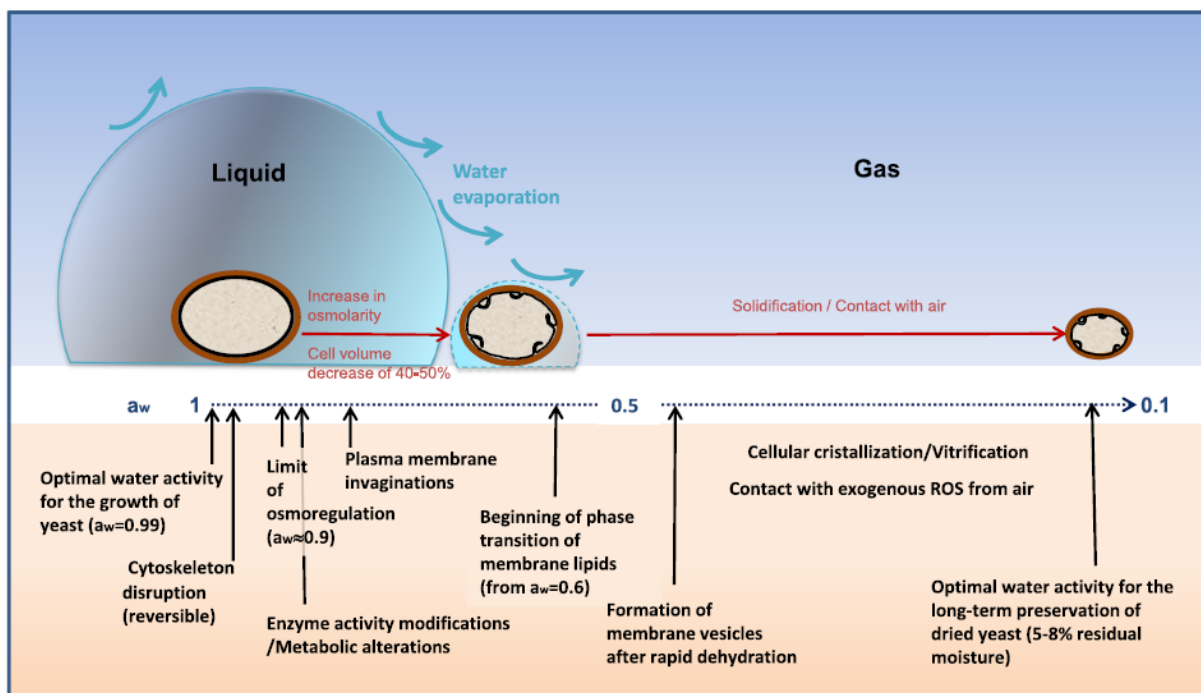


Figure 5. Conséquences de la déshydratation par évaporation sur la physiologie cellulaire (Dupont et al. 2014)

Certains organismes ont la capacité de survivre à ces déshydratations extrêmes en suspendant temporairement et de façon réversible leur métabolisme (Crowe et al. 1992; Rapoport et al. 2019; Bosch et al. 2021). Un arsenal de défenses est alors mis en place afin de permettre la résistance de ces organismes anhydrobiotes à cet environnement extrême (Dupont et al. 2014;

Rapoport et al. 2019). Les conséquences des perturbations hydriques, oxydatives et thermiques associées aux procédés de séchage sur la viabilité des cellules et les systèmes de protection des cellules seront décrites dans cette partie.

2.1.1. Effets mécaniques engendrés par la déshydratation

- *Diminution du volume cellulaire*

L'augmentation de la pression osmotique dans le milieu extracellulaire est à l'origine du transfert de masse, c'est-à-dire d'une sortie massive de l'eau de l'intérieur de la cellule vers le milieu extérieur (Beney and Gervais 2001). La première conséquence du transfert de masse est l'augmentation de la concentration en solutés présents dans le cytoplasme. L'élimination de l'eau permet également la solidification de la matrice. L'équilibre entre le potentiel hydrique de la cellule et celui de l'environnement s'établit très rapidement (Beney and Gervais 2001). Le retrait de l'eau intracellulaire génère une contrainte mécanique forte induisant une réduction du volume cellulaire (figure 6).

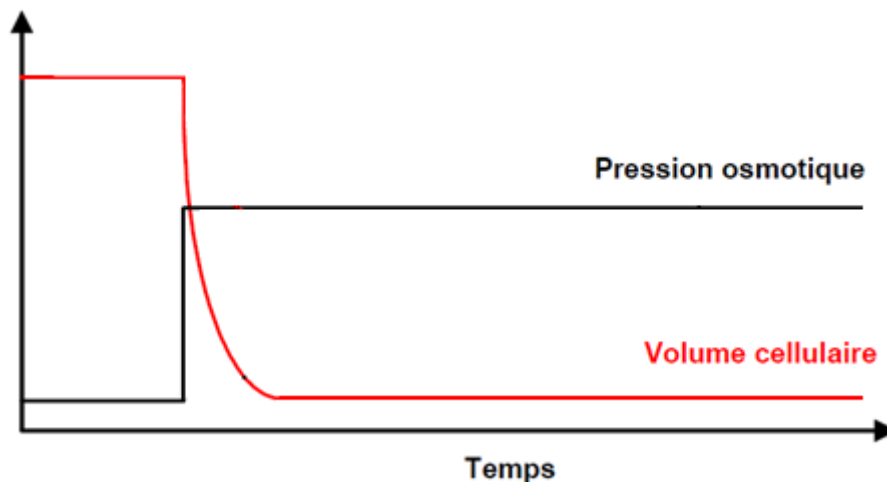


Figure 6. Variation de la pression osmotique (courbe noire) et du volume cellulaire (courbe rouge) dans les cas d'un choc hyperosmotique en fonction du temps d'après (Beney 2010).

Cette diminution peut atteindre 60% du volume initial chez *Saccharomyces cerevisiae* (Martinez de Maranon et al. 1996) et peut aller jusqu'à 85% chez *Escherichia coli* (Poirier et al. 1999). Elle entraîne la perte de la pression de turgescence et donc l'arrêt de la division cellulaire. La diminution du volume cellulaire a été corrélée à l'augmentation de la mortalité (Martinez de Maranon et al. 1996; Vindeløv and Arneborg 2002; Adya et al. 2006). De plus, la réduction volumique et la faible compressibilité latérale de la membrane plasmique a pour

conséquence l'augmentation du ratio surface/ volume pouvant entrainer la plasmolyse dans le cas des cellules végétales (Ferrando and Spiess 2001; Munns 2002; Assani et al. 2009) ou des bactéries gram négatives (Mille et al. 2002). La membrane plasmique se sépare alors de la paroi. Contrairement aux cellules végétales et aux bactéries gram négatives, les levures ont la particularité de présenter de nombreux points d'ancrage entre leur paroi et leur membrane. L'augmentation du ratio surface/ volume en lien direct avec le transfert de masse provoque des changements morphologiques de la membrane (Beney et al 1998). En effet, lors d'un choc hyperosmotique (déshydratation brutale), la diminution du volume cellulaire est de 60% (Beney and Gervais 2001). Sous l'impulsion de l'augmentation surface/volume, la contraction de la membrane ainsi que la formation de plis apparaissent (figure 7).

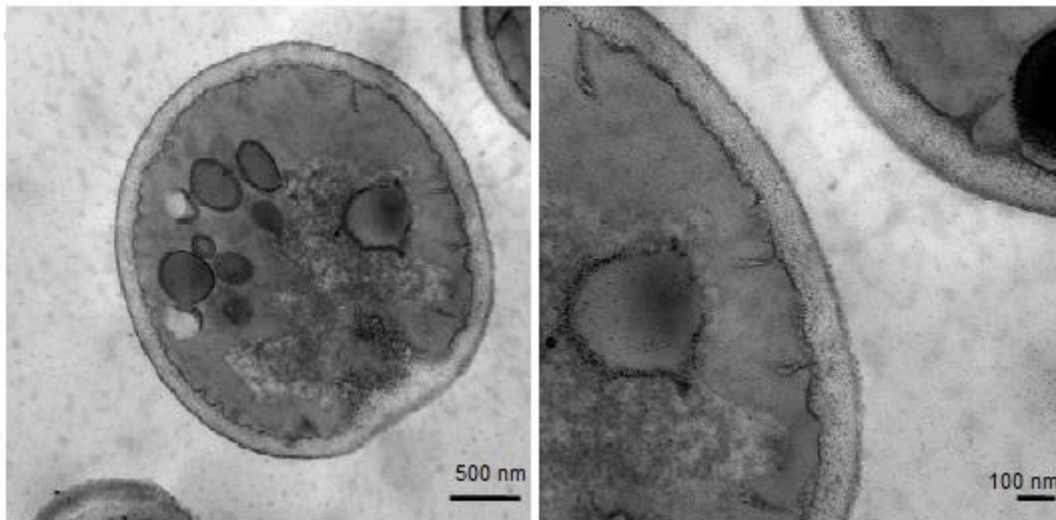


Figure 7. Observation de levure *S. cerevisiae* en MET après un choc hyperosmotique (110 MPa). Des plis à la surface de la membrane plasmiques sont visibles (Dupont et al. 2010).

Les contraintes générées conduisent à la formation de vésicules membranaires, provoquant la diminution de la surface membranaire. En effet, des vésicules provenant de la membrane plasmique d'*E. coli* ont été observées dans le cytoplasme de la bactérie après des chocs hyperosmotiques (Mille et al. 2002). Une étude réalisée chez *S. cerevisiae* a mis en évidence de nombreuses invaginations de la membrane plasmique lors d'un choc hyperosmotique à 110 MPa (Dupont et al. 2010). A terme, ces invaginations s'internalisent puis forment des vésicules. La paroi, étant élastique, reste solidaire de la membrane lors de la contraction et des plissements membranaires. Slaninova et collaborateurs (Slaninová et al. 2000) ont émis l'hypothèse que du matériel pariétal est retrouvé dans les plis de la membrane. Lors de la réhydratation et donc de

la ré-augmentation du volume cellulaire, la diminution de la surface membranaire conduit à la perméabilisation de la membrane (Simonin et al. 2007a; Dupont et al. 2010).

Le transfert de masse combiné à la réduction du volume cellulaire conduit à la concentration du milieu cellulaire, des organites et des macrostructures (Dupont et al. 2014). Par conséquent, le confinement moléculaire ainsi que l'encombrement moléculaire augmentent, impactant la mobilité moléculaire et la conformation des macrostructures comme les protéines (Garner and Burg 1994; Nawrocki et al. 2017; Van Den Berg et al. 2017).

- *Systèmes de protection : adaptation de la paroi, de la membrane plasmique et accumulation de solutés*

La paroi agit comme une barrière de protection face aux effets de la plasmolyse induits par la déshydratation. Contrairement aux parois végétales, les parois des levures ont la particularité de présenter une importante élasticité du fait de leur composition et de leur structure. Les mannoprotéines sont également fortement impliquées dans la résistance à la déshydratation. En effet, Borovikova et ses collaborateurs (2016) ont étudié la résistance à la déshydratation de levures délétées en gènes codant des protéines liées de manière non covalente à la paroi et des protéines PIR (Proteins with Internal Repeats, protéines de la paroi). Ils ont notamment montré que la résistance à la déshydratation était significativement impactée en l'absence de ces protéines (Borovikova 2016). De plus, l'étude des mutants MEY12A et MEY5, codant des ancras glycosylphosphatidylinositols (GPI anchored), nommées Ccw12 (partie particulière de la mannoprotéine), a montré l'augmentation de la résistance à la déshydratation, due à l'activation d'autres voies métaboliques, notamment celle de la chitine (Borovikova 2016).

La membrane est décrite comme une cible des perturbations hydriques et thermiques. Néanmoins, une déshydratation progressive permet à la membrane de se réorganiser afin de former des plis membranaires moins nombreux et plus profonds (figure 8) que ceux observés dans le cas d'une déshydratation brutale (Dupont et al. 2010). Cette réorganisation ne conduit pas à la formation de vésicules et permet à la surface membranaire d'être maintenue. Lors de la réhydratation, la surface membranaire est suffisante pour que la membrane reprenne sa configuration initiale sans phénomène de perméabilisation. La protéine Sur7 est décrite pour être exclusivement présente dans les microdomaines riches en ergostérol (Grossmann et al. 2007). L'observation de cette protéine taguée par une protéine fluorescente verte (GFP) a révélé

sa distribution en « patches » après un choc hyperosmotique alors que dans le cas d'une rampe hyperosmotique, la protéine Sur7 est répartie dans des domaines membranaires plus grands et moins nombreux (Dupont et al. 2011). Les auteurs ont donc émis l'hypothèse d'une réorganisation latérale de composés membranaires lors d'une rampe hyperosmotique.

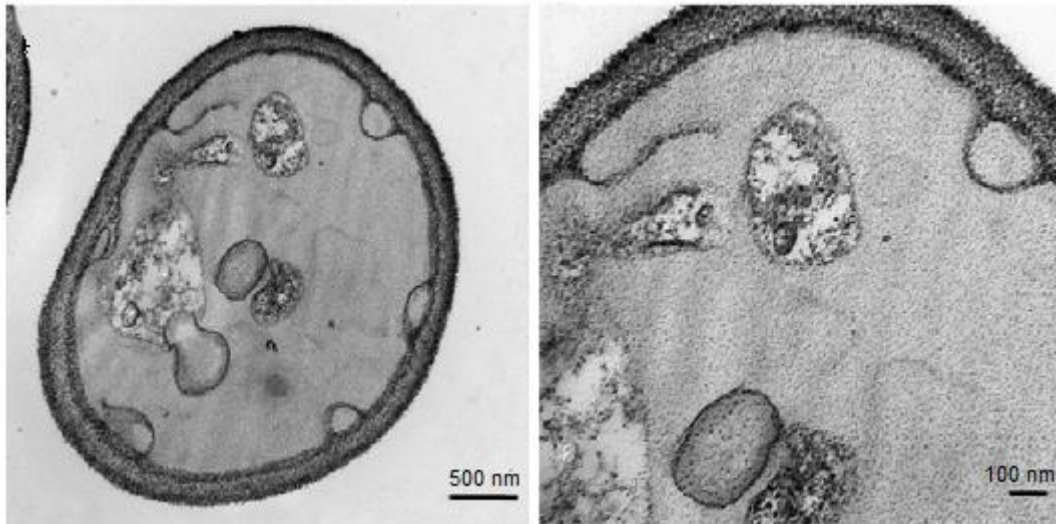


Figure 8. Observation de levure *S. cerevisiae* en MET après une rampe osmotique (110 MPa). Des plis à la surface de la membrane plasmiques sont visibles (Dupont et al. 2010).

Cette réorganisation conduit à une déformation optimale de la membrane permettant la préservation de son intégrité lors des phases de déshydratation et de réhydratation. Une étude a analysé la relation entre la nature des stérols de la membrane plasmique et la résistance à la déshydratation de *Saccharomyces cerevisiae* (Dupont et al. 2011). Pour cela, le mutant $\Delta erg6$, accumulant principalement du zymostérol et du cholesta-5,7,24-trienol a été utilisé. Ce mutant montre une sensibilité au choc hyperosmotique beaucoup plus importante que la souche sauvage (accumulant principalement de l'ergostérol). De plus, sa membrane plasmique présente une forte perméabilisation en comparaison avec la souche sauvage. L'ergostérol joue donc un rôle majeur dans la résistance des levures à la déshydratation.

L'élimination de l'eau conduit à la diminution du volume cellulaire et à l'annulation de la pression de turgescence pour de nombreux micro-organismes. Ces effets sont minimisés par l'activation de gènes permettant la synthèse et l'accumulation de solutés compatibles au sein de la cellule, comme des polyols (glycérol (Hohmann 2002)), des acides aminés (proline, sérine) ou encore des méthylamines. Il permet d'augmenter la pression osmotique à l'intérieur du cytosol et diminuer la contraction volumique. Dans le cas de perturbations hydriques modérées ($a_w > 0,9$), la pression de turgescence se manifeste à nouveau grâce à cette accumulation de solutés permettant la reprise de la croissance des levures.

2.1.2. Effets structuraux engendrés par la déshydratation

- *Conséquences : dénaturation des protéines et transition structurale membranaire*

La structure native des protéines est la forme thermodynamiquement la plus stable. Elle résulte d'un équilibre entre l'entropie conformationnelle et les différentes interactions non covalentes qui permettent de la stabiliser. Ces interactions correspondent aux interactions hydrophobes, aux liaisons hydrogènes ou encore aux forces de Van der Waal's (Privalov and Gill 1988). L'élimination des molécules d'eau au sein des protéines provoque la déstructuration et la dénaturation des structures secondaires, tertiaires et quaternaires entraînant la perte de leurs fonctionnalités (figure 9). Des études *in vitro* ont montré que les modifications structurales engendrées par la déshydratation sont le plus souvent réversibles (Carpenter et al. 1990; Wolkers et al. 1998). Néanmoins, elles peuvent également être irréversibles en fonction des conditions de déshydratation appliquées (Prestreliki et al. 1993)

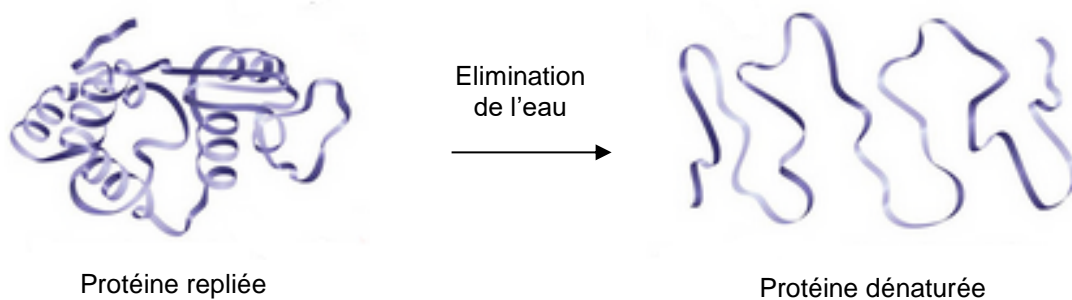


Figure 9. Explication schématique de l'élimination de l'eau d'une protéine repliée entraînant sa dénaturation

De plus, la disparition de la couche d'hydratation des protéines associée à l'augmentation de la concentration cytosolique et au rapprochement des macrostructures favorise l'agrégation protéique (Carpenter and Crowe 1989). En effet, la dénaturation des protéines et la modification du pH, introduit par l'augmentation du confinement du cytoplasme, va induire des interactions protéines/ protéines, renforçant le phénomène d'agrégation (Vindeløv and Arneborg 2002).

Les membranes biologiques sont organisées en bicouches de phospholipides dans lesquelles sont enchâssées des protéines. Les molécules d'eau, présentes des deux côtés de la membrane, structurent la configuration de cette dernière. La grande diversité des phospholipides (fonction de têtes polaires, longueurs et degrés de saturation des chaînes acylées) rend les propriétés de la membrane hétérogènes. A l'état hydraté et au-dessus de la

température de fusion, le cœur hydrophobe, constitué par les queues des phospholipides, présente une faible viscosité. La membrane est organisée en phase liquide désordonnée (L_α) (figure 10). La fluidité membranaire permet les mouvements et les échanges avec le milieu extérieur. Elle est essentielle pour la survie de la cellule. Lorsque la membrane est exposée à une température inférieure à sa température de fusion ou à un changement d'hydratation provoquant la diminution de la température de fusion, la membrane va adopter une conformation plus ordonnée, appelée phase gel (L_β) (figure 10) (Beney and Gervais 2001). Le passage à l'état gel est induit par l'augmentation des interactions de Van der Waals entre les phospholipides engendrés par la déshydratation du système. Dans cet état, la fluidité membranaire est fortement réduite.

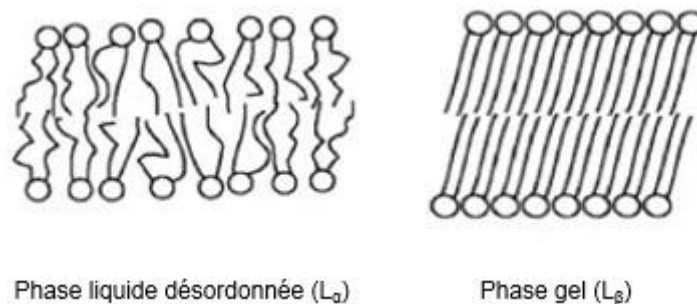


Figure 10. Organisation des membranes biologiques en condition hydratée (phase liquide désordonnée), en condition déshydratée (phase gel) (Munro 2003).

L'étude de Laroche et ses collaborateurs (2001) réalisée chez *S. cerevisiae* a montré que la transition membranaire se produit entre 60 MPa (0,6 a_w) et 130 MPa (0,4 a_w) à une température de 22 °C (Laroche et al. 2001). La transition membranaire peut conduire à la perméabilisation de la membrane dans le cas d'une forte déshydratation (Hays et al. 2001) et à la fuite de composés (Rapoport et al. 1982; Rapoport et al. 1995).

- *Système de protection : synthèse de molécules*

Nous avons vu précédemment que la contrainte structurale majoritaire était la déstructuration des macromolécules et de la membrane plasmique. Lors de la déshydratation, la cellule peut surexprimer des protéines de stress et plus particulièrement des hydrophylines (Singh et al. 2005), également appelées protéines LEA (late embryogenesis abundant) chez les plantes. Les hydrophylines sont caractérisées par un taux en glycine supérieur à 6% ainsi qu'un caractère hautement hydrophile. Les plus étudiées chez *S. cerevisiae* sont HSP12 (Sales et al.

2000) et GRE1 (Garay-Arroyo et al. 2000). Elles participent au maintien de la conformation des macromolécules ou encore prévenir l'agrégation protéique (Goyal et al. 2005). HSP12 intervient également dans la stabilisation des deux côtés de la membrane plasmique (Sales et al. 2000). Les organismes anhydrobiotes accumulent également des polyols et disaccharides comme le tréhalose chez la levure ou le saccharose chez la plante. Tout comme les hydrophylines, ils participent à la stabilisation des macromolécules et des membranes en remplaçant les molécules d'eau au sein des structures. Le rôle protecteur des disaccharides sera décrit dans le chapitre suivant.

2.1.3. Solidification de la matrice engendrée par la déshydratation

L'élimination de l'eau extra et intra-cellulaire induite par le séchage du système conduit à l'augmentation de la viscosité de la matrice. En fonction de la cinétique de séchage, le passage d'un état liquide à un état solide cristallin ou amorphe vitreux est induit. Il est principalement dû aux sucres et protéines présents dans la matrice à sécher. Dans le cas d'une lyophilisation, les micro-organismes sont séchés dans une « matrice de protection », principalement composée de sucres. La vitrification observée est donc qualifiée d'extracellulaire (Cerrutti et al. 2000). Dans le cas des levures sèches actives, il y a une accumulation importante de tréhalose dans le cytoplasme conduisant à la formation d'un verre intracellulaire (Schebor et al. 1997). Dans le contexte de la solidification, la diffusion des solutés et la vitesse des réactions sont fortement ralenties, permettant la conservation des cellules dans le temps. La vitrification induite par la déshydratation permet également de stabiliser les macrostructures en les figeant dans la matrice.

2.1.4. Contraintes oxydatives engendrées par la déshydratation

- *Conséquence : de multiples sources d'oxydation*

La déshydratation induit la disparition de l'eau contenue dans le milieu extracellulaire : la cellule est donc au contact direct avec les molécules d'oxygène de l'air. La surface d'échange entre la cellule et le milieu gazeux est donc augmentée. Ce phénomène induit une première perturbation oxydative. Après diffusion au travers des parois et des membranes des levures, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme l'oxygène singulet peuvent alors oxyder les lipides membranaires.

En conditions hydratées, les cellules présentent des métabolismes de construction et de ménage ainsi qu'à une détoxification qui permet l'élimination des substances toxiques produites par les cellules. La déshydratation entraîne un déséquilibre de cette balance favorisant l'arrêt des réactions biochimiques et provoquant également l'accumulation de ROS (anions superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyde) au sein du cytoplasme qui induit des dommages cellulaires. En effet, l'altération des chaînes de transport des électrons, la dénaturation et l'agrégation protéique ainsi que la concentration du milieu cytosolique créent un excès de radicaux libres au sein de la cellule. Ces derniers ont pour cibles les protéines, l'ADN et également les lipides insaturés membranaires (França et al. 2007). Les ROS induisent notamment des réactions de decarbonylation des protéines, des réactions de peroxydation et des de-estérifications des lipides membranaires (Senaratna et al. 1987). Les lipides membranaires sont donc oxydés de part et d'autre de la membrane (De Jesus Pereira et al. 2003; França et al. 2007; Garre et al. 2010).

Les perturbations oxydatives peuvent également continuer lors des étapes de stockage des levures sèches. Bien que ces phénomènes soient faiblement présents durant l'étape de conservation des produits secs vitreux car les réactions sont fortement ralenties, l'augmentation de la carbonylation des protéines a été corrélée avec la diminution de la viabilité chez des cellules de *S. cerevisiae* déshydratées lors du stockage (França et al. 2005). A terme, l'oxydation lipidique conduit à une diminution de l'hydrophobicité et à une déstabilisation de la membrane plasmique (Santivarangkna et al. 2008).

- *2.1.4.2. Lutte contre les contraintes oxydatives*

La perturbation hydrique génère des contraintes oxydatives dues en partie à la présence d'oxygène dans le milieu extérieur et à l'accumulation de ROS dans le cytoplasme induite par la dénaturation et l'agrégation protéique (figure 11). Néanmoins, la levure est capable de s'adapter à ces contraintes. Des facteurs de transcription ainsi que les gènes impliqués dans la régulation de molécules antioxydantes (glutathion, catalase, superoxyde dismutase, thioredoxine, etc.) vont être activés (De Jesus Pereira et al. 2003; França et al. 2005).

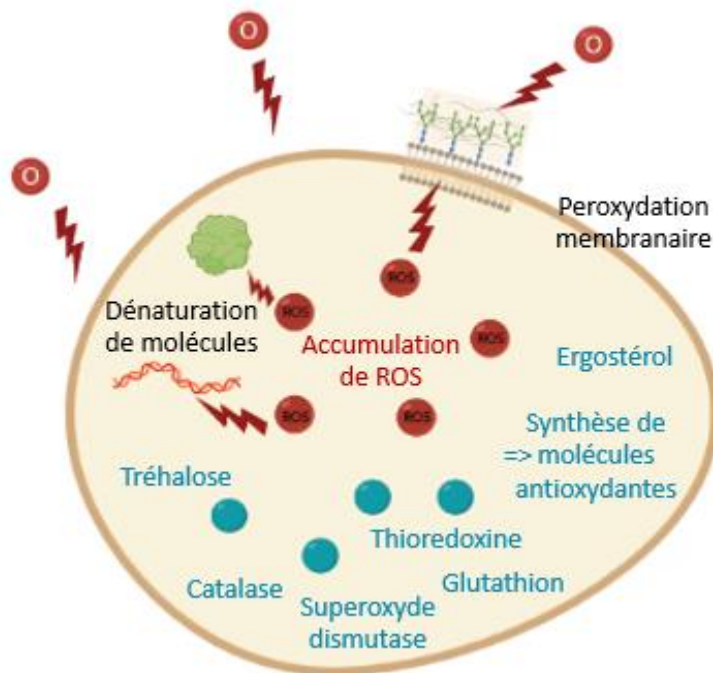


Figure 11. Schéma explicatif des contraintes oxydatives et des molécules de défenses impliquées

Les gènes *TRX2* ou *GRX5*, permettant respectivement la synthèse de la thiorédoxine et du glutathion, sont surexprimés (Fernandes et al. 2007; Garre et al. 2010). Le glutathion joue un rôle très important dans la résistance à l'oxydation et donc à la déshydratation (Espindola et al. 2003). Il permet la neutralisation des radicaux libres grâce à ses nombreux réducteurs. Le glutathion permet également de rééquilibrer la balance des réactions d'oxydation et de réduction. Des études récentes, ont montré que des levures de type *Saccharomyces* ou *non Saccharomyces* cultivées en milieu riche en extraits de levures et cystéine accumulent une quantité importante de glutathion. Ces levures résistent mieux au procédé de séchage. L'adaptation des micro-organismes en amont du procédé de séchage a donc un impact important sur la survie des populations au séchage (Camara Junior et al. 2018; Câmara et al. 2019). Une étude récente portant sur la résistance d'une souche recombinante *Ogataea polymorpha* peu résistante à la déshydratation et ayant la particularité de surproduire du glutathion, a montré que le niveau de résistance de cette souche recombinante est équivalent à celui de la souche sauvage. Cette caractéristique est associée à la forte production de glutathion et à son rôle protecteur contre l'oxydation (Kulikova-Borovikova et al. 2018). Le tréhalose intervient également dans la protection des cellules face aux perturbations oxydatives, en réduisant la carbonylation des protéines et en diminuant la peroxydation des lipides (Benaroudj et al. 2001). Des études récentes ont montré l'implication d'un stérol, nommé l'ergostérol, dans

la résistance des levures et des champignons aux perturbations oxydatives (Dupont et al. 2012; Dupont et al. 2021). La cellule met également en place des systèmes de dégradation de structures ou de molécules oxydées comme l'ubiquitine-protéasome ou l'autophagie.

La vitrification du cytoplasme ne permet pas de diminuer les vitesses des réactions d'oxydation. En revanche, elle permet la diminution de la vitesse de diffusion de l'oxygène au sein du cytoplasme et donc la diminution de la vitesse de production de radicaux libres (Lievens and van't Riet 1994).

2.2. Effets de la réhydratation sur les cellules

Les produits secs nécessitent souvent une étape de réhydratation totale ou partielle avant utilisation. Elle permet la restauration du métabolisme en quelques secondes. La réintroduction de l'eau est une étape critique pour les micro-organismes séchés actifs pouvant induire une mortalité importante. L'importance de l'étape de réhydratation (revivification des cellules) est souvent négligée, néanmoins elle est aussi importante que l'étape de déshydratation. Différents paramètres comme la température, la nature de la solution de réhydratation ou encore la cinétique de réhydratation apparaissent dans la bibliographie comme des paramètres clés (Mille et al. 2004). La diminution de la viabilité est corrélée à celle de la température de réhydratation. En effet, une réhydratation à basse température induit une fuite des ions potassium (Van Steveninck and Ledebor 1974) et de composés cytoplasmiques (Pena et al. 1992), générant une diminution de la viabilité importante (Leach and Scott 1959). Lors de la réhydratation les cellules et plus précisément les membranes subissent une transition de phase. Afin de minimiser les effets létaux de la réhydratation, cette dernière doit être réalisée au-dessus de la température de fusion des membranes, c'est-à-dire 40 °C pour les cellules en phase exponentielle et 30 °C pour des levures ayant été séchées en phase stationnaire et en présence de tréhalose (Leslie et al. 1994). La température de réhydratation de levures sèches de type ADY préconisée se situe donc entre 35 et 42 °C. L'augmentation de la température de réhydratation induit l'augmentation de la fluidité membranaire permettant son retour à l'état hydraté (Poirier et al. 1999). Dans ces conditions, le phénomène de fuite des solutés est minimisé. En outre, une température supérieure à la température de transition de phase des membranes conduit à une meilleure viabilité lors de la réhydratation (Beker and Rapoport 1987). La composition de la solution de réhydratation est également importante. En effet, la réhydratation dans un milieu de faible pression osmotique peut entraîner une augmentation importante et rapide du volume cellulaire et donc une lyse des cellules (Simonin et al. 2007b). Une réhydratation avec une

solution contenant des nutriments essentiels est préférable à une réhydratation avec de l'eau (Morgan et al. 2006). L'étude de Zhao et Zhang (2005) a confirmé l'influence importante de la composition de la solution de réhydratation sur la survie de bactéries. En revanche, les auteurs ont souligné le fait que cet effet est espèce dépendante (Zhao and Zhang 2005). Une réhydratation rapide entraîne l'entrée d'un flux osmotique important, pouvant provoquer la dégradation des membranes (modification, perméabilisation), ainsi qu'une perte de constituants cellulaires (Lemetais et al. 2012). Dupont et al., (2010) montrent l'impact des cinétiques de réhydratation, en étudiant le cas d'une levure déshydratée par déshydratation osmotique (à 166 MPa, a_w 0,3). Cette levure subit ensuite une réhydratation « choc » (moins d'une seconde), conduisant à une perte de viabilité de 57 % au sein de la population contre 21% avec une réhydratation plus lente (environ 30 minutes). De plus, d'autres travaux montrent qu'une réhydratation en phase vapeur à une température suffisamment élevée pourrait améliorer la résistance à la réhydratation. En effet, Hoekstra et ses collaborateurs ont montré qu'une pré-humidification suivie d'une réhydratation à une température supérieure à celle de la transition de phase prévient le phénomène de fuite (leakage) (Hoekstra et al. 1999). De plus, une réhydratation lente et progressive jusqu'à une a_w de 0,45 permet l'amélioration de la viabilité de *S. cerevisiae* après réhydratation (Poirier et al. 1999).

La déshydratation des micro-organismes est essentielle pour leur conservation sur de longues périodes. Néanmoins, la préservation des cellules au cours et après leur déshydratation est un challenge pour les industriels.

Les échanges hydriques, nécessaires au rétablissement de l'équilibre dans le cas d'une déshydratation, engendrent l'élimination de l'eau extra et intra-cellulaire ce qui provoque une contrainte mécanique ayant pour principales conséquences :

- L'augmentation du rapport surface/ volume et la réduction du volume cellulaire*
- La dénaturation et l'agrégation protéique*
- La déformation et la transition de phase des membranes.*

La déshydratation induit également une contrainte oxydative forte. Les perturbations et contraintes rencontrées ont pour conséquences de modifier la structure et le métabolisme des cellules faisant diminuer la viabilité de la population.

Les conditions de réhydratation, en phase liquide, bien qu'aujourd'hui mieux maîtrisées, restent également une cause de mortalité importante.

Les organismes anhydrobiotes sont capables de survivre à des perturbations hydriques intenses, en suspendant de manière temporaire et réversible leur métabolisme. Pour cela, ils développent des adaptations métaboliques leur permettant de préserver la structure des différents éléments cellulaires. Nous verrons dans le chapitre suivant que le tréhalose se révèle comme un disaccharide essentiel dans la protection des levures et d'autres micro-organismes face aux perturbations hydriques et leur conservation sur de longues périodes.

3. Conservation des levures sèches actives : le tréhalose une molécule incontournable

3.1. Le tréhalose : une molécule clé dans la résistance à la déshydratation et la conservation dans le temps

Le tréhalose est une molécule essentielle, synthétisée et accumulée par les organismes anhydrobiotes lors de différentes perturbations. Il a été isolé pour la première fois chez le champignon parasite des graminées, *Claviceps* spp, en 1832. Sa présence est considérée comme une réponse universelle aux stress (Crowe et al. 2001; Iordachescu and Imai 2012). C'est également un sucre de réserve.

3.1.1. Le tréhalose : généralités

Le tréhalose, également nommé α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside, est un disaccharide composé de deux molécules de glucose liées par une liaison 1.1- α -glycosidique (figure 12).

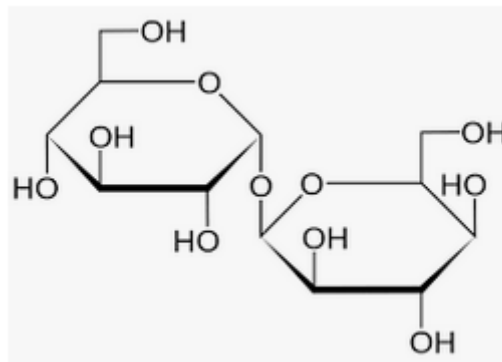


Figure 12. Structure moléculaire du tréhalose

Le tréhalose est synthétisé chez la levure à hauteur de 4 à 5 % (w/w). Lors d'une perturbation environnementale, les gènes permettant la production du tréhalose sont surexprimés et ceux exprimant des tréhalases réprimés. En industrie, les conditions de production de la biomasse permettent une accumulation de tréhalose de 20 à 25% (w/w) (Aguilera and Karel 1997). Le tréhalose est synthétisé lors de la phase stationnaire de croissance (Gadd et al. 1987). Le glucose présent dans le milieu extérieur est transporté à l'intérieur du cytoplasme par des hexoperméases. Il est ensuite phosphorylé par une hexokinase pour donner le glucose-6-phosphate. Ce dernier est converti en glucose-1-phosphate par la phosphoglucomutase. Le

glucose-1-phosphate est associé à de l'uridine triphosphate par l'UDP-glucose phosphorylase, de l'uridine diphosphate glucose est alors formé. La tréhalose-6-phosphate synthase lie le glucose-6-phosphate avec l'UDP-glucose afin de former le tréhalose-6-phosphate, qui après hydrolyse du groupement phosphate par la tréhalose-6-phosphatase donne la molécule de tréhalose (figure 13). L'absence de glucose et la présence de tréhalose dans le milieu extérieur induisent la mise en place d'une voie de transport du tréhalose via le transporteur Agt1p (alpha glucoside transport) (Plourde-Owobi et al. 1999; Plourde-Owobi et al. 2000; Jules et al. 2004).

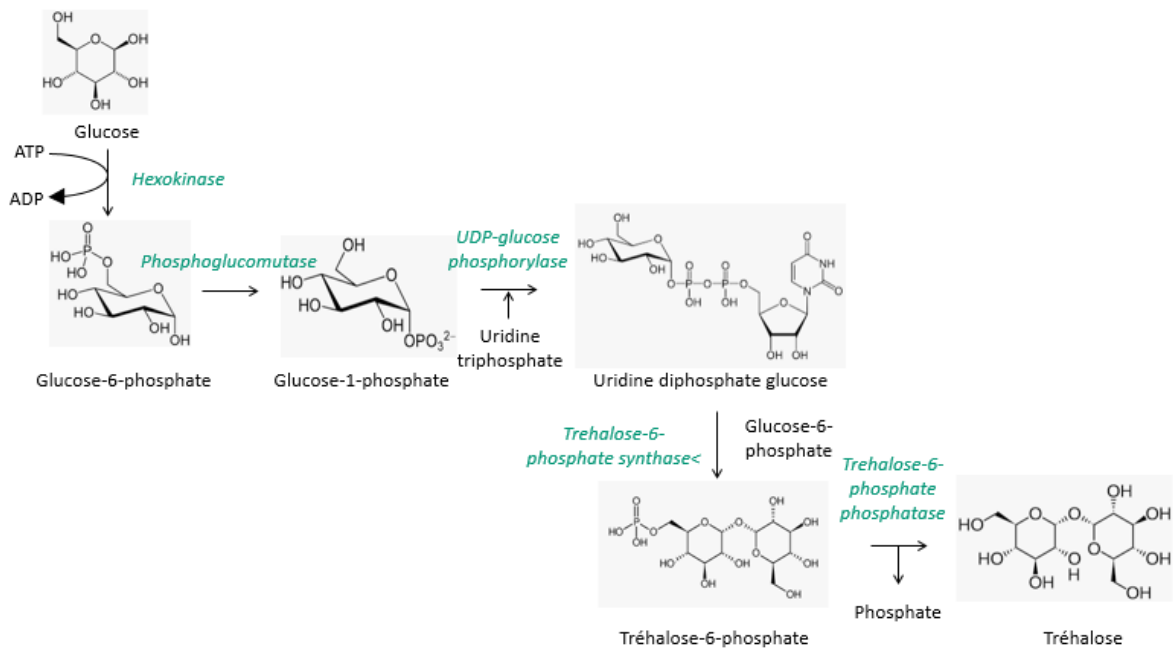


Figure 13. Voie de biosynthèse du tréhalose (les enzymes sont notées en vert)

3.1.2. Le tréhalose : un disaccharide aux propriétés particulières

- *Les théories associées aux rôles protecteurs du tréhalose*

L'efficacité des différents disaccharides à stabiliser les macromolécules et les membranes lors de déshydratation est liée à l'effet de déstructuration du réseau tétraédrique de l'eau ainsi qu'à la réduction de la quantité d'eau pouvant cristalliser (Patist and Zoerb 2005). Le rôle protecteur du tréhalose est associée à deux grandes théories, décrites ci-dessous (Burek et al. 2015).

La théorie du remplacement de l'eau (Water Replacement Hypothesis) par un solvant compatible a été proposée pour la première fois par Webb en 1965 (Webb 1965), s'appuyant sur les travaux de Warner publiés en 1962 (Warner 1962). Au milieu des années 70, la communauté scientifique met en évidence le lien entre l'accumulation de sucres et la résistance d'organismes à la déshydratation. En 1973, Crowe et Clegg proposent pour la première fois le modèle du remplacement des molécules d'eau par celles de tréhalose autour de résidus polaires dans des macromolécules. Par la suite, l'hypothèse a été testée *in vivo* sur *Artemia* (Clegg et al. 1982), puis chez la levure (Leslie et al. 1994). L'étude au niveau atomique d'une bicouche de POPC (2-oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocoline) à bas niveau d'hydratation par simulation de dynamique moléculaire a permis de révéler une augmentation concentration-dépendante de la surface par lipide, ainsi qu'une fluidification du noyau de la bicouche, due à la présence de tréhalose (Golovina et al. 2010). Ces résultats sont en adéquation avec les mécanismes décrits dans l'hypothèse du remplacement de l'eau. Lors de l'élimination des molécules d'eau, des liaisons hydrogène sont établies entre les groupements -OH des molécules de tréhalose et les groupements phosphate des têtes polaires des phospholipides ou les groupes polaires des acides aminés (Crowe et al. 1984a), permettant de stabiliser les structures (figure 14).

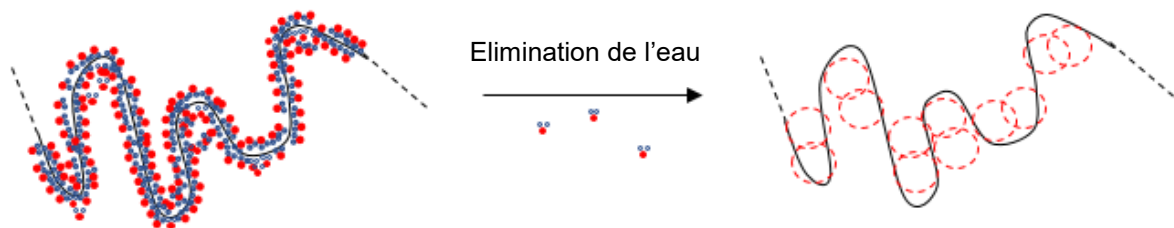


Figure 14. Hypothèse du remplacement de l'eau. (○) molécule de tréhalose (●) molécule d'eau

De plus, ces interactions permettent de maintenir l'espace membranaire et l'écartement entre les groupements polaires de phospholipides intacts, évitant l'augmentation de la température de fusion et donc la transition de la membrane de l'état fluide à l'état gel (Crowe et al. 1984b; Crowe et al. 1992).

Les sucres ont la particularité de pouvoir former des verres à bas niveau d'hydratation. Le mécanisme de stabilisation des macromolécules par formation de verre est décrit par Levine et Slade en 1992 (Levine and Slade 1992). L'accumulation d'une quantité importante de disaccharides associée à la déshydratation et à la concentration du milieu conduit à l'augmentation de la viscosité (supérieure à 10^{12} Pa.s) et par conséquent à la formation d'un verre. Les macromolécules sont alors incluses dans le verre (figure 15).

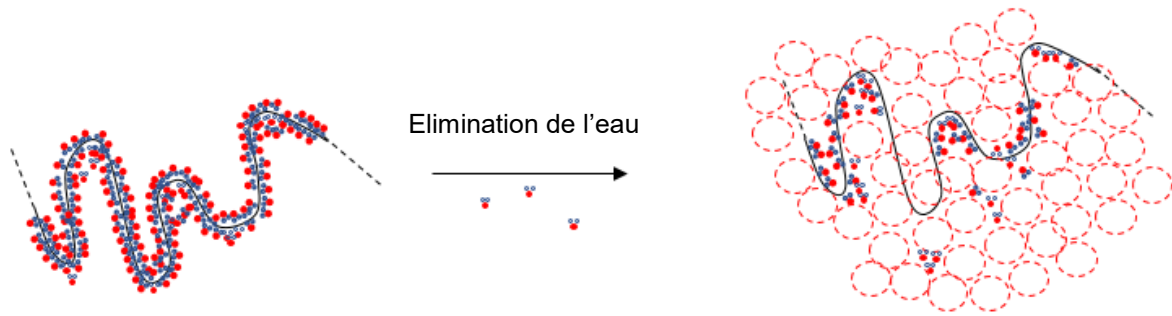


Figure 15. Théorie de la vitrification. (○) molécule de tréhalose (●) molécule d'eau

Dans les années 80, Timasheff propose la théorie de l'exclusion préférentielle, valable pour des solutions hydratées (Arakawa and Timasheff 1982). Les sucres sont ici exclus du voisinage des protéines en solution afin de préserver leur couche d'hydratation et donc de maintenir leur conformation grâce à leur niveau d'hydratation.

Ces théories sont reprises et complétées par Belton and Gil en 1994 dans « l'hypothèse de l'emprisonnement de l'eau » (Belton and Gil 1994). Lors d'une déshydratation, les molécules présentes concentrent les molécules d'eau à l'interface entre les molécules de sucre et la protéine. La déshydratation entraînant la vitrification des molécules de sucre, l'eau résiduelle est alors confinée à l'interface sucre/protéine, permettant ainsi la stabilisation de la structure de la protéine.

- *Efficacité protectrice du tréhalose*

Des études comparatives entre le tréhalose et son isomère le maltose, mais également avec le saccharose ont été réalisées afin d'expliquer l'efficacité protectrice plus importante du tréhalose. Contrairement au maltose, le tréhalose et le saccharose sont des sucres non réducteurs. Par conséquent, ils ne réagissent pas avec les résidus lysine et arginine et donc ils

ne favorisent pas de réaction de Maillard. Le maltose, le saccharose et le tréhalose n'ont pas la même capacité à former des liaisons hydrogènes intramoléculaires dans leur phase cristalline. En effet, le saccharose forme deux liaisons hydrogènes intramoléculaires dans sa phase anhydre, le maltose forme une liaison dans sa phase monohydrate, alors que le tréhalose n'en forme pas dans sa phase dihydrate. La flexibilité des cycles de tréhalose est également supérieure à celle du saccharose et du maltose, ce qui permet au tréhalose d'interagir d'avantage avec les têtes polaires des phospholipides (Crowe et al. 1983). Sa liaison 1.1- α -glycosidique le rend également résistant à l'hydrolyse acide. L'étude par dynamique moléculaire d'une solution de sucre, à une concentration donnée, a révélé que le coefficient de diffusion de l'eau est plus bas en présence de tréhalose que de saccharose (Ekdawi-Sever et al. 2003). Les propriétés exceptionnelles du tréhalose lui confèrent une efficacité de protection importante vis-à-vis de la dessiccation expliquant son intérêt.

3.1.3. Résistance et tréhalose

Le rôle protecteur du tréhalose lors d'une déshydratation sévère a été montré au travers de l'hypothèse du remplacement de l'eau et de la vitrification. Ces deux mécanismes ne sont pas incompatibles et peuvent avoir lieu simultanément (Crowe et al. 1998a). Néanmoins, Crowe et ses collaborateurs suggèrent le fait que la vitrification seule n'est pas suffisante pour garantir la protection des membranes (Crowe et al. 1998a). L'accumulation d'une quantité importante de tréhalose a été corrélée à la résistance des anhydrobiotes aux cycles de déshydratation et de réhydratation. En effet, l'accumulation intracellulaire de disaccharides par *Escherichia coli* a permis d'augmenter de 10 000 fois sa survie à différentes techniques de séchage en comparaison avec une souche sauvage (Billi et al., 2000). Eleutherio et ses collaborateurs (1992) ont montré la présence indispensable du tréhalose des deux côtés de la membrane plasmique afin de permettre sa stabilisation. L'ajout externe de 5% de tréhalose dans la matrice à déshydrater permet également d'augmenter la résistance des levures au séchage (Cerrutti et al. 2000). Le rôle du tréhalose dans la résistance aux procédés de séchage s'illustre également dans la protection des cellules face aux perturbations thermiques (Hottiger et al. 1989; Attfield et al. 1992; Van Dijck et al. 1995). En effet, la présence externe d'une matrice de tréhalose a permis d'améliorer la résistance de *S. cerevisiae* à un traitement thermique de 100 minutes à 70 °C, en comparaison à l'utilisation d'autres compositions de matrice extracellulaire (Lodato et al. 1999). L'activité fermentaire des levures sèches actives instantanées n'a diminué que de 0,8 % après un traitement thermique à 70 °C (Schebor et al. 2000). L'emploi de tréhalose dans les

matrices de séchage de la lactase et de l'invertase a également permis d'augmenter la résistance de ces enzymes aux traitements thermiques ainsi que leur stabilité sur des temps de conservation longs par rapport à l'emploi d'autres sucres comme stabilisants (Schebor et al. 1997).

3.2. Etat vitreux : un système de conservation optimal

3.2.1. Etat vitreux

Un amorphe vitreux est par définition un solide où le désordre structural domine. Il s'oppose donc à la structure d'un cristal, dans laquelle les molécules sont organisées. Le verre présente donc des propriétés rhéologiques similaires d'un solide. C'est un état métastable d'un point de vue thermodynamique où la viscosité est supérieure à 10^{12} Pa.s. Il est donc caractérisé par une mobilité moléculaire limitée avec une absence de mouvements coopératifs de grande amplitude. Dans un système binaire composé d'eau et de tréhalose, la formation d'un verre serait exceptionnelle car la forme thermodynamiquement stable (état cristallin) serait prédominante. La cristallisation totale du tréhalose dihydrate s'observe à partir de 43% HR à température ambiante (Cardona et al. 1997). Dans le contexte cellulaire, la vitrification engendrée par la déshydratation pourrait s'expliquer par l'encombrement moléculaire et structurel limitant le réarrangement moléculaire impliqué dans la cristallisation (Buitink and Leprince 2004). Cependant, au cours du temps et si les conditions le permettant, les molécules vont tendre à se réorganiser afin d'atteindre un état stable thermodynamiquement.

- *Température de transition vitreuse*

Les verres sont caractérisés principalement par leur température de transition vitreuse (nommée T_g). Elle correspond à la température pour laquelle il y a un changement de viscosité entraînant le passage de l'état de liquide sous-refroidi à l'état vitreux lors d'une déshydratation par exemple ou de l'état vitreux à non vitreux lors d'une réhydratation. La stabilité du verre de tréhalose est décrite comme élevée en raison de sa T_g plus haute que celle du saccharose ou du maltose (tableau 1) (Green and Angell 1989).

Tableau 1. Température de transition vitreuse des principaux sucres retrouvés chez les anhydrobiotes

| Composé | Saccharose | Maltose | Tréhalose |
|------------|------------|---------|-----------|
| T_g (°C) | 65 | 72,8 | 110 |

La valeur de T_g dépend du niveau d'hydratation de la matrice. L'eau ayant un effet plastifiant, l'augmentation de la teneur induit la diminution de la viscosité et donc celle de la valeur de T_g . La masse molaire des composés constituant la matrice va influencer la valeur de T_g . La présence de molécules de faible masse moléculaire aura un effet plastifiant alors que la présence de molécules de masse moléculaire supérieure augmentera la valeur de T_g . La réticulation des polymères favorisera également l'augmentation de la valeur de T_g . La présence de groupements latéraux sur les protéines augmentant le volume libre de la matrice aura pour conséquence de diminuer la T_g .

- *Vieillessement de la matrice et relaxation enthalpique*

En dessous de T_g , la mobilité moléculaire est réduite mais suffisante pour permettre l'évolution de la matrice. L'état amorphe vitreux est un état métastable, il évolue donc au cours du temps afin de se rapprocher de l'état thermodynamiquement stable, c'est-à-dire l'état cristallin. Par conséquent, un réarrangement structural et moléculaire se produit. Le phénomène de vieillissement du verre est réversible et peut s'éliminer par chauffage de la matrice au-dessus de T_g par exemple.

- *Effets de l'eau et de la température : passage à l'état caoutchoutique*

Le verre est sensible à l'humidité. Par conséquent, la T_g va diminuer avec l'augmentation de la teneur en eau, induisant le passage de l'état vitreux à l'état amorphe caoutchoutique. L'augmentation de la température engendre également le passage à l'état caoutchoutique. L'état caoutchoutique est également un état amorphe métastable. Il est défini comme la zone non cristalline et hautement visqueuse, qui se situe entre T_g et la température de fusion (Le Meste et al. 2002) (figure 16).

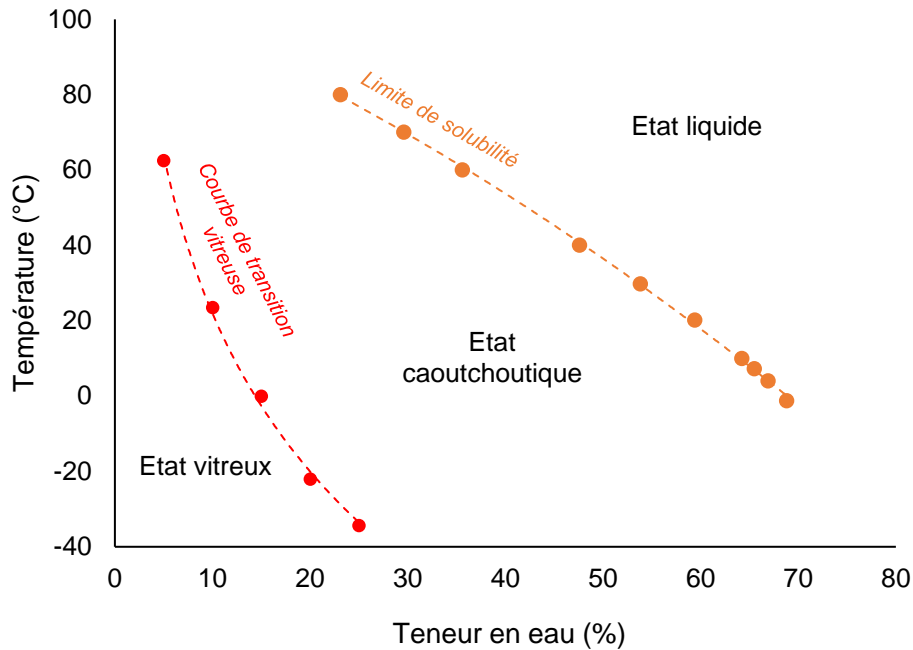


Figure 16. Diagramme de phase du tréhalose. Les courbes de transition vitreuse du tréhalose (en rouge) et de la limite de solubilité du tréhalose proviennent respectivement de (Chen et al. 2000) et de (Miller et al. 1997).

L'état caoutchoutique est caractérisé par une diminution de la viscosité conduisant à l'augmentation de la mobilité moléculaire et des vitesses de réactions. Les réactions se produisent à des vitesses plus élevées au sein de cet état. Il est considéré comme un état transitoire incontournable lors du passage de l'état liquide à vitreux et lors d'un chauffage d'une matrice vitreuse. Cet état, bien que peu étudié, n'est pas décrit comme propice à la préservation des cellules dans le temps. De plus, l'état caoutchoutique facilite la cristallisation de la matrice considérée.

3.2.2. Conservation des cellules sur de longues périodes

La formation de l'état vitreux, conférée au tréhalose dans les levures, peut être assimilée à un système de protection passif. En effet, à l'état vitreux la mobilité et la réactivité moléculaires sont fortement réduites. Par conséquent les réactions de dégradation sont ralenties (Buitink and Leprince 2004). L'état vitreux participe ainsi à la protection des lipides et des protéines contre l'oxydation (Crowe et al. 1998a; Schneiter et al. 1999). Dans cet état, la stabilisation des systèmes biologiques sur de longues périodes est possible (Sun et al. 1994; Crowe et al. 1998a). Au sein d'un système considéré et afin de respecter l'équilibre thermodynamique, l' a_w de la matrice considérée va s'équilibrer avec l'HR de l'air du système. Par conséquent, au cours de leur stockage, les micro-organismes secs conservés sous emballage

poreux peuvent subir des cycles de réhydratation/ déshydratation dépendants des conditions environnementales. Ces phénomènes de réhydratation sont peu pris en considération. Peu d'études ont porté sur la stabilité des micro-organismes à des HR intermédiaires. Néanmoins, un stockage au-dessus de la teneur en eau critique, c'est-à-dire la teneur en eau associée à T_g à l'ambiante, est considéré comme défavorable pour la survie (Roos 1995). Dans ces conditions d'humidité intermédiaire (de 30 à 70 %) et à température ambiante, l'état dominant est l'état amorphe caoutchoutique. En effet, l'étude de Kawai (2021) révèle la diminution de la viabilité de *S. cerevisiae* après 30 jours de stockage à des a_w supérieures à l' a_w critique (Kawai et al. 2021). Schebor et ses collaborateurs (2000) montrent également une diminution de la viabilité et de l'activité fermentaire après passage de T_g . En revanche, cette diminution n'est que de 0.8% à l'état caoutchoutique après un traitement thermique à 70 °C (Schebor et al. 2000). De plus, la présence d'une matrice extracellulaire de tréhalose à l'état vitreux ou caoutchoutique a permis l'augmentation de la résistance de *S. cerevisiae* lyophilisée à un traitement thermique de 100 minutes à 70 °C en comparaison à d'autres compositions de matrice extracellulaire (Lodato et al. 1999). La résistance thermique observée pourrait être expliquée par la présence de tréhalose. Néanmoins, ces études mettent en avant la diminution drastique du nombre de cellules revivifiables à l'état non vitreux.

Les organismes anhydrobiotes sont capables de survivre à des perturbations hydriques intenses, en suspendant de manière temporaire et réversible leur métabolisme. Pour cela, ils développent des adaptations métaboliques leur permettant de préserver la structure des différents éléments cellulaires. Le tréhalose est un disaccharide essentiel dans la protection des cellules face aux perturbations hydriques. L'étude bibliographique a révélé son implication dans la stabilisation des macromolécules et des membranes, cibles majeures des perturbations. Les mécanismes de protection par le tréhalose font l'objet de différentes théories. Une déshydratation élevée permet d'atteindre la vitrification du cytoplasme. L'état vitreux apparait comme un système de protection passif important pour la conservation des cellules sur de longues périodes.

4. Conclusion et présentation des axes de la thèse

La suspension prolongée et réversible des activités cellulaires par déshydratation est un objectif clé pour l'exploitation industrielle des micro-organismes d'intérêt comme *Saccharomyces cerevisiae*. La déshydratation provoque l'arrêt du métabolisme et la solidification de la matrice. La conservation dans le temps de micro-organismes viables est alors possible. La réhydratation permet la restauration des conditions favorables au fonctionnement métabolique. Les étapes de déshydratation et de réhydratation induisent de nombreux changements physiologiques et structuraux pouvant conduire à la mort cellulaire. Les micro-organismes anhydrobiotes, comme les levures, ont su s'adapter à ces perturbations hydriques intenses en synthétisant un arsenal de défense. Le tréhalose tient un rôle central dans la protection de la cellule, notamment au travers du remplacement des molécules d'eau au sein des biomolécules et macrostructures leur permettant de conserver leur structure et donc leur fonctionnalité au retour de l'eau. La littérature décrit également l'implication du tréhalose dans la matrice vitreuse, conduisant à une préservation des cellules sur de longues périodes. Néanmoins, son rôle est décrit seulement à des humidités relatives très basses. Son implication dans l'état amorphe caoutchoutique n'est que peu discuté dans la littérature. De plus, la majorité des études publiées ont été réalisées sur des levures haploïdes, déshydratées de façon osmotique. Ces levures n'accumulent pas de quantité de tréhalose importante.

Cette thèse, soutenue par Phileo, business unit dédiée à la nutrition et la santé animale du groupe Lesaffre, a permis l'étude de levures séchées et agglomérées industriellement sous forme de sphérules. L'accès à différentes biomasses séchées a été un véritable atout pour comprendre comment les levures résistent à des cycles de déshydratation et de réhydratation. Peu de travaux sur des produits secs équivalents sont aujourd'hui disponibles. L'empirisme inhérent au développement industriel a permis de mettre au point des conditions de production de levures déshydratées à très fort taux de survie. Cette survie, pouvant également être qualifiée de « stabilité », c'est-à-dire la persistance de la viabilité au cours d'une perturbation, est un critère essentiel pour les industriels. Elle est générée par les propriétés intrinsèques du micro-organisme considéré, ainsi que par les propriétés modulées par le procédé de production et de séchage.

L'objectif de ces travaux de thèse était donc de comprendre les mécanismes clés à l'origine de la stabilité de *Saccharomyces cerevisiae* séchées et agglomérées par un procédé industriel. Pour cela, il a été nécessaire de comprendre les déterminants physico-chimiques et biologiques de la stabilité des levures sèches actives en fonction des conditions environnementales et également de comprendre le lien entre stabilité et procédé de séchage. Afin de répondre à ces objectifs, nous avons étudié les impacts des paramètres de séchage sur les caractéristiques biologiques, physico-chimiques et thermophysiques des levures A, B et C, ainsi que le lien entre ces caractéristiques et la survie des levures. Nous avons également étudié les effets des conditions environnementales et de leurs fluctuations sur la survie des levures. Pour finir, nous nous sommes intéressés aux modifications morphologiques des cellules générées par les procédés de séchage.

Ces travaux de thèse se sont articulés autour de trois axes principaux, correspondant aux différents chapitres de ce manuscrit. Le premier chapitre est dédié à l'étude des effets des barèmes de séchage sur les caractéristiques biologiques, physiques et thermophysiques des levures A, B et C. La survie des levures en fonction de différentes conditions environnementales, ainsi qu'une étude comparative des caractéristiques A, B et C seront présentées. Le deuxième chapitre est consacré aux effets des conditions environnementales sur la survie et les propriétés thermophysiques des levures. Les mécanismes de survie impliqués ont été recherchés et seront discutés. Le procédé de déshydratation génère également des modifications morphologiques et structurelles. Les caractéristiques des cellules déshydratées sont présentées dans le troisième chapitre.

Matériel et Méthodes

1. Levures sèches actives

Des sphérules de levures *Saccharomyces cerevisiae* agglomérées, commerciales, ont été étudiées dans ces travaux (figure 17). Elles ont été produites à partir d'une crème de levures commune (biomasse obtenue après élimination du milieu de culture). Cette démarche a permis d'éliminer les éventuels biais pouvant être présents avec l'utilisation de crèmes de levures différentes. La crème de levures a été séchée sur des lignes de séchage industrielles de taille équivalente et sur la même période. Dans une constante amélioration des produits, l'industriel a développé trois barèmes de séchage A, B et C conduisant respectivement aux sphérules de levures A, B et C. Les cinétiques de séchage dépendent du barème de séchage considéré. Le barème C est le plus ménageant : la température initiale de séchage est plus basse que celle des barèmes A et B. La cinétique de séchage (couple temps/ température) est également plus lente. Le temps de séchage des sphérules de levures est conditionné par l'atteinte d'une valeur consigne de matière sèche. Par conséquent, le temps de séchage est dépendant des conditions environnementales et de la qualité de l'air. Néanmoins, de manière générale, le barème A est le plus court ; le barème B a un temps intermédiaire et le barème C est le plus long. Les sphérules de levures ont été conditionnées sous vide en sortie d'usine et stockées à -18 °C afin de les conserver dans un état proche de leur état natif.



Figure 17. Sphérules de levures observées à la loupe binoculaire

2. Réhydratation

2.1. Protocole de réhydratation classique

La réhydratation est une étape clé dans la revivication des cellules sèches actives. Le protocole de réhydratation a été élaboré à partir des préconisations de réhydratation commerciales. Le protocole de réhydratation classique a été utilisé en routine dans ces travaux. Une masse de 1 g \pm 0,003 g de levures sèches actives a été pesée et introduit dans un pot stérile. Un volume de 100 mL d'eau stérile, préchauffée à 38 °C, est ajouté aux levures. Le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante sans agitation. Après homogénéisation à la main, le mélange est dispersé 3 minutes à vitesse maximale (6000 tours.minute⁻¹) (Laboratory Mixer, Emulsifier, Silverson).

2.2. Protocole de réhydratation ménageant

Une masse de 1 g \pm 0,003 g de levures sèches actives a été pesée et étalée en couche fine dans une coupelle. Une phase vapeur à 90% HR a été appliquée durant 120 minutes à 30 °C (enceinte climatique Memmert). Un volume de 100 mL d'eau stérile préchauffée à 38 °C est ajouté aux levures à la sortie de l'enceinte. Le mélange est dispersé 3 minutes à vitesse maximale (6000 tours.minute⁻¹) par Silverson (Laboratory Mixer, Emulsifier, Silverson).

3. Mesure de la viabilité des levures

3.1. Mesure de cultivabilité

Afin de déterminer le nombre de cellules revivifiables dans les sphérules de levures, la méthode de dénombrement en goutte a été utilisée. Une masse de levures sèches agglomérées de 1 g \pm 0,003g a été pesée et resuspendue dans 100 mL d'eau stérile préchauffée à 38 °C. Le mélange a été incubé 5 minutes à température ambiante, avant d'être homogénéisé par 3 minutes de Silverson à puissance maximale. Des dilutions décimales successives ont été réalisées et déposées en spot de 10 μ L sur des géloses YM agar (Yeast Mold agar, BD Difco agar). Les unités formant colonies (UFC) ont été dénombrées après incubation 24 heures à 30 °C. Les résultats sont exprimés par rapport aux grammes de matière sèche contenus dans le produit considéré. 12 répétitions ont été réalisées par échantillon.

3.2. Estimation de l'intégrité membranaire

L'intégrité membranaire des cellules a été mesurée par cytométrie en flux après marquage des cellules avec de l'iodure de propidium (IP). L'IP est un agent intercalant de l'ADN. Lorsque la membrane de la cellule est perméabilisée, l'IP pénètre dans la cellule pour venir se complexer avec les acides nucléiques intracellulaires. Il y a donc émission d'une fluorescence. Cette dernière est détectée par le cytomètre en flux. Les analyses ont été réalisées sur le cytomètre en flux FacsAria II (Becton Dickinson, San José, Ca, USA) équipé de deux lasers (488 nm, 20 mW et 633 nm, 20 mW). Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de l'IP sont respectivement 535 nm et 617 nm.

Une masse de levures sèches agglomérées de 1 g +/- 0,003 g a été pesée et resuspendue dans 100 mL d'eau stérile préchauffée à 38 °C. Le mélange a été incubé 5 minutes à température ambiante, avant d'être homogénéisé 3 minutes à puissance maximale par Sylverson. Une suspension de cellules à 1.10^5 cellules.mL⁻¹ a été marquée par de l'IP (Iodure de propidium, Life Technologies ; concentration initiale : 1mg.mL⁻¹) à une concentration finale de 1.10^{-3} mg.mL⁻¹. 12 répétitions ont été réalisées par échantillon.

4. Evaluation de la résistance au procédé de granulation

4.1. Prémélanges

Les sphérules de levures ont été incorporées (taux d'incorporation de 9,1 %) à un support (paroi de levure (SafMannan, Lesaffre, France ; a_w 0,220), carbonate de calcium (Euronutrition, France ; a_w 0,515), maïs (Euronutrition, France ; a_w 0,606)) afin de former un prémélange. Un témoin sphérules de levures sans support a également été réalisé. Ces prémélanges ont été conservés durant sept jours ou deux mois à température ambiante.

4.2. Mélanges farines

Le prémélange a été mélangé à l'aliment porc (Aliment porc charcutier, Euronutrition, France) à un taux d'incorporation de 0,99 %. Les mélanges farines ont été directement envoyés dans la ligne de production (sans temps de contact) ou conservés durant quatre heures à température ambiante avant d'être envoyés dans la ligne de production.

4.3. Procédé de granulation

Les essais ont été réalisés sur une ligne de granulation préindustrielle, chez Tecaliman (Nantes). Le procédé de granulation consiste à faire passer la farine d'un état pulvérulent à un état cohérent de structure granulaire. La farine a été passée dans un conditionneur, il y a eu injection de vapeur à l'entrée du conditionneur (figure 18). Elle a été ensuite malaxée par des pales. A la sortie du conditionneur la température du mélange était de 95 °C. Le mélange a été ensuite envoyé dans une filière où il a été comprimé jusqu'au point critique de déformation entraînant la création de liaisons irréversibles entre les particules et donc la formation de granules d'aliment. La température consigne de la filière était de 93 °C. Les granulés ont été refroidis sur caisson d'air avant d'être mis en sac.

Température ambiante 21-22°C

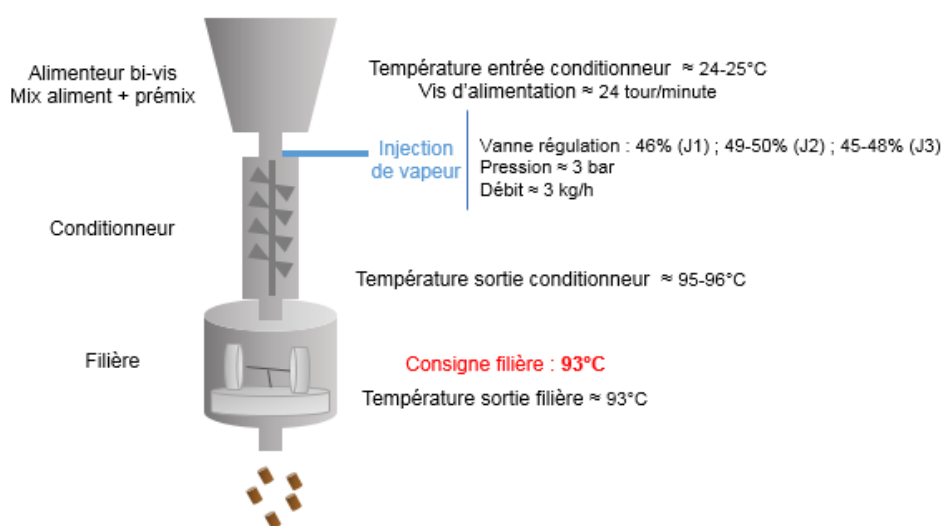


Figure 18. Schéma explicatif du procédé de granulation et paramètres utilisés

4.4. Réhydratation et mesure de la cultivabilité des levures

Afin de déterminer le nombre de cellules revivifiables dans les granulés, une masse de 10 g a été introduite dans un sac stomacher. Un volume de 100 mL d'eau stérile préchauffée à 37 °C a été ajouté. Le mélange a été homogénéisé durant 2 minutes à vitesse maximale (Stomacher 400). Des dilutions décimales successives ont été réalisées de 10^{-2} à 10^{-6} , avant de déposer 1 mL d'inoculum par boîte et de le recouvrir avec 100 mL de milieu YM agar (Yeast Mold agar, BD Difco agar). Les UFC sont dénombrées après incubation 48 heures à 30 °C.

5. Etude de stabilité de la viabilité

La stabilité de la viabilité des sphérules de levures A, B et C a été suivie pendant deux années. Les viabilités des levures A, B et C ont été initialement caractérisées. Elles correspondent au témoin $t = 0$. Des capsules contenant des masses de $1\text{g} \pm 0,003\text{g}$ ont été placées dans des boîtes hermétiques contenant des solutions de sels saturées. Ces solutions permettent de saturer l'air de la boîte à une HR donnée. Les sphérules placées au contact de cette atmosphère vont s'équilibrer à l'HR de la boîte par phénomène de déshydratation ou de réhydratation. Les sphérules de levures ont été stockées sous 4 HR (12% (LiCl) ; 33% (MgCl₂) ; 55% (MgNO₃) ; 75% (NaCl)) à 25 °C, sans convection et à l'obscurité. Des capsules ont été prélevées à $t = 1$ semaine, $t = 2$ semaines, $t = 1$ mois, $t = 2$ mois, $t = 3$ mois, $t = 6$ mois, $t = 1$ an, $t = 1,5$ ans, $t = 2$ ans. Un point de prélèvement est constitué de trois réplicats pour chaque analyse. La viabilité a été déterminée, l'activité de l'eau et la teneur en eau ont été contrôlées. La masse de levures a été réhydratée avec 100 mL d'eau préchauffée à 38 °C. Un temps d'incubation de 5 minutes a été appliqué, puis le mélange a été homogénéisé par Sylverson 3 minutes à vitesse maximale. Le nombre d'UFC a été déterminé par dénombrement en goutte.

6. Méthodes de caractérisation biochimique de la composition des levures sèches actives

6.1. Détermination de l'activité de l'eau

L' a_w est définie comme le rapport entre la pression de la vapeur d'eau dans le soluté (ici le produit) et son environnement et la pression de la vapeur d'eau pure à la même température. En d'autres termes, l' a_w indique la quantité d'eau disponible au sein d'un échantillon. Cette dernière dépend de la composition du milieu considéré.

L' a_w a été mesurée par la méthode de point de rosée à 25 °C (Aqualab Series 3TE, Decagon Devices, Inc., Pullman, WA). Cinq mesures ont été réalisées par échantillon, la moyenne et l'écart type sont présentés.

6.2. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau correspond au pourcentage de la masse d'eau sur la masse de produit. Ce paramètre est très utilisé pour caractériser le niveau d'hydratation d'un produit au cours du séchage et de son stockage.

La masse a été pesée avant et après incubation de 24 heures à 105 °C.

La teneur en eau a été déterminée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100$$

avec la masse initiale (m_0) exprimée en g ; la masse après incubation (m_1) exprimée en g.

Cinq mesures ont été réalisées par échantillon. La moyenne et l'écart type sont présentés.

6.3. Détermination de la teneur en azote totale

La teneur en azote totale est déterminée par la méthode Dumas sur une masse de 200 mg +/- 20 mg. Ces analyses ont été réalisées par le service analytique du groupe Lesaffre.

6.4. Détermination de la teneur en tréhalose total

Une lyse par choc thermique est réalisée sur une masse de levures sèches actives. Elle permet de libérer le tréhalose intracellulaire. Après filtration, le tréhalose total du lysat est dosé par HPLC. Ces analyses ont été réalisées par le service analytique du groupe Lesaffre.

7. Méthodes de caractérisation physique des levures sèches actives

7.1. Granulométrie laser

La granulométrie des sphérules de levures a été étudiée par granulométrie laser (Malvern instruments). La granulométrie laser est basée sur la mesure de la diffraction de la lumière émise par un laser. Cette mesure est liée à la notion de sphère équivalente, c'est-à-dire que le diamètre des particules mesurées correspond aux sphères ayant le même volume que le volume des particules présentes dans le faisceau laser quelle que soit leur forme.

Différents paramètres sont estimés par le granulomètre laser :

- $D_v(50)$: diamètre en dessous et au-dessus duquel se trouve 50% du volume des particules (diamètre moyen). La $D_v(50)$ sépare la distribution granulométrique en deux parties.
- $D_v(10)$: diamètre en dessous duquel se situe 10% du volume des particules
- $D_v(90)$: diamètre en dessous duquel se situe 90% du volume des particules
- $D[3,2]$: diamètre moyen exprimé par rapport à la surface des particules, ce paramètre est sensible à la présence de fines particules.
- $D[4,3]$: diamètre moyen en volume, sensible à la présence de grosses particules.
- *Span* : ce paramètre représente la largeur de la distribution de l'échantillon. Plus il est élevé, plus la distribution est étalée.
- *Uniformité* : Ce paramètre reflète la déviation de taille par rapport à la médiane.

7.2. Surface spécifique

La surface spécifique correspond à la surface totale accessible d'un objet, c'est-à-dire la surface visible ainsi que celles des pores ouverts (pores accessibles à la surface). Elle est définie par le rapport entre la superficie de la surface réelle de l'objet et sa quantité de matière. Ces mesures ont été réalisées par le pôle matériaux de Sayens par sorptométrie par adsorption de Krypton (TriStar II Micromeritics couplé à un Smart VacPrep Micromeritics). Les échantillons sont dégazés 24 heures à 25 °C avant la mesure de surface spécifique dans les conditions suivantes : température en cours d'essai de -196 °C (dewar d'azote liquide) ; gamme de pression appliquée allant de $0 < P/P_0 < 0,25$ avec P_0 = pression de vapeur saturante du krypton à la température de l'essai (-196 °C). Le traitement du signal standard est réalisé par méthode BET 5 points.

7.3. Porosité à intrusion de mercure

Des mesures de porosité de surface à intrusion de mercure ont été réalisées par le pôle matériaux de Sayens sur l'appareil Micromeritics Autopore IV. L'analyse est réalisée en deux temps. L'ensemble 'pénétrromètre-échantillon' est en configuration 'basse pression' (mesure de 0,52 psia (vide primaire) jusqu'à 30 psia soit 2 bars), puis l'ensemble 'pénétrromètre-échantillon' est en configuration 'haute pression' (mesure jusqu'à 60000 psia soit 4000 bars).

La taille minimale des pores accessibles est de 3 nm. La prise d'essai (masse d'échantillon pesée) est différente pour les trois produits. Une seule mesure a été réalisée par échantillon.

Après traitement des données, différents paramètres sont accessibles :

- ρ particule ($g.cm^{-3}$) : masse volumique des particules (le mercure s'est introduit dans le lit de poudre entre les particules).
- ρ finale ($g.cm^{-3}$) : masse volumique en fin de mesure après les probables phénomènes de compression/écrasement des levures.
- % porosité totale : pourcentage total de "vide" analysé (porosité inter-particulaire + compression).
- $d_{int. < 0,1}$ (nm) : diamètre équivalent au maxi du mode d'intrusion observé en dessous de 0,1 μm .
- % de porosité intra-particulaire : pourcentage volumique d'intrusion observé en dessous de 0,1 μm .

7.4. Estimation de la porosité fermée par calcul de la masse volumique

La masse volumique de chaque classe granulométrique a été déterminée, puis une estimation de la masse volumique théorique de la fraction totale a été réalisée. Le rayon médian de chaque classe granulométrique a été utilisé. Les calculs de masse volumique sont basés sur le nombre de sphérules par gramme de produit et le rayon de la sphérule. Les trois lots ont été produits dans des séchoirs de taille identique, l'impact sur la granulométrie et donc sur le rayon des sphérules est donc considéré comme faible.

$$\text{Masse volumique d'une bille} = \frac{\text{Masse d'une bille}}{\text{Volume d'une bille}} = \frac{m}{4\pi R^3/3}$$

avec la masse volumique d'une bille exprimée en $m.g^{-1}$; la masse d'une bille (m) exprimée en g ; le rayon d'une bille (r) exprimé en m.

8. Méthodes de caractérisation des propriétés thermophysiques des levures sèches actives

8.1. Calorimétrie à balayage différentiel

Afin d'étudier les caractéristiques physiques des levures des analyses de calorimétrie à balayage différentiel (DSC) ont été effectuées. Ces analyses sont basées sur la différence d'énergie entre l'échantillon et la référence, afin qu'ils chauffent à une même vitesse. La DSC permet de révéler trois phénomènes thermophysiques (figure 19) : la transition vitreuse, la cristallisation et la fusion.

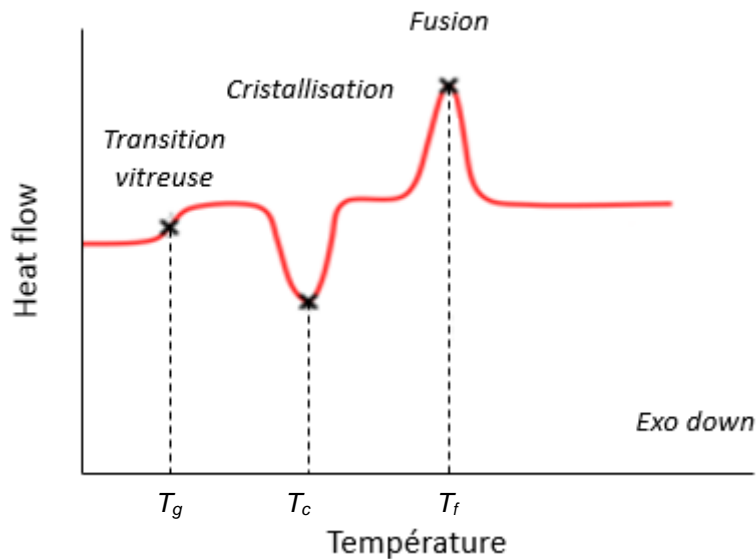


Figure 19. Phénomènes thermophysiques révélés par la DSC (T_g : température de transition vitreuse ; T_c : température de cristallisation ; T_f : température de fusion).

- **Transition vitreuse** : phénomène réversible et répétable, sans libération ou absorption de chaleur latente (transformation de second ordre). Elle correspond au passage de l'état amorphe vitreux, dans lequel la viscosité est élevée et la mobilité moléculaire est fortement réduite à l'état amorphe caoutchoutique, caractérisé par une baisse de la viscosité et donc une augmentation de la mobilité moléculaire. La transition vitreuse est caractérisée par une plage de température de transition vitreuse (nommée T_g), déterminée par la méthode des tangentes (figure 20). La température de début du phénomène, appelée T_g onset, correspond à la température au point d'intersection entre la ligne de base 'basse température' et la tangente à la courbe au point d'inflexion. La

T_g midpoint est défini par la température correspond à la moitié du saut de ΔC_p . La température de fin de phénomène, nommée T_g endset, correspond à la température au point d'intersection entre la ligne de base 'haute température' et la tangente à la courbe au point d'inflexion.

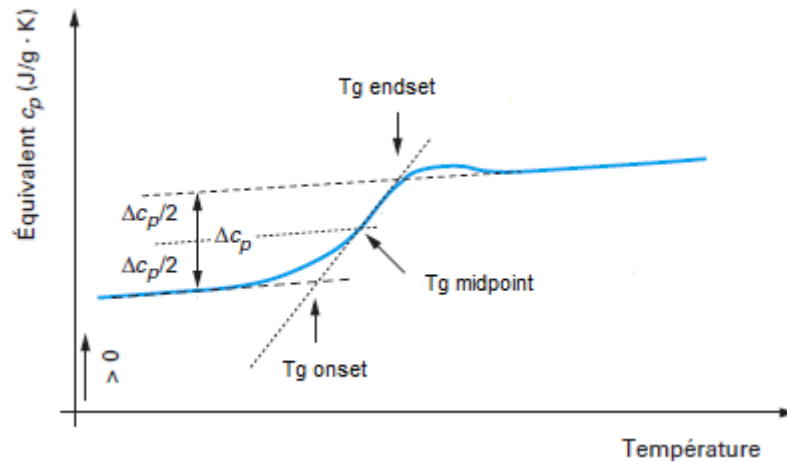


Figure 20. Phénomène de transition vitreuse

- **Cristallisation** : Au-dessus de T_g et lorsque les conditions thermophysiques le permettent, les molécules peuvent se réorganiser et former un cristal. Ce phénomène est caractérisé par une libération de chaleur latente (pic exothermique, transformation de premier ordre). La température correspondant au sommet du pic est définie comme la température de cristallisation (T_c).
- **Fusion** : L'apport de chaleur à une matrice cristallisée va provoquer la fonte des cristaux. Le phénomène de fusion est caractérisé par une absorption de chaleur latente (pic endothermique, transformation de premier ordre). La température de fusion (T_f) correspond au point le plus haut du pic endothermique.

Un cycle de DSC est composé d'un refroidissement préliminaire permettant de refroidir l'échantillon de l'ambiante jusqu'à -40 °C, puis d'un premier chauffage allant de -40 °C à 180 °C. Un second refroidissement allant de 180 °C à -40 °C est réalisé avant d'appliquer un second chauffage de -40 °C à 230 °C (figure 21).

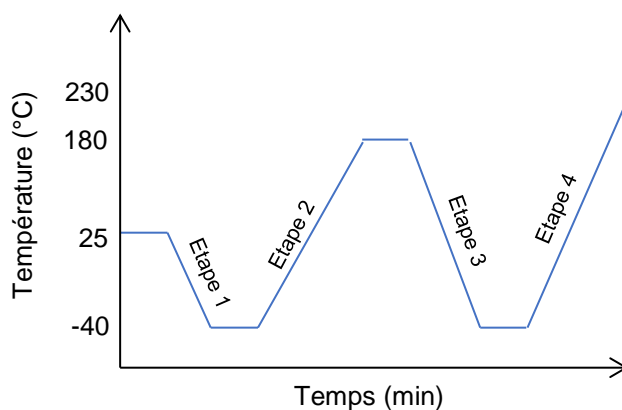


Figure 21. Etapes d'un run de DSC

Le premier chauffage permet d'effacer l'histoire thermique de l'échantillon et le saut associé à la relaxation enthalpique ; le second chauffage permet de déterminer les températures de transition vitreuse.

Les analyses de DSC ont été conduites sur un calorimètre Q20 (TA instrument, Inc., New Castle, DE, United states) sous flux d'azote ($25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Les mesures ont été réalisées sur 5 à 10 mg d'échantillon, scellé hermétiquement dans une capsule d'aluminium. Une capsule d'aluminium vide sert de référence. La calibration de l'appareil a été réalisée à $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la température et l'énergie avec de l'azobenzol et de l'indium. Les échantillons sont analysés avec un scan de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ comportant deux cycles de chauffage et refroidissement allant de -40 à $180 \text{ }^\circ\text{C}$ et de -40 à $230 \text{ }^\circ\text{C}$. Les thermogrammes ont été analysés avec le logiciel TA Universal Analysis.

8.2. Diffraction de rayons X

L'analyse par diffraction de rayons X (DrX) permet la détection des phases micro et polycristallines des matériaux. Un faisceau de rayons X monochromatiques et parallèles est envoyé sur l'échantillon, étalé sous forme de poudre et tournant d'un mouvement uniforme. Un détecteur, tournant autour du même axe que l'échantillon à une vitesse deux fois plus élevée, mesure l'intensité du rayonnement X diffracté et donc révèle la présence de cristaux. La recherche de cristaux a été réalisée sur un diffractomètre D2 Phaser Y et 2nd generation (Bruker) avec des scans lents (10-60 ; pas : 2.5 ; max : 80).

9. Etude de la structure cellulaire des levures sèches actives par microscopie

9.1. Microscopie électronique à balayage

Des observations des sphérules entières et fracturées ont été réalisées par microscopie électronique à balayage (MEB) équipé d'une platine cryogénique. L'utilisation de cette microscopie permet d'observer les levures au sein des sphérules sans étape de réhydratation lors de la préparation et sans dénaturer l'organisation des cellules et des sphérules.

Le MEB est une technique d'observation de la topographie de surface, basée sur les interactions électrons – matière. Un faisceau d'électrons primaire est envoyé et balaye la surface de l'échantillon. Ce dernier génère des électrons secondaires qui après détection vont permettre d'imager la surface de l'échantillon (figure 22).

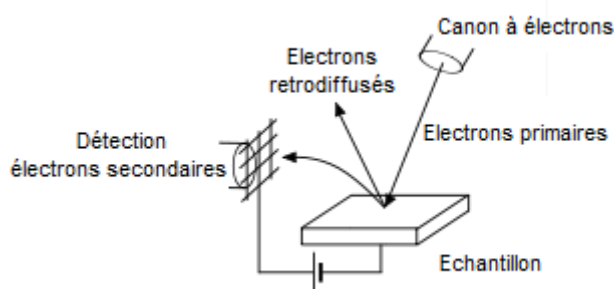


Figure 22. Principe du microscope électronique à balayage

L'échantillon a été observé en entier ou après coupe au scalpel en amont de la fixation. L'échantillon est ensuite fixé à froid par azote pâteux. Une sublimation des glaces de surface de 1 minute à $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, puis une métallisation au Platine de 5 mA pendant 30 secondes sont réalisées. Les échantillons ont été observés avec une platine Cryo (QUORUM PP3000T) adossée au MEB SU8230 (Hitachi), permettant leur maintien à basse température (entre $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$) pendant toutes les observations. Une métallisation de surface secondaire a pu être réalisée pour certains échantillons, afin de gagner en informations.

9.2. Microscopie de force atomique

La microscopie de force atomique (Atomic Force Microscopy (AFM)) est une technique de microscopie de champs proche à sonde locale par balayage de la surface, basée sur la

détection des forces interatomiques s'exerçant entre la pointe et la surface de l'échantillon (conductrice ou non). Pour cela, une sonde nanométrique, placée à l'extrémité d'un levier flexible et rattachée à une céramique piézoélectrique balaye la surface de l'échantillon. La sonde subira l'action des forces interatomiques (attractives, répulsives) à la surface de l'échantillon. Le levier subit alors une déformation, appelée déflexion, qui est proportionnelle à la force ressentie. Cette déflexion est mesurée optiquement par réflexion d'un faisceau laser mesurée par une photodiode. Cette mesure permet de reconstituer la topographie de surface (figure 23).

L'AFM permet d'imager à très haute résolution (10^{-10} m).

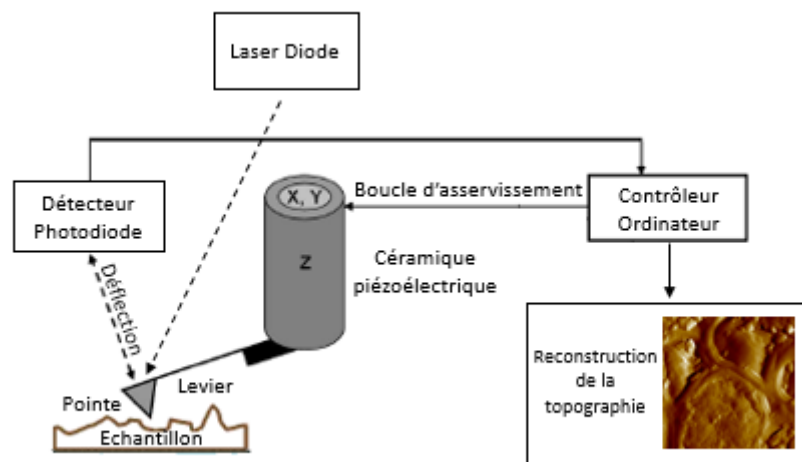


Figure 23. Principe du microscope de force atomique

Cette technique a l'avantage d'être non destructrice et non invasive pour l'échantillon étudié. Par conséquent, l'observation des levures sèches actives pouvait être effectuée sans aucun traitement.

Les sphérules de levures ont été sectionnées en deux à l'aide d'un scapel, puis placées sur un support de type carbon scotch. L'observation des levures a été réalisée sur un microscope de force atomique Bruker Icon 2 nanoDMA, en mode Peak Force QNM. Une chambre a été placée au-dessus du microscope afin de contrôler l'humidité relative de l'air et d'éviter la réhydratation des sphérules lors des observations.

Résultats et Discussion

Chapitre 1

Effets des barèmes de séchage sur les caractéristiques biologiques et physico- chimiques des levures sèches actives

La suspension prolongée et réversible des activités cellulaires par déshydratation est un enjeu important pour l'exploitation industrielle de micro-organismes comme *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons vu lors de la synthèse bibliographique que la levure possède un fort potentiel à résister à la déshydratation. La réhydratation doit permettre la restauration du métabolisme dans des conditions favorables.

Cette thèse est basée sur l'étude de trois produits industriels, nommés A, B et C, uniquement composés de levures séchées et agglomérées sous forme de sphérules. L'accès à différentes biomasses séchées de façon industrielle est un véritable atout pour comprendre les mécanismes clés à l'origine de la stabilité des levures. Les levures A, B et C sont générées à partir d'une même technologie de séchage, néanmoins les barèmes de séchage appliqués sont différents.

Dès la sortie du procédé de séchage, les levures sèches actives sont soumises à des fluctuations hydriques et thermiques dues aux variations des conditions environnementales qu'elles soient naturelles ou industrielles. De plus, les levures étudiées dans le cadre de ces travaux, sont destinées à la nutrition et à la santé animale. Par conséquent, elles doivent être incorporées par des procédés aux matrices alimentaires avant de pouvoir être ingérées par les animaux. Durant cette étape, les levures peuvent subir des contraintes mécaniques, thermiques et hydriques. Le challenge industriel est de proposer des levures capables de résister à toutes ces perturbations afin de garantir un taux de cellules viables élevé dans les produits. Une étude comparative des levures A, B et C se basant sur différents paramètres (figure 24) a été réalisée.

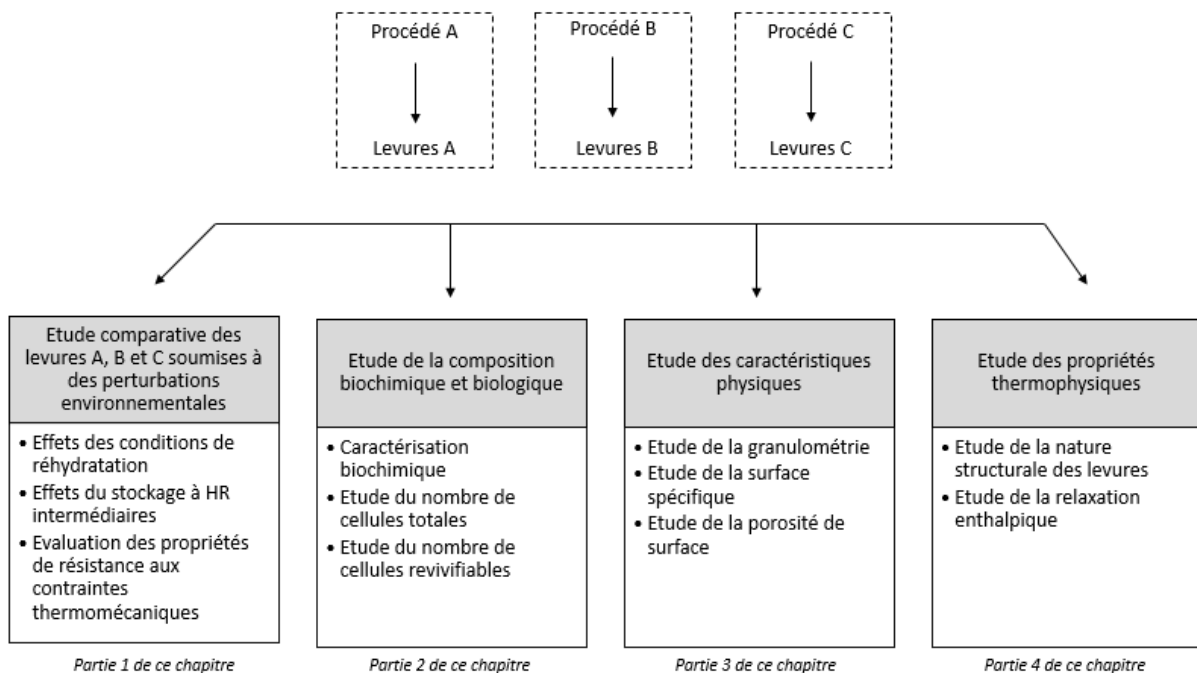


Figure 24. Organigramme de l'étude comparative des levures A, B et C

Nos travaux ont donc commencé par l'étude comparative des levures A, B et C soumises à des perturbations environnementales (*partie 1*). Le profil des levures A, B et C a ainsi pu être déterminé. Afin d'expliquer les différences de viabilité des levures A, B et C, une seconde étude comparative a été réalisée. Elle avait pour objectif d'évaluer les caractéristiques biologiques, biochimiques et physiques des levures A, B et C générées par les barèmes de séchage appliqués (*parties 2, 3*). Différents mécanismes participant à la stabilisation des systèmes biologiques, dont celui de la vitrification, ont été proposés ces dernières années. Dans le cas d'une déshydratation sévère, la viscosité du système augmente fortement entraînant la formation d'un verre. La transition vitreuse de levures déshydratées industrielles de type Instant Active Dry Yeasts avait été mise en évidence par Schebor et ses collaborateurs (2000). Les levures ayant accumulé du tréhalose en amont du procédé de séchage, il est donc possible qu'elles présentent une vitrification de la matrice intracellulaire. L'hypothèse de la présence d'un verre chez les levures A, B et C a donc été vérifiée. Les propriétés thermophysiques des levures A, B et C ont également été étudiées et la notion de qualité de verre sera construite durant ce chapitre (*partie 4*).

1. Etude comparative de la viabilité des levures A, B et C soumises à des perturbations environnementales

Les effets des conditions environnementales sur la viabilité des levures A, B et C ont été évalués au travers des effets des conditions de réhydratation, de stockage à différentes HR ainsi que des conditions de granulation. Les résultats sont présentés dans cette partie.

1.1. Effets des conditions de réhydratation sur la viabilité des levures

Les conditions de réhydratation de micro-organismes secs sont déterminantes car elles conditionnent leur viabilité. Nous avons donc choisi d'étudier les effets des conditions de réhydratation sur la viabilité des levures A, B et C. Pour cela, nous nous sommes intéressés à trois principaux paramètres influençant la réhydratation : la température, la composition de la solution de réhydratation et la cinétique de réhydratation.

Les levures A, B et C ont été réhydratées dans de l'eau distillée stérile préchauffée à 25 °C, 38 °C (condition préconisée), 40 °C et à 42 °C, ainsi que dans du PBS préchauffé à 38 °C et dans

un milieu de culture YPD également préchauffé à 38 °C. Le taux de survie a été mesuré à l'issue de ces conditions de réhydratation.

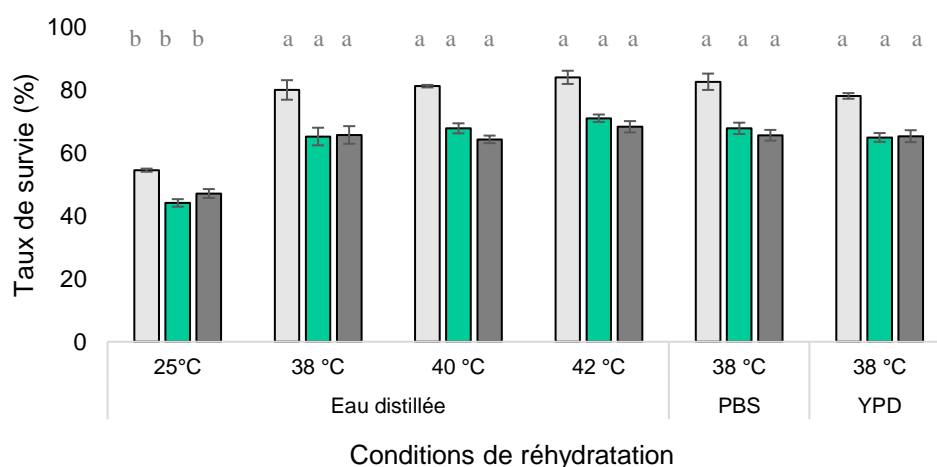


Figure 25. Effets de la température et de la composition de la solution de réhydratation sur le taux de survie des levures A (□), B (■) et C (■). Les valeurs moyennes des taux de survie (%) et les écarts types sont représentés. Les lettres associées aux conditions étudiées indiquent des différences significatives ($p < 0,05$), déterminées par le test de Tukey (la condition témoin correspond à la réhydratation réalisée à 38 °C avec de l'eau distillée).

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas d'effet des solutions de réhydratation sur les taux de survie des levures A, B et C à température comparable (figure 25). Une étude de Zhao et Zhang (2005) a montré l'influence importante de la composition de la solution de réhydratation sur la survie de bactéries. En revanche, les auteurs ont souligné le fait que cet effet est espèce dépendante. Les levures étudiées étant riche en tréhalose, ce dernier peut être consommé lors de la réhydratation, expliquant l'absence de besoin de nutriments complémentaires. De plus, l'augmentation du taux de survie est corrélée avec celle de la température de réhydratation. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions 38, 40 et 42 °C. L'effet de la température couplée à la cinétique de réhydratation (1 heure) a été étudié au travers d'une réhydratation « choc » ou « douce ». Une réhydratation choc à 25 °C induit une mortalité plus importante qu'à 38 °C (figure 26). Néanmoins, les taux de survie obtenus grâce à une réhydratation douce à 25 °C donnent des résultats identiques à une réhydratation douce réalisée à 38 °C pour les levures A et C.

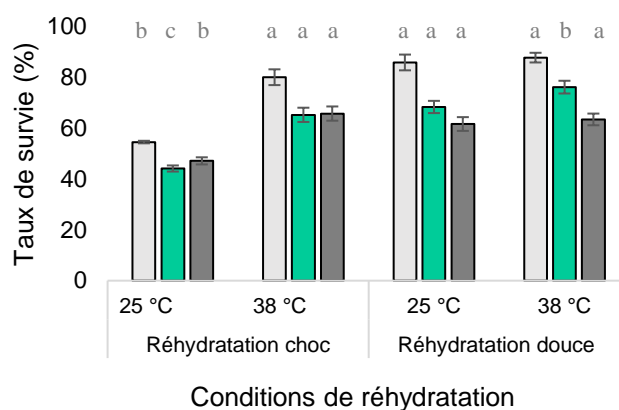


Figure 26. Effet d'une réhydratation choc versus une réhydratation douce sur la viabilité des levures A (□), B (■) et C (■). Les levures ont été réhydratées directement avec de l'eau distillée stérile préchauffée à 25 °C ou à 38 °C (réhydratation choc) ou transférées dans une enceinte à 90% HR pendant 1 heure à 25 °C ou 38 °C avant d'être réhydratées avec de l'eau distillée stérile (réhydratation douce). Les valeurs moyennes des taux de survie (%) et les écarts types sont représentés. Les lettres associées aux conditions étudiées indiquent des différences significatives ($p < 0,05$), déterminées par le test de Tukey (la condition témoin correspond à la réhydratation choc réalisée à 38 °C).

La réhydratation à basse température génère un taux de mortalité important (Leach and Scott 1959), s'expliquant par une fuite des ions potassium (Van Steveninck and Ledebor 1974) et de composés cytoplasmiques (Pena et al. 1992). Lors de la réhydratation, les membranes subissent une nouvelle transition de phase. Il est préconisé de réhydrater au-dessus de la température de fusion des membranes, c'est-à-dire 30 °C pour des levures qui ont été séchées en présence de tréhalose et en phase stationnaire de croissance (Leslie et al. 1994). L'augmentation de la température de réhydratation induit l'augmentation de la fluidité membranaire permettant son retour à l'état hydraté (Poirier et al. 1999). Hoekstra et ses collaborateurs ont montré qu'une pré-humidification suivie d'une réhydratation à une température suffisante permet de passer la transition de phase et d'éviter le phénomène de fuite (Hoekstra et al. 1999). De plus, il a également été montré qu'une réhydratation lente et progressive jusqu'à une a_w de 0,45 permet l'amélioration de la viabilité de *S. cerevisiae* (Poirier et al. 1999). Une déshydratation lente permet la réorganisation latérale de la membrane et le maintien de la surface membranaire. Après réhydratation en milieu liquide, l'utilisation d'une réhydratation ménagante conduit à la préservation de 79% de cellules viables contre 43% après une réhydratation choc (Dupont et al. 2010). Les résultats obtenus dans notre étude montrent le bénéfice d'une réhydratation douce réalisée à température plus basse. La température n'est donc pas le seul facteur de la réussite d'une réhydratation, la cinétique de réhydratation a également un rôle déterminant. La vitesse de réhydratation pourrait permettre à la membrane de se

réorganiser et à la cellule de retrouver son volume initial. De même, elle pourrait également favoriser une dévitrification « optimale » du cytoplasme.

1.2. Effet du stockage à des humidités relatives intermédiaires sur la viabilité des levures

Entre leur production et leur utilisation finale, les conditions hydriques des levures sèches actives varient lors des étapes de transport ou de stockage dans des matrices alimentaires comme des farines par exemple. Par conséquent, les levures sèches actives peuvent rester plusieurs mois à des humidités relatives intermédiaires. Les effets d'une conservation longue à des HR intermédiaires sur la viabilité des levures A, B et C ont donc été étudiés.

Pour cela, des coupelles contenant les levures sèches actives ont été placées dans des boîtes hermétiques contenant des solutions de sels saturées à 12%, 33%, 55% ou 75% HR (démarche expérimentale complète section matériel et méthodes, page 59). Les a_w des levures A, B et C, initialement de 0,29, 0,20 et 0,12, se sont équilibrées avec l'HR de leur environnement. Un suivi de la viabilité des levures A, B et C a été réalisé après 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 2 mois, 3 mois, 6 mois, 1 an, 1,5 ans et 2 ans de stockage à 25 °C.

1.2.1. Effets de la conservation à bas niveau d'hydratation sur la viabilité des levures

Les levures A, B et C ont été conservées à 12% HR et 25 °C pendant deux ans. L'atmosphère à 12% HR provoque un sur-séchage des levures A et B (a_w de stockage < a_w initiale des levures). La viabilité des levures C est stable sur la totalité de la durée du suivi, alors que la viabilité de la levure A diminue de 0,27 log après 18 mois de stockage (figure 27). Le stockage à 12% HR des levures B provoque une diminution du nombre de cellules cultivables quasi constante sur la durée du suivi (figure 27). Dans cette condition, les levures B vont subir une déshydratation (initialement B a une a_w de 0,20).

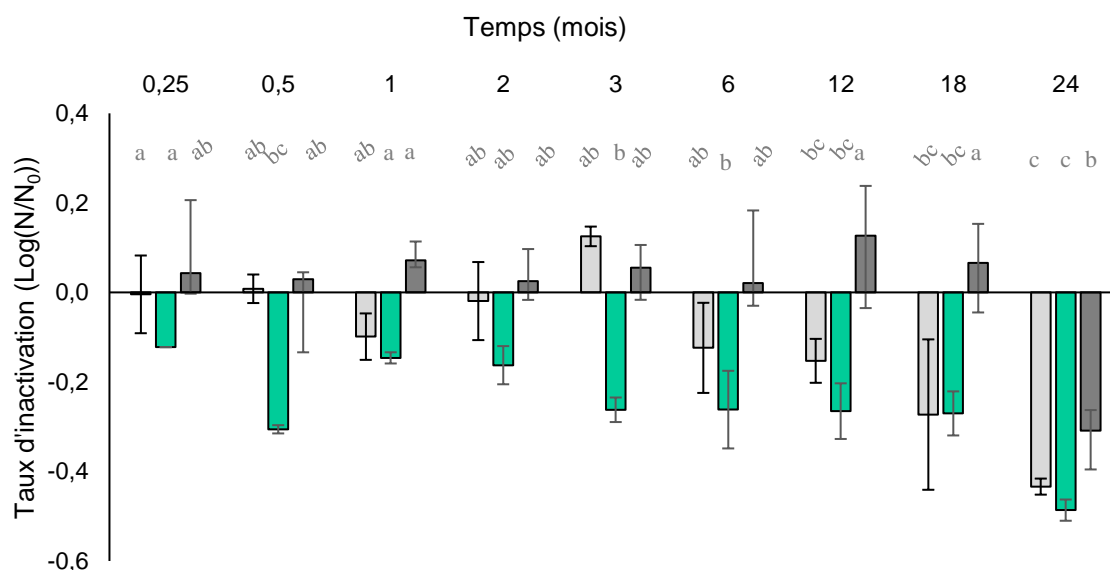


Figure 27. Effets de la conservation à 12% HR sur la viabilité des levures A (□), B (■) et C (■). Les levures ont été stockées à 12% et 25 °C durant deux ans. Les valeurs moyennes des taux d'inactivation au cours du temps (exprimées par $\log(N/N_0)$) et les écarts types sont représentés. Les lettres associées aux conditions étudiées indiquent des différences significatives ($p < 0,05$), déterminées par le test de Tukey.

Une expérience complémentaire a permis de montrer le lien entre les conditions de réhydratation des levures B et le taux de cellules revivifiables (résultats non montrés). En effet, la viabilité des levures B était de 9,90 log (UFC/gMS) après une semaine de stockage à 33% HR. La viabilité associée aux sphérules de levures stockées dans des conditions similaires à 12% HR était de 9,62 log (UFC/gMS). L'incubation des sphérules placées à 12% HR dans une atmosphère à 33% HR a permis de restaurer le taux initial de cellules cultivables (9,87 log(UFC/gMS)). L'effet de la réhydratation sur les levures B sur-séchées est donc non négligeable.

1.2.2. Effets de la conservation à différents niveaux d'humidités intermédiaires sur la viabilité des levures pour des temps inférieurs à 2 mois

Les taux d'inactivation des levures A, B et C ont été mesurés après 1 semaine, 2 semaines, 1 mois et 2 mois de conservation à 33%, 55% et 75% HR. Dans ces conditions, les levures sont réhydratées (a_w de stockage > a_w initiale des levures). La viabilité des levures A, B et C est équivalente dans ces conditions (pas de différence significative). Les résultats révèlent un nombre de cellules cultivables supérieur à celui déterminé à t_0 pour les levures A, B et C (figure 28), se traduisant par un taux d'inactivation positif.

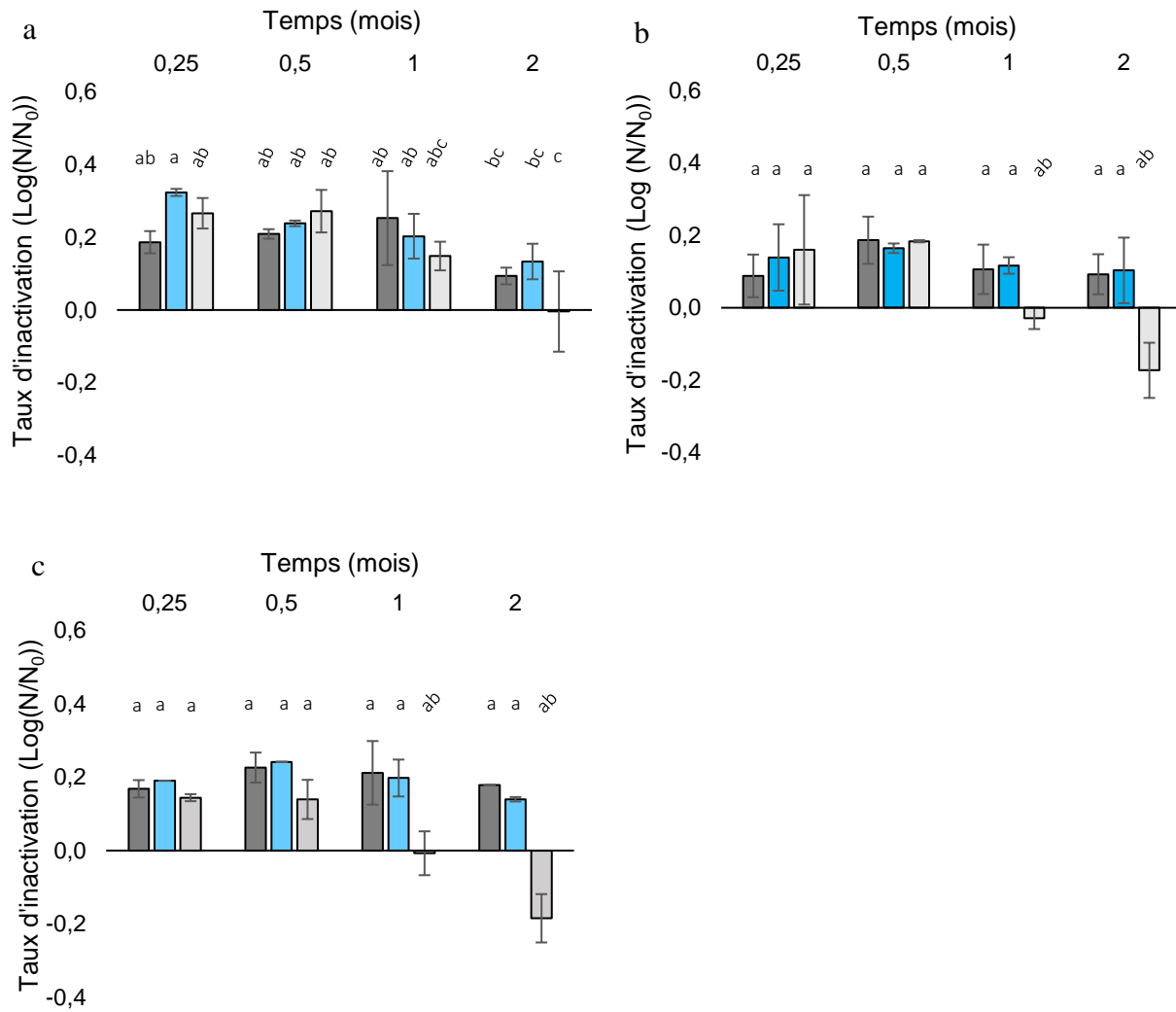


Figure 28. Effets de la conservation à différents niveaux d'humidités intermédiaires sur la viabilité des levures pour des temps inférieurs à 2 mois. Les levures ont été conservées à 25 °C, à 33% HR (■), 55% HR (■), et 75% HR (□). Les valeurs moyennes du taux d'inactivation, exprimées en $\log(N/N_0)$ et les écarts types sont représentés. (a) Taux d'inactivation des levures A (b) Taux d'inactivation des levures B (c) Taux d'inactivation des levures C. Les lettres associées aux conditions étudiées indiquent des différences significatives ($p < 0,05$), déterminées par le test de Tukey.

Les conditions de stockage à des HR intermédiaires conduisent à une réhydratation des levures de manière ménagante. Une réhydratation plus lente permet d'atteindre un taux de survie supérieur à une réhydratation choc (Dupont et al. 2010). Pour les temps inférieurs à deux mois, les conditions de stockage étudiées permettent donc de diminuer les contraintes liées à la réhydratation choc, conduisant à l'obtention de taux de survie plus importants.

1.2.3. Effets de la conservation à différents niveaux d'humidités intermédiaires sur la viabilité des levures pour des temps supérieurs à 3 mois

Les taux d'inactivation des levures A, B et C ont été mesurés après 3 mois, 6 mois, 12 mois, 18 mois et 24 mois à 33%, 55% et 75% HR. Ces conditions entraînent la réhydratation des levures A dans les conditions 55% et 75% HR et des levures B et C dans les trois conditions d'humidité testées (a_w de stockage > a_w initial des levures).

La condition de stockage à 33% HR n'introduit donc pas de variation hydrique pour les levures A et une réhydratation pour les levures B et C. Néanmoins, après 6 mois de stockage, la viabilité des levures A a diminué de 0,54 log et de 1,56 log après 1 an de suivi (figure 29a). Les levures B présentent également une perte de cultivabilité dans cette condition (perte de 0,48 log et de 1,06 log après 6 et 12 mois) (figure 29b). La viabilité des levures C a diminué de 0,91 log après 12 mois (figure 29c). Cette condition impacte donc plus lentement la viabilité des levures C en comparaison avec les levures A et B. A 55% HR, la viabilité des levures A a diminué de 0,51 log après 6 mois et de 2,75 log après 12 mois (figure 29a), alors que les levures B ont perdu 0,18 log (figure 29b) et les levures C 0,42 log (figure 29c) après 6 mois de stockage à 55% HR. Dans la condition 75% HR, la viabilité des levures A, B et C diminue plus rapidement. En effet, les levures B perdent 1,04 log après 3 mois de stockage (figure 29b). Après 12 mois la totalité des populations de A et B ne sont plus cultivables (figures 29a et 29b). Les levures C présentent une perte de 2,36 log à 6 mois puis la disparition totale de la population cultivable à 18 mois (figure 29c). A trois mois d'étude, le produit B est celui qui montre une diminution de viabilité la plus importante (perte d'un log) pour la condition à 75% d'humidité.

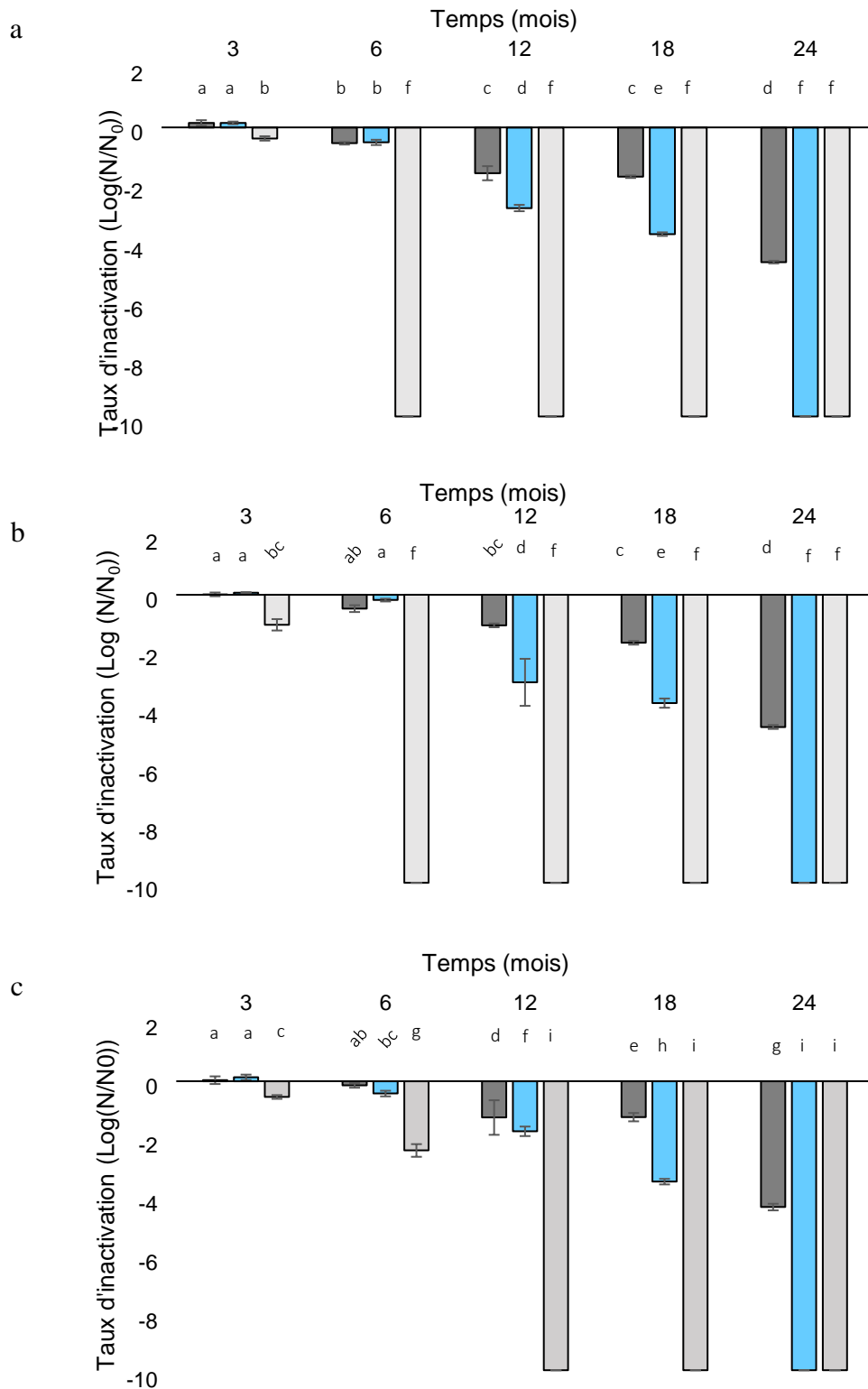


Figure 29. Effets de la conservation à différents niveaux d'humidités intermédiaires sur la viabilité des levures pour des temps supérieurs à 3 mois. Les levures ont été conservées à 25 °C, à 33% HR (■), 55% HR (■), et 75% HR (□). Les valeurs moyennes du taux d'inactivation, exprimées en $\log(N/N_0)$ et les écarts types sont représentés. (a) Taux d'inactivation des levures A (b) Taux d'inactivation des levures B (c) Taux d'inactivation des levures C. Les lettres associées aux conditions étudiées indiquent des différences significatives ($p < 0,05$), déterminées par le test de Tukey.

L'équilibrage des a_w , de sorte que les levures A deviennent les levures C et inversement, révèle des taux d'inactivation similaires après un an de conservation. L'aptitude à la conservation des levures à des humidités relatives intermédiaires pourrait-elle dépendre seulement de l' a_w de stockage ? L'évolution de la viabilité des levures A, B et C présente des tendances similaires à partir de 3 mois. Néanmoins, des différences peuvent être notées. Les levures B présentent les taux d'inactivation les plus élevés. Ceci semble confirmer l'hypersensibilité des levures B à la réhydratation. L'étude révèle une perte de viabilité des levures C plus lente en comparaison avec les levures A et B.

1.3. Evaluation des propriétés de résistance aux contraintes thermomécaniques rencontrées lors du procédé de granulation.

Les sphérules de levures sont distribuées aux animaux via leur alimentation. Elles sont considérées comme des additifs zootechniques, référencées dans la sous-catégorie Gut Flora Stabilizers, dans le domaine de la nutrition animale. Différents procédés d'incorporation des sphérules dans des matrices alimentaires peuvent être utilisés. Il est donc nécessaire d'avoir des sphérules de levures résistantes aux contraintes imposées par ces procédés d'incorporation. La résistance des sphérules de levures aux procédés se définit essentiellement par la stabilité (maintien) de la viabilité des levures. Nous avons choisi d'étudier la résistance des sphérules de levures A, B et C au procédé de granulation. En effet, le procédé de granulation est le procédé le plus utilisé dans le domaine de la nutrition animale. Plus de 80 % de la production française d'aliments composés se présentent sous forme de granulés. En 2018, la France produisait plus de 21 millions de tonnes d'aliments composés de type granulé (hors petfood), ce qui avait placé le pays au troisième rang des producteurs européens (chiffres du Syndicat National de l'Industrie de la Nutrition Animale).

Le procédé de granulation met en œuvre des contraintes hydriques, thermiques et mécaniques. Peu d'articles scientifiques traitent de la résistance de levures agglomérées aux conditions de procédés de granulation. Aguirre-Guzman et ses collaborateurs ont mis en évidence les effets des contraintes mécaniques sur des sphérules de levure. Ils ont observé des pertes de 2 à 2,7 log UFC par gramme d'aliment, après granulation (82 °C pendant 12s). Ces pertes s'élevaient à plus de 5 log UFC par gramme d'aliment après extrusion à froid (température de sortie de 72 °C pendant 30 secondes). Ils confirment ainsi l'effet destructeur du cisaillement, sans parvenir à le caractériser de façon quantitative (Aguirre-Guzmán et al. 2002). La résistance de levures *Saccharomyces cerevisiae* agglomérées à des conditions thermiques mimant un procédé de

Tableau 2. Viabilités des levures A, B et C (exprimées en %) lors du procédé de granulation avec différents supports

| Type de support | Temps de contact support/levures (jours) | Temps de contact support/levures/farine (heure) | Viabilité des levures A (%) | Viabilité des levures B (%) | Viabilité des levures C (%) |
|------------------------------------|--|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Levures sans support | / | 0 | 67,6 | 79,4 | 90,9 |
| | | 4 | 0,00 | 80,1 | 89,4 |
| Paroi de levure (a_w 0,22) | 7 | 0 | 74,8 | 88,4 | 89,1 |
| | | 4 | 63,0 | 84,5 | 86,5 |
| | 42 | 0 | 62,3 | 73,8 | 85,5 |
| | | 4 | 0,00 | 0,00 | 83,8 |
| Carbonate de calcium (a_w 0,52) | 7 | 0 | 0,00 | 0,00 | 90,9 |
| | | 4 | 0,00 | 75,7 | 86,2 |
| | 42 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | 4 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Maïs (a_w 0,61) | 7 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | 4 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 42 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | 4 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

L'analyse de la viabilité des levures directement incorporées dans les farines puis granulées, révèle un taux de survie de 91 % pour les levures C. Les taux de survie des levures B et A sont plus faibles, avec des valeurs respectives de 80 et 68 %. La viabilité des levures A est fortement impactée après prémélange dans les supports les plus hydratés (carbonate de calcium et maïs) puisque les populations ont été entièrement détruites. Les levures B semblent résister dans les conditions de prémélange aux supports carbonate de calcium et paroi de levure après sept jours. Les levures C présentent un taux de survie supérieur à 84 % dans les conditions testées sauf pour les prémélanges réalisés avec le support maïs et le prémélange à 42 jours avec le support carbonate de calcium. Aucune des levures n'a résisté aux contraintes thermomécaniques après prémélange avec le support maïs (prémélange le plus hydraté). Le taux d'hydratation du support et par conséquent du prémélange impacte la viabilité des levures post-granulation. La viabilité post-granulation et donc la résistance à la température diminue avec l'augmentation du taux d'humidité. Les levures s'équilibrent avec leur environnement en quelques heures (activité de l'eau et taux de matière sèche stables). Néanmoins, une différence de viabilité post-granulation est à noter entre un stockage de 7 ou 42 jours. En effet, la totalité de la population des levures C est détruite après 42 jours de stockage en carbonate de calcium contrairement à la condition 7 jours de stockage qui présente une survie de 88 %. Le stockage en prémélange n'a pas impacté la viabilité des levures, cependant le temps passé en prémélange semble influencer la viabilité

des levures post-granulation. Les supports de prémélange utilisés ainsi que les farines peuvent contenir des composés moléculaires comme des acides organiques pouvant également impacter la viabilité des levures. Les taux d'hydratation des levures A, B et C étaient identiques après réalisation des prémélanges. Néanmoins, des différences notables de résistance entre A, B et C ont été montrées. Les levures A sont les moins résistantes face aux contraintes thermomécaniques du procédé de granulation et les levures C les plus résistantes.

Ces travaux ont montré les effets de différentes conditions environnementales sur la viabilité des levures A, B et C (tableau 3).

Tableau 3. Tableau de synthèse de l'étude comparative des levures A, B et C soumises à des perturbations environnementales

| Etude comparative des levures A, B et C soumises à des perturbations environnementales | |
|--|---|
| Effets des conditions de réhydratation | Pas de différence de « comportement » entre les levures A, B et C |
| Effets du stockage à HR intermédiaires | Perte de viabilité au cours du stockage légèrement plus lente pour les levures C |
| Evaluation des propriétés de résistance aux contraintes thermomécaniques | Levures A moins résistantes que levures B et levures C. Levures B moins résistantes que levures C. |

L'utilisation de diverses conditions de réhydratation n'a pas révélé de différence dans le comportement des levures A, B et C. Les levures B présentent une diminution de la viabilité plus importante après un stockage à HR basse. Il semblerait que les levures B soient plus « sensibles » à la réhydratation dans les conditions testées. La viabilité des levures A, B et C au cours du temps évolue avec des tendances similaires, néanmoins des différences sont à noter. Les levures B présentent des taux d'inactivation plus élevés en comparaison avec les levures A. Les levures A et B ont été séchées avec des barèmes identiques, cependant le séchage des levures B est plus long. La viabilité des levures C (séchées avec un barème ménageant) est la plus stable dans les conditions testées. La résistance des levures (viabilité) aux contraintes hydriques, thermiques et hydriques, rencontrées durant le procédé de granulation a également été évaluée. Suivant les supports, aliment et temps de contact, une réhydratation des levures peut avoir lieu. Les résultats ont montré que la viabilité des levures C est moins impactée par le procédé de granulation que celles des levures A et B. L'hydratation des levures et celle du prémélange impacte la viabilité des levures.

La résistance des levures face aux perturbations environnementales testées pourrait être conditionnée en partie par leurs caractéristiques initiales. Nous chercherons donc à déterminer les caractéristiques physiques et biologiques des levures A, B et C permettant d'expliquer les différences de résistance observées.

2. Etude de la composition biochimique et biologique des levures sèches actives

Les sphérules de levures A, B et C ont été produites à partir d'une même crème de levures. Les caractéristiques biologiques et biochimiques à l'entrée du séchoir sont donc identiques. L'objectif de ces expériences était d'évaluer les effets des barèmes de séchage A, B et C sur les caractéristiques biochimiques et biologiques des levures sèches produites.

2.1. Caractérisation biochimique : une différence de taux d'hydratation

Les sphérules de levures A, B et C présentent des taux d'azote et de tréhalose total similaires, expliqués par l'utilisation d'une unique crème de levures pour le séchage de ces trois produits (tableau 4). Les suivis de l'azote et du tréhalose au cours du procédé de séchage ont permis de montrer le maintien de ces valeurs tout au long du procédé. Les barèmes de séchage utilisés n'induisent pas de changement, détectable par les méthodes d'analyses utilisées, dans la composition biochimique des levures. Le taux de tréhalose total est de 23 %_{MS}. Néanmoins, les sphérules de levures A, B et C ont des a_w et des taux de matière sèche différents. A est le plus hydraté avec une a_w de 0,29 et un taux MS de 92,9 %. C est le plus sec avec une a_w et un taux de MS respectivement de 0,12 et 95,5 %. B présente un taux d'hydratation intermédiaire (a_w 0,20 ; MS 94,4 %). Les barèmes de séchage A, B et C génèrent donc des levures avec des taux d'hydratation différents.

Tableau 4. Composition biochimique des sphérules de levures A, B et C

| | Azote (% MS) | Tréhalose total (% MS) | Activité de l'eau (25 °C) | Matière sèche (%) | Teneur en eau (%) |
|---|-----------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|
| A | 6,6 | 23 | 0,29 (+/-0,01) | 92,9 (+/-0,34) | 7,1 |
| B | 6,6 | 23 | 0,20 (+/-0,05) | 94,4 (+/- 0,19) | 5,6 |
| C | 6,6 | 23 | 0,12 (+/-0,01) | 95,5 (+/- 0,22) | 4,5 |

Une étude similaire a été réalisée sur les différentes classes granulométriques des sphérules de levures. Aucune différence d'activité de l'eau et de matière sèche n'a été montrée pour un même type de sphérules. Les différentes classes granulométriques n'ont pas été séparées directement sortie séchoir. Par conséquent, elles ont eu le temps de toutes se rééquilibrer à une même activité

de l'eau, ce qui peut expliquer l'absence de différence pour l'activité de l'eau et la matière sèche entre les différentes classes granulométriques.

2.2. Caractérisation biologique : effet du séchage sur le nombre de cellules totales

Afin d'étudier l'effet des barèmes de séchage des procédés A, B et C sur le nombre de cellules totales, les populations totales ont été suivies à différentes étapes du procédé (fin de fermentation, fin des étapes préparatoires au séchage, fin du séchage). La numération des cellules totales a été réalisée par cytométrie en flux après réhydratation (protocole classique) des sphérules. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Evolution du nombre de cellules totales (exprimé par g de matière sèche) au cours des procédés de séchage A, B et C, après réhydratation classique

| | Fermentation | Etapes préparatoires au séchage | Séchage | | |
|---|--|--|--|--|---|
| | | | A | B | C |
| Nbre cellules totales (cellules/ gMS) | 2,46 ^{E10} (+/-1,57 ^{E09}) | 2,46 ^{E10} (+/-9,45 ^{E08}) | 1,96 ^{E10} (+/-3,35 ^{E09}) | 1,95 ^{E10} (+/-2,05 ^{E09}) | 1,82 ^{E10} (+/- 1,41 ^{E09}) |
| Log (Nbre cellules totales) (cellules/ gMS) | 10,39 (+/-0,03) | 10,39 (+/- 0,02) | 10,29 (+/- 0,08) | 10,29 (+/-0,05) | 10,26 (+/- 0,03) |

Les nombres de cellules totales sont identiques à la fin de la fermentation et à la fin des étapes préparatoires au séchage. Ces étapes n'induisent donc pas la perte ou la destruction de cellules. Post séchage, une baisse du nombre de cellules totales pour les trois procédés d'environ 0,1 log est à noter, soit 20% de la population. Les nombres de cellules totales à la fin des procédés de séchage A et B sont identiques. Les sphérules de levures issues du procédé C présentent une diminution de 1,3^{E09} cellules/ gMS, en comparaison avec les sphérules A et B. Les différences observées pourraient être dues à une destruction de cellules causée par l'abrasion de la biomasse induite par le procédé de séchage, par une lyse cellulaire causée par l'étape de réhydratation ou encore par la non-dissociation de petits agrégats de cellules lors de la réhydratation.

L'analyse du nombre de cellules totales contenus dans les sphérules est réalisée après tamisage et séparation des fines. L'observation des sphérules au microscope électronique à balayage révèle une très faible couche de « débris » ou de cellules lysées à la surface des sphérules (figure 31). L'épaisseur de cette couche, provoquée par l'abrasion de la biomasse au cours du procédé,

a été estimée à environ un micromètre, elle ne permet donc pas d'expliquer en totalité les différences de cellules totales observées.

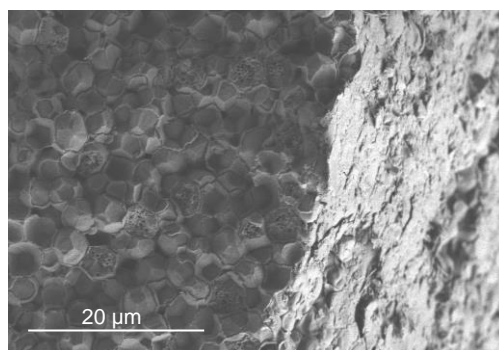


Figure 31. Observation d'une fraction de sphérule de levures à la périphérie de la sphérule au microscope électronique à balayage.

Afin de vérifier l'hypothèse d'une lyse cellulaire causée par la réhydratation, une expérience complémentaire a été réalisée (données non présentées). Les levures ont été réhydratées (protocole classique), puis observées en microscopie confocale à fluorescence après avoir été marquées au CalcoFluor (sonde fluorescente permettant de marquer la paroi). Les observations en microscopie ont révélé la présence de moins de 1 % de cellules lysées. Par conséquent, la perte de cellules observées ne peut être expliquée par cette hypothèse.

Les cellules sèches étant plus difficiles à dissocier les unes des autres, les différences observées pourraient donc être expliquées par la présence de petits agrégats cellulaires.

2.3. Caractérisation biologique : effet de la réhydratation sur les populations de levures

Aujourd'hui, les produits de type levures sèches actives sont principalement caractérisés par leur nombre de cellules cultivables. Nous avons vu lors de la synthèse bibliographique que la perte d'intégrité membranaire est décrite comme une cause majeure de la mort lors de perturbation hydrique. Par conséquent, le nombre de cellules cultivables ainsi que le pourcentage de cellules perméabilisées ont été déterminés pour A, B et C.

La réhydratation est une étape critique pour les micro-organismes séchés, le nombre de cellules cultivables est fortement dépendant des conditions de réhydratation utilisées. Les résultats présentés dans la partie 1.1 ont notamment mis en évidence un effet de la température de réhydratation ainsi qu'un effet de la cinétique de réhydratation.

Afin de pouvoir étudier les caractéristiques biologiques mais également l'effet du séchage sur les levures en minimisant celui de la réhydratation, les sphérules ont été réhydratées suivant deux protocoles de réhydratation.

- le protocole de réhydratation « classique » à 38 °C. Il est utilisé de façon systématique pour la réhydratation de micro-organismes secs. Après une phase d'optimisation du protocole, il a été utilisé pour toutes les expériences de la thèse.
- le protocole de réhydratation ménageant. Il permet une réhydratation très douce des levures grâce à l'utilisation d'une phase vapeur longue. Des travaux de l'équipe PMB, ont montré que la perméabilisation des membranes a principalement lieu durant une réhydratation rapide. L'application d'une réhydratation lente permet donc de diminuer le nombre de cellules perméabilisées (Dupont et al. 2010).

L'impact de la réhydratation versus celui du séchage a donc été estimé par la mesure de la cultivabilité des levures après réhydratation par ces deux protocoles de réhydratation (tableau 6).

Tableau 6. Comparaison des populations cultivables et perméabilisées de levures issues des sphérules A, B et C après réhydratation classique versus ménageante

| | Réhydratation classique | | | Réhydratation ménageante | |
|---|---|---|------------------------------------|---|---|
| | Nbre cellules cultivables (UFC/g MS) | Log nbre de cellules cultivables (UFC/g MS) | % de cellules perméabilisées (IP+) | Nbre cellules cultivables (UFC/g MS) | Log nbre de cellules cultivables (UFC/g MS) |
| A | 1,67 ^E 10 (+/-4,29 ^E 08) | 10,22 (+/-0,011) | 20 (+/-0,4) | 2,18 ^E 10 (+/-3,55 ^E 09) | 10,34 (+/- 0,08) |
| B | 1,20 ^E 10 (+/-3,36 ^E 09) | 10,07 (+/- 0,133) | 38 (+/- 3,7) | 2,19 ^E 10 (+/-3,38 ^E 09) | 10,34 (+/- 0,07) |
| C | 1,33 ^E 10 (+/-9,20 ^E 08) | 10,12 (+/- 0,031) | 33 (+/- 0,6) | 2,10 ^E 10 (+/-1,74 ^E 07) | 10,32 (+/- 0) |

A, B et C ont des nombres de cellules cultivables ainsi que des pourcentages de cellules perméabilisées différents avec le protocole de réhydratation classique. A, ayant la durée de séchage la plus courte, a le pourcentage de cellules perméabilisées le plus faible. Le procédé de séchage de B est identique à celui de A, néanmoins le temps de séchage est plus important. L' a_w initiale des sphérules semble impacter le nombre de cellules cultivables. En effet, plus les cellules sont sèches, plus l'impact de la réhydratation est important. Afin de confirmer cette hypothèse, une expérience complémentaire a été réalisé (données non présentées). Pour cela,

les levures C ont été hydratées à la même a_w que les levures A (elles seront nommées A') et inversement, les levures A ont été équilibrées à la même a_w que les levures C (elles seront nommées C'). Les résultats ont révélé un taux de cellules perméabilisées ainsi qu'un taux de cellules revivifiables pour les levures A' et C' identiques à ceux des levures A et C natives. Les taux de cellules perméabilisées et revivifiables sont donc fortement dépendants de l' a_w initiale. Les sphérules de levures C sont séchées suivant un barème de séchage ménageant long. Elles présentent un taux de cellules perméabilisées ainsi qu'un nombre de cellules cultivables légèrement plus faibles que les sphérules B. Le séchage ménageant permet donc une meilleure aptitude à la réhydratation avec un taux de matière sèche plus élevé.

Les données obtenues avec le protocole de réhydratation ménageant montrent que le nombre de cellules cultivables de A, B et C est identique. Par conséquent, les barèmes de séchage n'induisent pas de différence de cellules cultivables. Néanmoins, les barèmes A, B et C engendrent des teneurs en eau différentes qui révèlent des aptitudes à la réhydratation (protocole classique) se traduisant par un nombre de cellules cultivables propres à chaque produit.

Le nombre de cellules cultivables ainsi que le pourcentage de cellules perméabilisées des différentes fractions granulométriques des sphérules de levures ont également été analysées afin de déterminer de possibles différences générées par des vitesses de séchage pouvant varier en fonction du diamètre des sphérules. L'étude n'a montré aucune différence significative entre les fractions d'un même type de sphérules. Par conséquent, malgré un volume différent et donc des vitesses de transferts potentiellement différentes, les fractions tamisées présentent des caractéristiques biologiques et des aptitudes à la réhydratation similaires.

L'étude de la composition biochimique et biologique des levures A, B et C a révélé une différence majeure, en lien direct avec les barèmes de séchage appliqués : le taux d'hydratation (tableau 7). La déshydratation entraîne une diminution du nombre de cellules totales, probablement due à la difficulté de séparer les cellules agglomérées lors de la phase de réhydratation.

Tableau 7. Tableau de synthèse de l'étude comparative des compositions biochimique et biologique des levures A, B et C

| Etude de la composition biochimique et biologique des levures A, B et C | |
|---|---|
| Caractérisation biochimique | Différence majeure de taux d'hydratation A : 7% B : 5,5% C : 4,5% |
| Etude du nombre de cellules totales | Pas de différence entre les levures |
| Etude du nombre de cellules revivifiables | Différence entre levures A, B et C après réhydratation « classique » Absence de différence entre les levures A, B et C après réhydratation ménageante |

Le taux d'hydratation conditionne l'aptitude à la réhydratation des sphérules ce qui impacte le nombre de cellules cultivables des levures A, B et C. Une réhydratation réalisée dans des conditions ménageantes conduit à l'obtention d'un même taux de cellules revivifiables.

3. Etude des caractéristiques physiques des levures sèches actives

Afin de caractériser les sphérules de levures, des techniques de caractérisation des matériaux ont été utilisées. Ces méthodes ont permis la conservation de la structure native des sphérules. Ces analyses ont été réalisées dans le but d'évaluer les effets des barèmes de séchage sur les caractéristiques des sphérules de levures A, B et C.

3.1. Granulométrie des sphérules de levures

La formation des sphérules précède leur solidification. Elle dépend de l'élimination de l'eau et par conséquent des conditions de séchage. La granulométrie des populations de sphérules A, B et C a été étudiée (tableau 8). La distribution granulométrique des sphérules de

levures A, B et C est étroite ($\text{span} < 2$). Le paramètre d'uniformité reflète la déviation de taille par rapport à la médiane. Nos résultats montrent que ce paramètre est faible, par conséquent, l'écart de taille par rapport à la valeur médiane est faible. Le $D[4,3]$ correspond au diamètre moyen en volume, il est sensible à la présence de grosses particules. B possède le $D[4,3]$ le plus élevé. Cela signifie que les grosses particules sont plus représentées dans la distribution granulométrique. Ce résultat est confirmé par la répartition granulométrique avec une majorité de sphérules comprise entre 1 et 1,25 mm. Le paramètre $D[3,2]$ correspond au diamètre moyen exprimé par rapport à la surface des particules, ce paramètre est sensible à la présence de fines particules. A et C possèdent un $D[3,2]$ plus faible que B, les petites particules sont majoritairement représentées dans la distribution granulométrique en comparaison avec la distribution granulométrique de B. Notons que la répartition granulométrique de A est plus équilibrée que celles des autres produits (figure 32). Les distributions granulométriques des sphérules A, B et C présentent quelques différences. Les vitesses de séchage ainsi que les températures appliquées étant identiques pour les levures A et B et sachant que les sphérules de levures sont formées durant les premières heures du procédé, les différences observées ne semblent donc pas expliquées par les barèmes de séchage.

| | A | B | C |
|----------------------------|-------|-------|-------|
| Span | 0,507 | 0,515 | 0,654 |
| Uniformité | 0,152 | 0,152 | 0,202 |
| $D[3,2]$ (μm) | 811 | 894 | 828 |
| $D[4,3]$ (μm) | 840 | 927 | 877 |
| $Dv(10)$ (μm) | 646 | 709 | 623 |
| $Dv(50)$ (μm) | 822 | 906 | 845 |
| $Dv(90)$ (μm) | 1060 | 1180 | 1180 |

Tableau 8. Paramètres granulométriques des sphérules de levures A, B et C.

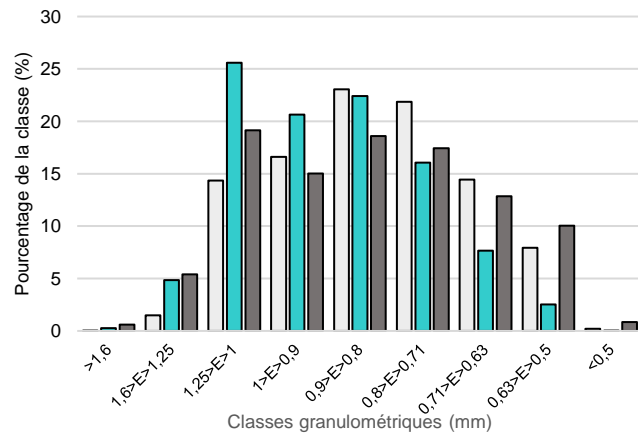


Figure 32. Répartitions des classes granulométriques des sphérules de levures A (□), B (■) et C (■).

Les paramètres de granulométrie étudiés ne révèlent pas de différence majeure entre les levures A, B et C. Néanmoins, ces analyses ont été réalisées sur une seule production de levures. Par conséquent, elles devraient être répétées afin de pouvoir confirmer ces résultats.

3.2. Surface spécifique et porosité

Le maintien des systèmes biologiques à l'état déshydraté est un paramètre clé pour leur conservation. Il va dépendre de son aptitude à la réhydratation liée à sa porosité de surface et sa surface spécifique. La surface spécifique et la porosité de surface de A, B et C sont très faibles (tableau 9). Considérons la surface d'une sphérule de diamètre moyen entièrement lisse (absence de porosité), la surface de cette dernière serait de $0,00230 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Les valeurs des surfaces spécifiques mesurées sont respectivement de 0,035, 0,038 et $0,051 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Cette différence est expliquée par la présence d'une faible porosité de surface. Pour comparaison la surface spécifique du charbon actif est comprise entre 400 et $2500 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ et celle du bois est inférieure à $0,0001 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Les valeurs de porosité intra-particulaire, c'est-à-dire le pourcentage volumique d'intrusion observé en dessous de $0,1 \mu\text{m}$, pourraient être dues à un phénomène de compression/ écrasement ou à une rupture due à la présence de pores fermés. En effet, la présence de porosité intra-particulaire mesurée aurait développé une surface spécifique plus importante. La présence de pores fermés pourrait correspondre à des inclusions gazeuses formées durant le séchage.

Tableau 9. Surfaces spécifiques et porosités de surface des sphérules de levures A, B et C

| | Surface spécifique ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) | ρ particule ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) | ρ finale ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) | Porosité totale (%) | $d_{\text{inv}} < 0,1$ (nm) | Porosité intra- particulaire (%) |
|---|--|---|--|------------------------|--------------------------------|--|
| A | $0,035 \pm 0,004$ | 1,28 | 1,38 | 27,7 | 8 | 7,0 |
| B | $0,038 \pm 0,004$ | 1,27 | 1,40 | 25,7 | 6 | 9,4 |
| C | $0,051 \pm 0,006$ | 1,31 | 1,41 | 28,3 | 5 | 7,1 |

Afin de déterminer la présence de ces inclusions gazeuses (pores fermés) au sein des sphérules, les masses volumiques théoriques des sphérules ont été estimées et comparées aux masses volumiques finales obtenues lors des analyses de porosité au mercure (tableau 10).

Tableau 10. Estimation de la présence d'inclusion au sein des sphérules A, B et C au travers d'une comparaison entre masse volumique théorique et masse volumique mesurée

| | Masse volumique théorique ($\text{g} \cdot \text{cm}^3$) | Masse volumique finale mesurée ($\text{g} \cdot \text{cm}^3$) |
|---|---|--|
| A | 1,24 | 1,38 |
| B | 1,43 | 1,40 |
| C | 1,26 | 1,41 |

Ces résultats mettent en avant la présence d'inclusion pour les sphérules A, B et C. Notons que la différence entre les valeurs des masses volumiques théoriques et mesurées des sphérules A et C sont plus importantes en comparaison avec les sphérules B. Ceci traduirait donc une présence plus importante d'inclusions dans les sphérules A et C. La méthode utilisée pour l'estimation de ces valeurs est basée sur l'exploitation des rayons médians des sphérules. Ceci pourrait donc introduire un biais dans les calculs liés à l'utilisation d'une valeur médiane. L'observation des sphérules de levures, après fracture des sphérules, au microscope électronique à balayage a confirmé la présence d'inclusions gazeuses au sein des sphérules A, B et C (figure 33).

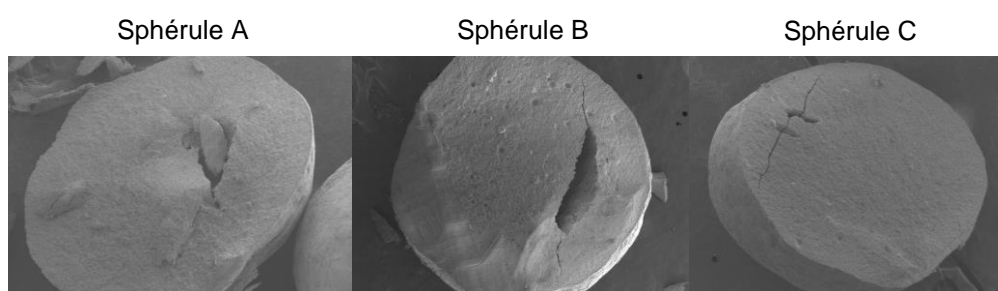


Figure 33. Observations de sphérules de levures après fracture au microscope électronique à balayage

En effet, après observation de 100 sphérules par lot, 50% des fractions observées présentaient des inclusions gazeuses. La présence d'inclusions gazeuses au sein des sphérules n'est donc pas un critère de distinction entre les levures A, B et C.

L'étude des propriétés physiques des sphérules de levures A, B et C a permis de mettre en évidence la très faible porosité du produit. Cette caractéristique permet une vitesse de réhydratation plus faible en comparaison avec d'autres types de levures sèches actives agglomérées. Néanmoins, A, B et C ne présentent pas de différences significatives pouvant résulter de l'application de barèmes de séchage différents.

Tableau 11. Tableau de synthèse de l'étude comparative des caractéristiques physiques des levures A, B et C

| Etude des caractéristiques physiques des levures A, B et C | |
|---|-------------------|
| Etude de la granulométrie | Pas de différence |
| Etude de la surface spécifique et de la porosité de surface | Pas de différence |

4. Etude de la matrice vitrifiée des levures sèches actives

Nous avons vu précédemment que les levures sèches actives étaient riches en tréhalose. Cette quantité de disaccharide importante associée à la déshydratation de la cellule et donc la concentration du cytoplasme entraîne une augmentation de la viscosité intracellulaire. L'objectif de cette partie était donc de rechercher la nature structurale des levures sèches actives. Pour cela, les propriétés thermophysiques de levures A, B et C ont été étudiées par analyse enthalpique différentielle (DSC).

4.1. Levures sèches actives : une matrice vitrifiée

Des analyses enthalpiques différentielles (DSC) ont été réalisées sur les levures A, B et C. Les thermogrammes ont révélé un changement de chaleur spécifique (c_p) associable à une transition vitreuse (figure 34) pour les levures A, B et C. Elles sont respectivement de 32,5, 44,7 et 59,5 °C pour A, B et C (valeurs T_g midpoint) (tableau 12). Les levures A, B et C présentent donc des valeurs de T_g différentes. Les levures C, ayant la teneur en eau la plus faible, possèdent la valeur de T_g la plus élevée alors que les levures A, ayant la teneur en eau la plus élevée, possèdent la valeur de T_g la plus faible.

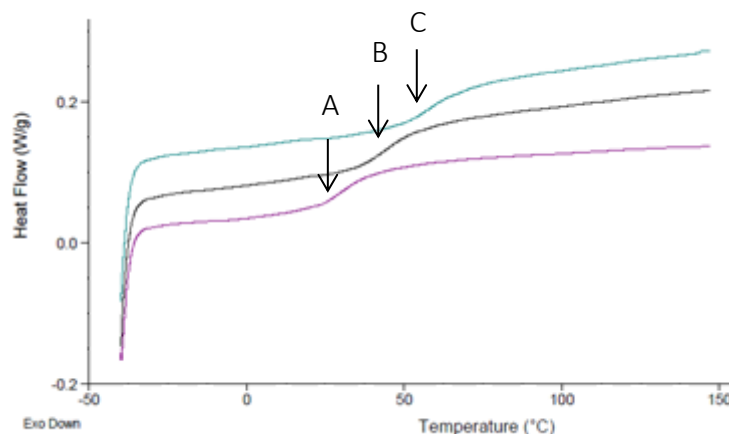


Figure 34. Superposition des thermogrammes des levures A (—), B (—) et C (—). Les flèches indiquent le phénomène de transition vitreuse (scan du deuxième chauffage).

Tableau 12. Températures de transition vitreuse des levures A, B et C (°C)

| | T_g onset (°C) | T_g midpoint (°C) | T_g endset (°C) |
|---|---------------------|------------------------|-------------------|
| A | 25 (+/- 0,1) | 32,5 (+/- 0,3) | 38,7 (+/- 0,4) |
| B | 38 | 44,7 (+/- 1,1) | 49,8 |
| C | 53,5 (+/- 0,6) | 59,5 (+/- 0,4) | 66,5 (+/- 0,3) |

La principale différence entre les levures A, B et C est leur teneur en eau, nous avons équilibré les levures B et C à une activité de l'eau équivalente à celle de la levure A afin de savoir si la T_g des levures sèches actives dépend principalement de cette variable. Les levures B et C ont été hydratées à a_w 0,33, c'est-à-dire à l' a_w équivalente de A. L'analyse par DSC a révélé des T_g identiques à celle de A (figure 35). La température de transition vitreuse est donc fonction de la teneur en eau. Par conséquent, les différences de T_g entre A, B et C sont associées à des niveaux d'hydratation finaux différents générés par des conditions de procédé spécifiques à chaque produit.

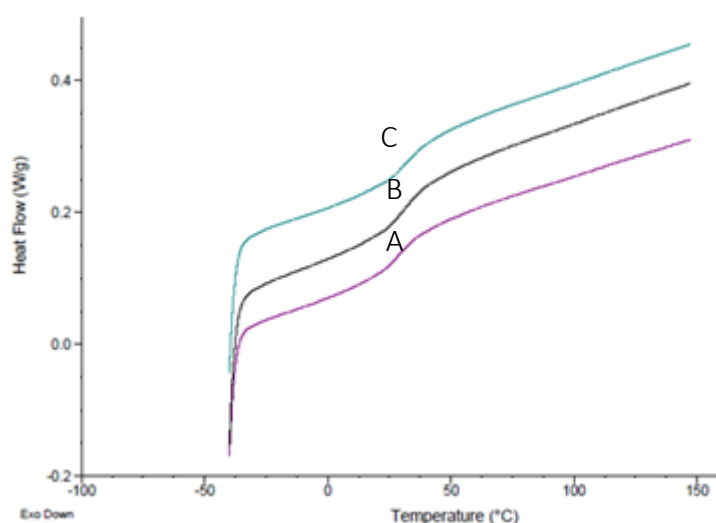


Figure 35. Superposition des thermogrammes des levures A (—), B (—) et C (—) après équilibrage à une a_w de 0,33 (scan du deuxième chauffage).

Les analyses DSC des levures équilibrées à différentes a_w ont permis la construction d'un diagramme de transition vitreuse. Il permet de déterminer l'état thermophysique de l'échantillon en fonction de la température et de l' a_w considérées (figure 36).

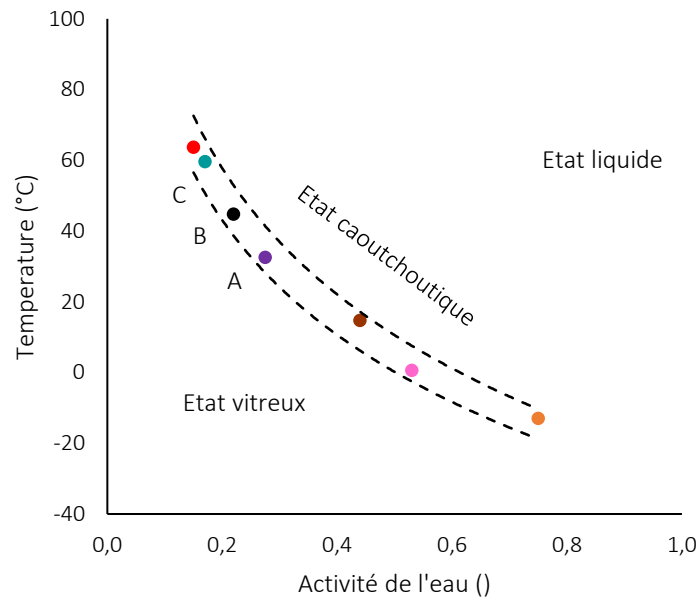


Figure 36. Diagramme de transition vitreuse. Les T_g midpoint sont projetées sur le diagramme température en fonction de l'activité de l'eau. Les courbes en pointillés représentent les limites du phénomène de transition vitreuse (onset, endset)

4.2. Etude de la relaxation enthalpique associée au vieillissement de la matrice vitrifiée des levures sèches actives

Le verre étant un état métastable, ses propriétés évoluent au cours du temps afin de tendre vers un état thermodynamique plus stable. Le vieillissement de la matrice vitreuse n'induit que des changements réversibles. Le phénomène de relaxation enthalpique correspond à un saut d'énergie lié au vieillissement de la matrice. Le niveau énergétique de la matrice diminue et tend vers l'état cristallin, sans jamais l'atteindre. L'évolution de la relaxation enthalpique au cours du temps a été étudiée sur les sphérules de levures A, B et C (figure 37).

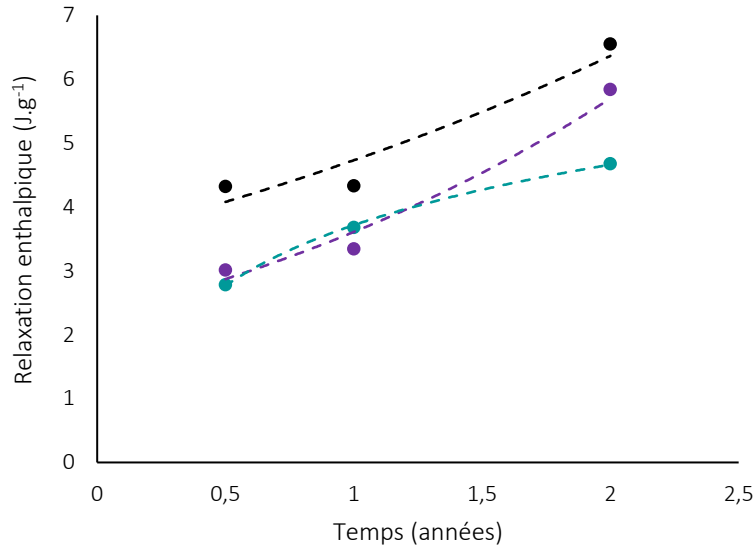


Figure 37. Evolution des relaxations enthalpiques de levures A (●), des levures B (●) et des levures C (●)

La relaxation enthalpique des levures A, B et C évolue au cours des deux années d'étude. La pente de la courbe associée à la relaxation enthalpique des levures A est plus élevée que celle des levures B et C. Les levures C présentent la pente la plus faible. Les relaxations enthalpiques des levures A et B présentent des tendances similaires, avec une forte évolution après 1 an de vieillissement. Les levures A et B sont produites avec un barème de séchage identique, ce qui peut expliquer une évolution de la matrice proche. La relaxation enthalpique traduit une redistribution de l'eau restante au sein de la matrice. L'évolution de la relaxation enthalpique des levures A semble plus rapide. Ceci peut être expliqué par la présence d'une teneur en eau résiduelle plus élevée. Ces résultats semblent donc marquer une différence dans la qualité du verre générée durant la phase de séchage.

L'étude des propriétés thermophysiques a révélé des différences entre les levures A, B et C (tableau 13).

Tableau 13. *Tableau de synthèse de l'étude comparative des propriétés thermophysiques des levures A, B et C*

| Etude des propriétés thermophysiques des levures A, B et C | |
|--|---|
| Etude de la nature structurale | Pas de différence de nature structurale Différences de T_g engendrées par les teneurs en eau différentes des levures A, B et C |
| Etude de la relaxation enthalpique | Différences de relaxation enthalpique probablement dues aux teneurs en eau différentes des levures A, B et C |

Nous avons démontré que les levures sèches actives présentaient des transitions vitreuses probablement dues à la vitrification de leur cytoplasme. Des différences de T_g sont à noter, néanmoins elles résultent des différentes teneurs en eau des levures. Les évolutions enthalpiques des levures A, B et C se révèlent légèrement différentes et semblent être également dépendante de la teneur en eau. Les propriétés thermophysiques sont donc probablement conditionnées par la teneur en eau, qui est un paramètre directement lié aux conditions de séchage appliquées.

5. Discussion

L'étude comparative de l'effet des conditions environnementales sur les levures A, B et C a permis de révéler des différences de viabilité notamment après exposition aux contraintes thermomécaniques du procédé de granulation. Les travaux de recherche présentés avaient pour objectif de déterminer les caractéristiques biologiques, biochimiques et physiques générées par les barèmes de séchage afin d'expliquer les différences de résistance des levures A, B et C observées.

- *Effets des barèmes de séchage sur les caractéristiques des levures A, B et C*

Les barèmes de séchage n'affectent pas les caractéristiques physiques des sphérules de levures. Ces dernières sont attribuées à la technologie de séchage employée. Le procédé de séchage utilisé permet notamment la formation de levures agglomérées sous forme de

sphérules, un produit très peu poreux et donc plus résistant à la réhydratation. Les étapes en amont du séchage sont communes aux procédés A, B et C. Elles permettent notamment la synthèse et l'accumulation d'un taux important de tréhalose au sein des cellules (0,23g de tréhalose/ g de MS). En comparaison, les taux de tréhalose décrits dans la littérature pour des produits similaires sont compris entre 13 et 16 % (g/g de MS) (Schebor et al. 2000). La composition en azote et tréhalose des levures A, B et C est identique pour les trois produits et ne varie pas au cours du séchage. Les contraintes rencontrées au cours du procédé n'induisent donc pas la synthèse de molécules. Néanmoins, les barèmes de séchage appliqués conduisent à des teneurs en eau et des activités de l'eau propres à chaque type de sphérules de levures. Les levures A sont les plus hydratées avec une teneur en eau de 7% et une a_w de 0,29. Les levures B sont à un niveau d'hydratation intermédiaire entre les levures A et les levures C, avec une teneur en eau de 5,5% et une a_w de 0,20. Les levures C sont les plus sèches, elles présentent une teneur en eau de 4,5% et une a_w de 0,12. Le nombre de cellules totales initial est identique pour les trois types de levures. Nous avons montré que les conditions de séchage A, B et C engendraient des populations de levures différentes, après réhydratation « classique ». Les sphérules A ont la teneur en eau et le nombre de cellules cultivables les plus élevés. Elles présentent le taux de cellules perméabilisées le plus faible. Les sphérules de levures B, séchées avec un barème identique aux sphérules A avec un temps de séchage plus long, ont le nombre de cellules cultivables le plus faible. Les sphérules C, ayant la teneur en eau la plus faible, présentent un taux de cellules cultivables plus élevé que les sphérules de levures B. Le barème de séchage C, décrit comme « ménageant », permet donc de préserver la population de levures sur des temps de séchage longs en comparaison avec un barème de séchage « classique ». La mortalité des micro-organismes secs est très souvent attribuée à l'étape de déshydratation (Cerrutti et al. 2000; Iaconelli et al. 2015). De nombreux travaux au laboratoire ont montré l'importance de l'étape de réhydratation dans la survie des micro-organismes séchés et plus précisément de la vitesse de réhydratation (Poirier et al. 1999; Simonin et al. 2007a; Dupont et al. 2010; Zoz et al. 2016). L'étude comparative d'une réhydratation classique versus ménageante a permis de mettre en évidence la mortalité cellulaire associée aux conditions de réhydratation. En effet, nous avons montré que l'étape de déshydratation n'entraîne pas directement la mort des cellules contrairement à l'étape de réhydratation. En revanche, les procédés de séchage induisent des taux d'hydratation conditionnant l'aptitude à la réhydratation des sphérules et donc les populations de levures.

La déshydratation des levures sèches actives a induit la vitrification du cytoplasme. Un verre est principalement caractérisé par sa T_g , température à laquelle se produit un changement de viscosité entraînant le passage de l'état vitreux à l'état caoutchoutique. La T_g est fonction de la teneur en eau. Par conséquent, l'augmentation du taux d'hydratation a pour conséquence de faire diminuer la T_g . Les barèmes de séchage générant des teneurs en eau caractéristique des sphérules de levures A, B et C, influe directement sur la T_g du système considéré.

- *Comment expliquer les différences de viabilité observées ?*

Les levures A, B et C ont des teneurs en eau initiales différentes. Après équilibrage à une HR identique, les viabilités des levures A, B et C peuvent être impactées de façon différente en fonction des conditions environnementales. Les levures A et B sont séchées suivant un barème identique, mais à des teneurs en eau différentes. L'évolution des viabilités des levures A et B au cours du temps sont très proches. Les levures C sont séchées suivant un barème plus ménageant et beaucoup plus long conduisant à une teneur en eau sortie procédé basse. Les levures C sont plus résistantes au stockage à HR intermédiaires. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude de la résistance aux contraintes hydriques et thermiques associées au procédé de granulation. En effet, l'étude de la résistance au procédé de granulation a permis de mettre en évidence des différences majeures de perte de viabilité, qui sont fonction de la teneur en eau initiale des sphérules de levures ainsi que celle du support utilisé. Les levures C ayant la teneur en eau initiale la plus basse exhibent des taux de survie supérieurs aux levures A et B y compris lorsque toutes les levures sont équilibrées à l' a_w de leur support. Ces résultats sont cohérents avec les études issues de la bibliographie. La teneur en eau initiale semble donc être un facteur clé dans la résistance aux perturbations environnementales. La quantité d'eau initialement présente lors de la formation de l'état vitreux pourrait impacter la qualité du verre formé. La notion de qualité de verre n'a pas de définition consensus. Nous proposons donc une définition appropriée à notre objet d'étude. Elle dépendra de trois paramètres majeurs :

- la température de transition vitreuse. Elle doit être plus élevée que la température de stockage à laquelle la matrice est conservée afin d'éviter le passage à l'état caoutchoutique.
- la nature de la matrice (vitreuse, semi-cristalline) et la relaxation enthalpique
- les défauts du verre

Ces trois paramètres sont tous en lien direct avec la quantité d'eau présente dans le verre. La qualité du verre se révèle comme un élément essentiel dans la compréhension de la résistance.

Le passage de l'état vitreux à l'état caoutchoutique, c'est-à-dire la dévitrification ici induite par la réhydratation, semble également jouer un rôle important dans la résistance des levures aux conditions environnementales.

Dans les trois conditions de stockage à HR intermédiaires, la température de stockage est supérieure à T_g . Par conséquent, les levures sont dans un état caoutchoutique. La mobilité moléculaire et la vitesse de réaction sont plus importantes dans cet état. Des réactions de dégradation ou d'oxydation peuvent alors se produire au cours du temps, pouvant expliquer l'augmentation des taux d'inactivation. Dans la littérature, la perméabilisation membranaire est décrite comme la cause majeure conduisant à la mort cellulaire lors de perturbations hydriques (Simonin et al. 2007a). Cependant, un décalage entre les taux de cellules perméabilisées et d'inactivation a été observé à une HR de 33%. Dans cette condition, les levures sont dans le phénomène de transition vitreuse et la mobilité moléculaire, bien que réduite, est possible. Des réactions de dégradation conduisant à la mort cellulaire par une voie différente de la perméabilisation seraient possibles. La cause de la mort cellulaire intervenant durant le stockage semble donc différente de celle induite par les phases de déshydratation et de réhydratation.

Les propriétés naturelles de la souche de levure utilisée ainsi que celles acquises lors des étapes préparatoires au séchage définissent les propriétés intrinsèques des levures. Les barèmes de séchage A, B et C génèrent des sphérules de levures ayant pour principale différence leur teneur en eau finale. Nos résultats ont également révélé que les levures A, B et C ont adopté une structure vitreuse et compacte lors de la phase de séchage. Les sphérules de levures sont donc un agglomérat de cellules en « inclusion » avec pour différence majeure leur teneur en eau résiduelle. Cette différence conditionnerait les qualités de verre des levures A, B et C et par conséquent leurs aptitudes à la réhydratation et leurs résistances aux contraintes environnementales.

Chapitre 2

Effets des conditions environnementales sur la viabilité des levures sèches actives

Au cours du séchage, l'état physique des levures subit une transition entre l'état liquide (suspension) et l'état solide (amorphe vitreux). Un « état intermédiaire » correspondant aux niveaux d' a_w et HR intermédiaires, appelé état caoutchoutique, caractérise cette transition. Cet état intermédiaire a été mis en évidence dans le premier chapitre lors des analyses enthalpiques différentielles des sphérules. Il correspond à un état de concentration élevée de la matière biologique aux températures et humidités, situé au-dessus de la courbe de transition vitreuse. Cet état caoutchoutique est également rencontré par les cellules lors des phases de mise en œuvre, comme le procédé de granulation ainsi qu'en situation atmosphérique humide et chaude pendant le stockage par exemple. En effet, l'état vitreux d'une matrice étant caractérisé par sa T_g , dépend du couple température/ hydratation. Dans le cas d'une réhydratation à température constante, la T_g de la matrice diminue provoquant le passage de l'état vitreux à l'état caoutchoutique. A a_w ou HR constant, une exposition à une température supérieure à T_g provoque également le passage à l'état caoutchoutique. La littérature indique une diminution de la viabilité engendrée par une augmentation de l'HR ou de la température et par conséquent par le passage à l'état caoutchoutique. L'état caoutchoutique, bien que peu étudié, est souvent décrit comme un état peu propice à la conservation cellulaire, en raison de l'augmentation de la mobilité moléculaire et des vitesses de réaction en comparaison avec l'état vitreux. Par conséquent, des réactions de dégradation peuvent survenir. Le passage temporaire à l'état caoutchoutique est inévitable lors des phases de déshydratation et de réhydratation. Il est donc important de comprendre les effets des conditions environnementales sur les levures sèches et particulièrement dans cet état. Le premier objectif de ce chapitre a donc été d'étudier les effets des conditions de dévitrification hydrique ou thermique sur la survie des levures sèches actives (*partie 1*). Cette étude a permis de démontrer la survie des levures à l'état caoutchoutique après traitements thermiques ou hydriques. Au cours de la déshydratation, la solidification de la matrice résulte du retrait de l'eau. Ceci conduit à la concentration du contenu cellulaire qui est composé de molécules constitutives et fonctionnelles des levures et de tréhalose. L'analyse bibliographique montre que dans ces conditions de séchage, le tréhalose pourrait tendre vers la cristallisation. En effet, le tréhalose peut cristalliser entièrement à partir d'une HR de 43% à température ambiante (Cardona et al. 1997). Ceci, nous a conduit à étudier l'influence du ratio composés cellulaires/ tréhalose sur la solidification de cette matrice et sur la nature de la structure solide engendrée (*partie 2*). Nos résultats démontrent que l'atteinte d'un état vitrifié se fait naturellement chez la levure en raison de la proportion composés cellulaires/ tréhalose. Au cours du séchage, le risque de cristallisation n'existe donc pas, si la levure a été correctement

enrichie en sucre. Le lien entre les étapes de préparation et la production de la biomasse ainsi que la réussite du séchage est ainsi mis en évidence.

1. Etude de la dévitrification sur la stabilité et la résistance de levures sèches actives

Cette partie correspond à un article scientifique (annexe 2, page 189) publié dans Applied Microbiology and Biotechnology, intitulé « Effect of devitrification on the stability and resistance of dried Saccharomyces cerevisiae yeast », par Pauline Ribert^{1,2}, Sébastien Dupont¹, Gaëlle Roudaut¹, Laurent Beney¹ (doi.org/10.1007/s00253-021-11451-3)

¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

² Phileo by Lesaffre, Marcq en Baroeul, France

Abstract

Yeasts are anhydrobiotes that accumulate large amounts of trehalose, which is involved in the vitrification of the cytoplasm during drastic desiccation. The effect of devitrification, which can be induced by the transient exposure of desiccated yeasts to increased humidity or elevated temperature, on the survival of yeast has been studied. A glass transition temperature (T_g)/water activity (a_w) diagram of yeast was constructed based on differential scanning calorimetry analysis. The survival rate of yeasts that were equilibrated at different relative humidities (RHs) and temperature values over their T_g range was measured. The results revealed a long period of cell preservation at an intermediate RH (55%), with 100% survival observed after 3 months, a loss of 1.24 log colony-forming units/g recorded after 1 year at 25 °C and full preservation of viability at 75 °C for 60 min and at 100 °C and 12% RH for up to 10 min. These findings led us to conclude that dried yeast can resist low or intermediate RH values and elevated temperatures in the devitrified state. Considering the thermal and humidity fluctuations occurring in the yeast environments, we hypothesized that the supercooled state, which occurs immediately above the T_g after rehydration or heating, is a protective state that is involved in the persistence of yeasts at intermediate humidity levels.

Keywords Active dry yeast · Water activity · Glass transition · Supercooled state · Devitrification · Trehalose

Key points

- *Yeast survival for months in a supercooled state is observed at room temperature.*
- *Dried yeasts survive a 10-min exposure to 100 °C in the supercooled state.*
- *The supercooled state is suitable for yeast preservation.*

1.1. Introduction

Humidity fluctuations caused by seasonal and environmental changes are continuously occurring in the environment. Some organisms, called anhydrobiotes, have adapted and are able to survive periods of intense drought via temporary suspension of the cellular metabolism, until the return of favourable conditions. The key mechanisms that explain the survival of anhydrobiotic organisms have been reported and are notably linked to the accumulation of trehalose, which is a non-reducing disaccharide with specific physico-chemical properties (Eleutherio et al. 1992; Aguilera and Karel 1997; Tapia et al. 2015; Gélinas 2019). As water is essential to the structuration of biomolecules and molecular assemblies, such as proteins and membranes, its removal causes drastic structural changes in living organisms. Therefore, desiccation without compensation of this structuring effect is often lethal (Dupont et al. 2014; Rapoport et al. 2019). Trehalose and other disaccharides can substitute for water by polar interactions with biomolecules that allow them to maintain their structure in the dried state (Carpenter and Crowe 1989; Leslie et al. 1994). This specificity led to the development of the “water replacement theory” by Crowe and collaborators (Clegg et al. 1982; Crowe et al. 1998b). As water location studies in dried proteins revealed the presence of a hydration layer at the protein/trehalose interface, a stabilizing role was proposed for trehalose based on its ability to maintain this superficial hydration layer, i.e., the “water entrapment theory” (Belton and Gil 1994). Recent studies also revealed that trehalose can mobilize a high number of water molecules compared with other sugars (Lerbret et al. 2011).

The protective role of trehalose during desiccation also lies in its glass-formation capacity. Glass exhibits the mechanical properties of solids and is distinct from crystal because of the lack of molecular order. The high glass transition temperature (T_g) of trehalose compared with sucrose and maltose (Green and Angell 1989; Crowe et al. 1998a) eases the glass-formation process in tempered environmental conditions. The vitrification process involving trehalose or other oligosaccharides occurs also at sub-zero temperatures in various organisms resistant to freezing (Wright 2001). Nevertheless, in binary systems composed of water and trehalose, glass formation is exceptional because crystal is the form that exist at thermodynamic

equilibrium. In such binary systems, glass is a metastable state that is only formed in appropriate kinetic conditions. In the cellular context, vitrification upon drying seems to occur more spontaneously because of molecular and structural crowding, both of which restrain molecular mobility and limit the molecular rearrangement involved in crystallization (Buitink and Leprince 2004).

After vitrification, the cell components are embedded in a glassy amorphous matrix where their molecular movements are slowed down by several orders of magnitude compared with a liquid solution. Thus, the kinetics of cellular chemical and enzymatic reactions are decreased (Buitink and Leprince 2004) and allow the stabilization of biological systems over long-term periods when the dry cells are kept in a glassy state (Sun et al. 1994; Crowe et al. 1998a). In association with industrial know-how, these phenomena permit the production of dry forms of yeast that can both survive for several years in desiccated conditions and restore their metabolic activity within a few minutes after devitrification by rehydration. The maintenance of the glassy state depends on the temperature and the humidity levels of the atmosphere surrounding the dry yeast. Partial humidification or heating promotes the transition from glass to a highly viscous non-crystalline state, which occurs between the T_g and the melting point and is called the supercooled state (Le Meste et al. 2002). This state is encountered when the product is equilibrated with ambient air at a relative humidity (RH) of about 30-70%. In such conditions, molecular mobility remains limited by the high intracellular concentration compared with fully hydrated conditions, but is by far higher than that observed in the glassy state. Few studies have addressed the stability of microorganisms in this concentrated, albeit non-glassy, state, although it is a significant factor in the technological or natural environments of yeasts, where severe drought remains exceptional and is generally not constant. In such conditions, trehalose is concentrated in cells and can thus exert its water-substitution role, without contributing to glass formation at this hydration level. This state might already constitute a preserving state.

The objective of this study was to test this hypothesis via the investigation of the consequences of hydric and/or thermal devitrification on yeast survival through a long- or short-term temporary excursion into the supercooled state. This study was performed using industrial active dry yeasts (ADYs), which are rich in trehalose and are optimally processed to survive in the dried state. Industrial ADYs were equilibrated at different water activity (a_w) and temperature values to control their physical states (glassy or supercooled amorphous states), which were assessed using differential scanning calorimetry (DSC). The evolution over time of

the viability of yeasts, in glassy or supercooled states, was assessed to characterize the influence of yeast physical state on cell stability.

1.2. Materiel and method

1.2.1. Biological samples

The experiments were performed using industrial ADY (called S_{0.12}) exclusively composed of yeasts cells (*Saccharomyces cerevisiae*, ActiSaf Sc47 HR+, Phileo by Lesaffre, Lesaffre, Marcq en Baroeul, France, cellular concentration of 10¹⁰ colony-forming units [CFU]/g of product). The moisture content was 4.4% of total mass and the a_w was 0.12.

1.2.2. Determination of trehalose content

Heat-shock lysis was performed on the ADY to allow the release of intracellular trehalose. After filtration, the total trehalose of the lysate was determined by high-pressure liquid chromatography. Three replicates were carried out. The trehalose content in ADY was 23% of dry matter.

1.2.3. Differential scanning calorimetry

The T_g of equilibrated samples was determined using a DSC on a Q20 calorimeter (TA Instrument, New Castle, DE, USA) under a nitrogen atmosphere at a flow rate of 25 mL·min⁻¹. The experiments were carried out using approximately 5–10 mg of sample, which was hermetically sealed in a medium-pressure aluminium pan (Tzero Pan with Tzero Hermetic Lid; TA Instruments, New Castle, DE, USA). An empty pan was used as a reference. The instrument was calibrated at 10 °C·min⁻¹ for temperature and energy with azobenzol and indium. Samples were scanned at 10 °C·min⁻¹ during both cooling and heating in the temperature range of -40–180 °C. Two heating scans were performed. The first scan was used to erase the thermal history and the possible overshoot associated with enthalpy relaxation, while the second was performed to determine the T_g . Three replicates were carried out per studied a_w condition.

1.2.4. Hydration of ADYs to intermediate a_w for long exposure in a supercooled state

To determine the effect of storage at different physical states on the viability of yeasts, ADYs were equilibrated at different a_w values. Dishes containing 1 +/- 0.003 g of sample at an a_w of 0.12 ($S_{0.12}$) were stored in hermetic boxes over saturated salt solutions of $MgCl_2$ (RH, 33%), $Mg(NO_3)_2$ (RH, 55%) and $NaCl$ (RH, 75%) at 25 °C to obtain sample at an a_w of 0.33 ($S_{0.33}$), sample at an a_w of 0.55 ($S_{0.55}$) and sample at an a_w of 0.75 ($S_{0.75}$). These a_w allowed placing the yeasts either in glassy or supercooled state (Fig. 38). The a_w of yeast was measured on 1 +/- 0.003 g of sample using the dew-point method at 25 °C, on an Aqualab Series 3TE instrument (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Viability and a_w were determined on the initial ADY and after 2 weeks, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months and 1 year of storage. Three independent technical replicates were performed for each analysis and the mean and standard deviation were calculated.

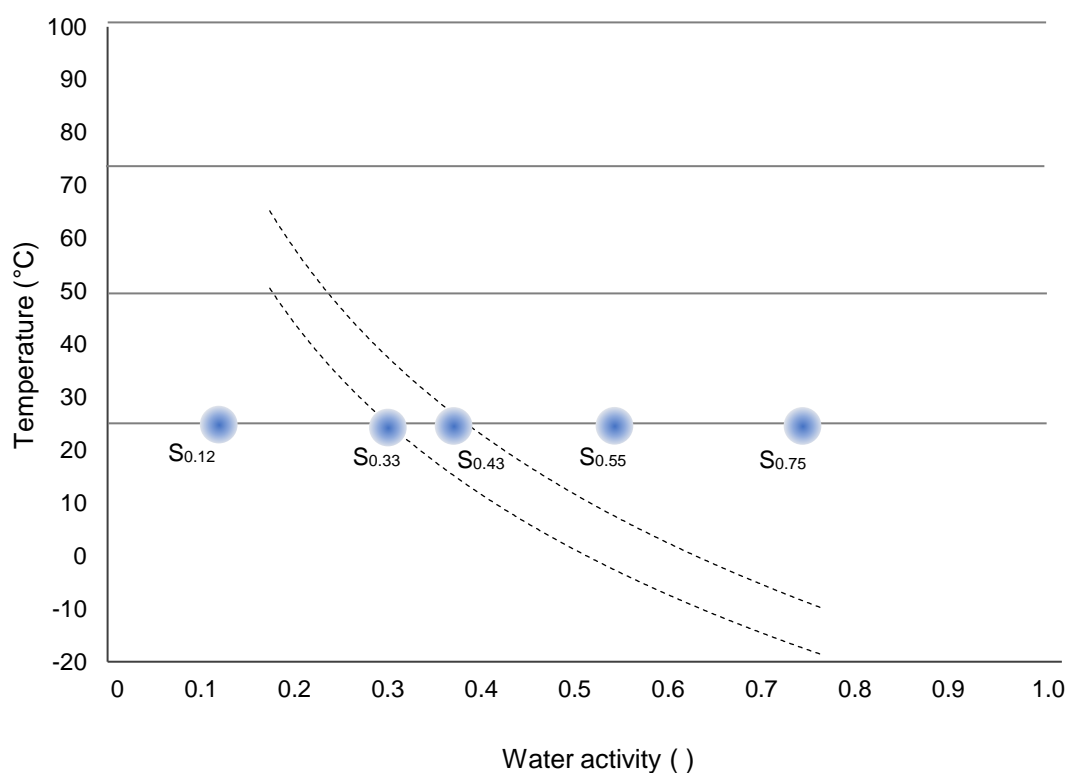


Figure 38. Position of samples $S_{0.12}$ (a_w 0.12), $S_{0.33}$ (a_w 0.33), $S_{0.43}$ (a_w 0.43), $S_{0.55}$ (a_w 0.55) and $S_{0.75}$ (a_w 0.75) at 25 °C according to the ADY phase diagram. The dashed curves represent the beginning and the end of the glass transition. The horizontal lines correspond to the processing temperatures used in this study.

1.2.5. Hydration of ADYs to intermediate a_w and thermal treatment for exposure in the supercooled state

To determine the effect of life route and physical state on thermal resistance, the ADYs were equilibrated at different a_w values. Dishes containing 1 +/- 0.003 g of sample at an a_w of 0.12 ($S_{0.12}$) were stored in hermetic boxes under oversaturated salt solutions of $MgCl_2$ (RH, 33%), K_2CO_3 (RH, 43%) and $NaCl$ (RH, 75%) at 25 °C, for 7 days to obtain sample at an a_w of 0.33 ($S_{0.33}$), sample at an a_w of 0.43 ($S_{0.43}$) and sample at an a_w of 0.75 ($S_{0.75}$). These a_w were chosen to place the samples either in the glassy or supercooled state (Fig. 1). The a_w of ADYs was measured on 1 +/-0.003 g of sample using the dew-point method at 25 °C, on an Aqualab Series 3TE instrument (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Viability and a_w were determined on the initial ADY. After the equilibrium step, yeasts were vacuum packed. Viability and a_w were evaluated to verify their impact on the viability of yeasts. Three levels of thermal treatment were applied, i.e., 50 °C, 75 °C (as a moderate heating temperature) and 100 °C (corresponding to a severe temperature), for periods of 10, 30 and 60 min. Heat treatments were carried out in a hot-water bath and three independent replicates were performed. Products were directly heat treated in their hermetic vacuum bag; thus, we considered that there was no effect on the a_w of the products.

1.2.6. Viability measurement

Viability of yeasts was assessed by measuring the ability of yeasts to reproduce and to form colonies on nutritive medium. Active dry yeasts are widely used as probiotics for animals. For this application, the main parameter for the marketing or the study of probiotics is the number of cultivable cells. Cultivability measurements were performed by a drop plate method adapted from (Thomas et al. 2015). For that, successive decimal dilutions were prepared in phosphate-buffered saline (PBS) from resuspended yeasts solutions containing 1 +/- 0.003 g of ADY sample. Subsequently, the dilutions were deposited on yeast mold (YM) medium (YM agar; BD Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). The colonies were counted after incubation for 48 h at 30 °C. The inactivation rates were expressed as $\log(N/N_0)$ according to the following equation,

$$\log N/N_0 = \log N - \log N_0$$

where N is number of CFU/g of product after the equilibrating step and thermal treatment, and N_0 is the number of CFU/g of product before the thermal treatment.

1.2.7. Determination of the decimal reduction time

The decimal reduction times (D) were determined from the viability data at each temperature. D is the time needed to reduce the population by 90% (i.e. 1 log) for the temperature considered. The kinetics of cell destruction is of order 1; therefore, the following relationship was established

$$N = N_0 \times 10^{-\frac{t}{D}}$$

where N is the number of CFU/g of product at t time, N_0 is the number of CFU/g of product at the initial time, t is the time (s) and D is the decimal reduction times (expressed in s).

1.2.8. Statistical analysis

The data from each experiment were statistically processed. The homogeneity of variance (F-test) was tested, our results revealed a homogeneous variance ($p > 0.05$). A 2-factor ANOVA and a Tukey (HSD) test ($p < 0.05$) were performed to determine whether significant differences existed between the different conditions.

1.3. Results

1.3.1. Glass transition of ADYs

This study focused on the consequences of hydric and/or thermal devitrification on industrial ADYs according to their hydration level and their life course (hydration and temperature). The structural states of the ADYs were assessed by DSC.

The ADYs were equilibrated at different RH values (12%, 33%, 43%, 55% and 75% RH). Both the first and second scans of DSC thermograms exhibited typical glass transition patterns (Fig. 39). The T_g was determined from the midpoint of the observed heat capacity change to overcome any possible overshoot associated with the enthalpy relaxation present on the thermogram of the first heating scan. The T_g onset, T_g midpoint and T_g endset were measured for each tested RH and the glass transition vs. a_w is presented in Fig. 40, where the dotted curves represent the beginning (T_g onset) and the end (T_g endset) of the phenomenon. The T_g values expectedly decreased with increasing a_w . The T_g midpoint value was 60 °C at 12% RH, whereas an increase of RH of 30% led to a T_g value of 13 °C. The phase transition diagram was used to

define the a_w /temperature conditions that induce a transition from the glassy to the supercooled state by crossing the T_g curve.

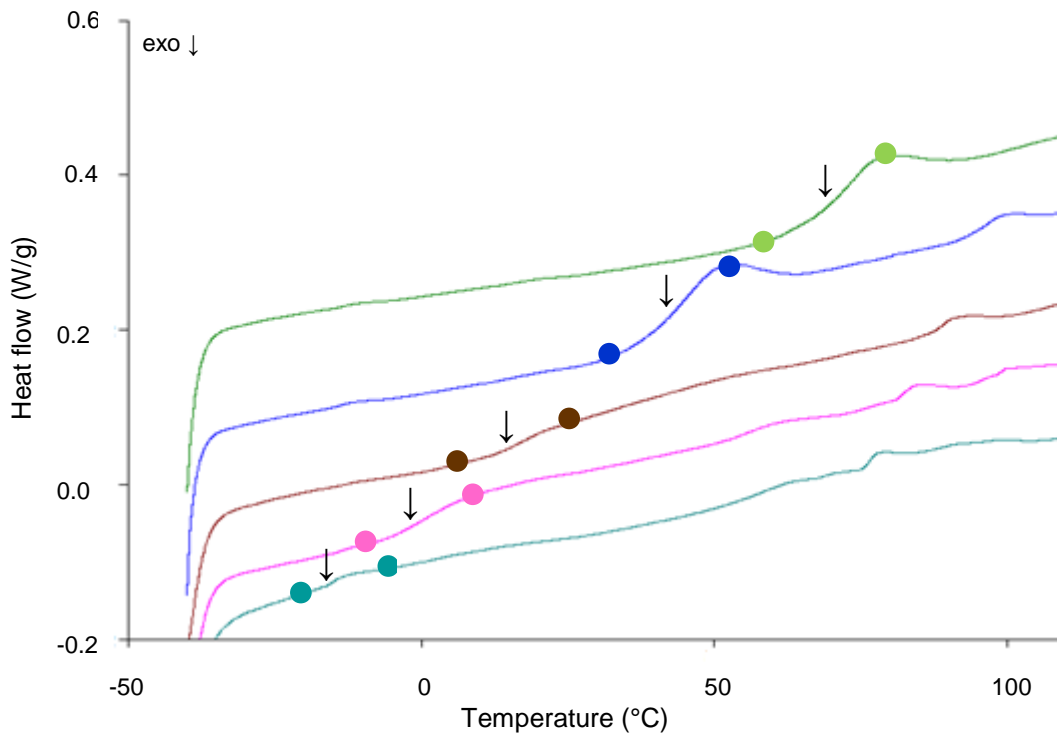


Figure 40. Glass transition of ADY hydrated at different RH values. Glass transition curves (first scan) for yeasts for 12% RH (—); 33% RH (—), 43% RH (—), 55% RH (—) and 75% RH (—). The points show the beginning (onset) and the end (endset) of the glass transition. The solid arrows show the midpoint of the glass transition.

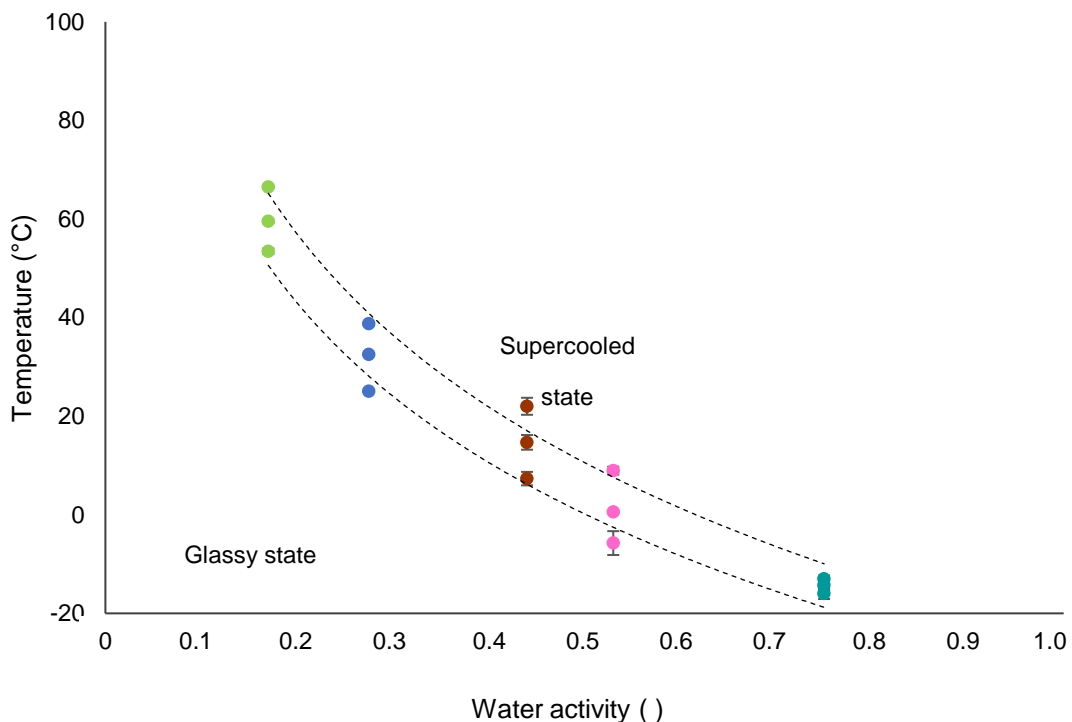


Figure 39. Glass transition of ADY hydrated at different RH values. Mean values of T_g (onset, midpoint and endset) of the hydrated samples at 12% RH (●), 33% RH (●), 43% RH (●), 55% RH (●) and 75% RH (●) on the temperature vs a_w diagram. Standard deviations are presented. The dotted curves represents the beginning and the end of the glass transition phenomenon.

1.3.2. Long exposure of hydrated yeasts to intermediate a_w in the supercooled state at room temperature: persistence of viability over time

We studied the evolution of the viability of rehydrated ADY at intermediate a_w above the T_g for 1 year. The ADYs ($S_{0.12}$) were equilibrated at different RH values, leading to samples $S_{0.33}$ (a_w , 0.33), $S_{0.55}$ (a_w , 0.55), $S_{0.75}$ (a_w , 0.75). They were stored for 1 year under controlled conditions (25 °C, no convection, in the dark).

$S_{0.12}$ was kept in the glassy state and $S_{0.33}$ was placed at the beginning of the glass transition, whereas samples $S_{0.55}$ and $S_{0.75}$ underwent devitrification and were kept in the supercooled state. The inactivation rate ($\text{Log}(N/N_0)$) at different times is shown in Fig. 41.

The viability of sample $S_{0.12}$ was stable over time with 100% survival observed even after 1 year of storage. The viability of samples $S_{0.33}$, $S_{0.55}$ and $S_{0.75}$ was maximal (100% survival) for up to 3 months for $S_{0.33}$ and $S_{0.55}$ and 2 months for sample $S_{0.75}$, and then decreased slightly over time. In fact, the population of sample $S_{0.33}$ had decreased by 0.14 log at the 6-month follow-up and by 1.24 at the 1-year follow-up. A loss of viability of 0.42 log CFU/g of product was observed after 6 months of storage for sample $S_{0.55}$. This value became equal to 2.36 log CFU/g of product after 1 year of storage for sample $S_{0.55}$. The viability of sample $S_{0.75}$ decreased more rapidly, with a loss of 0.5 log CFU/g of product after 3 months and 2.4 log CFU/g of product after 6 months of storage.

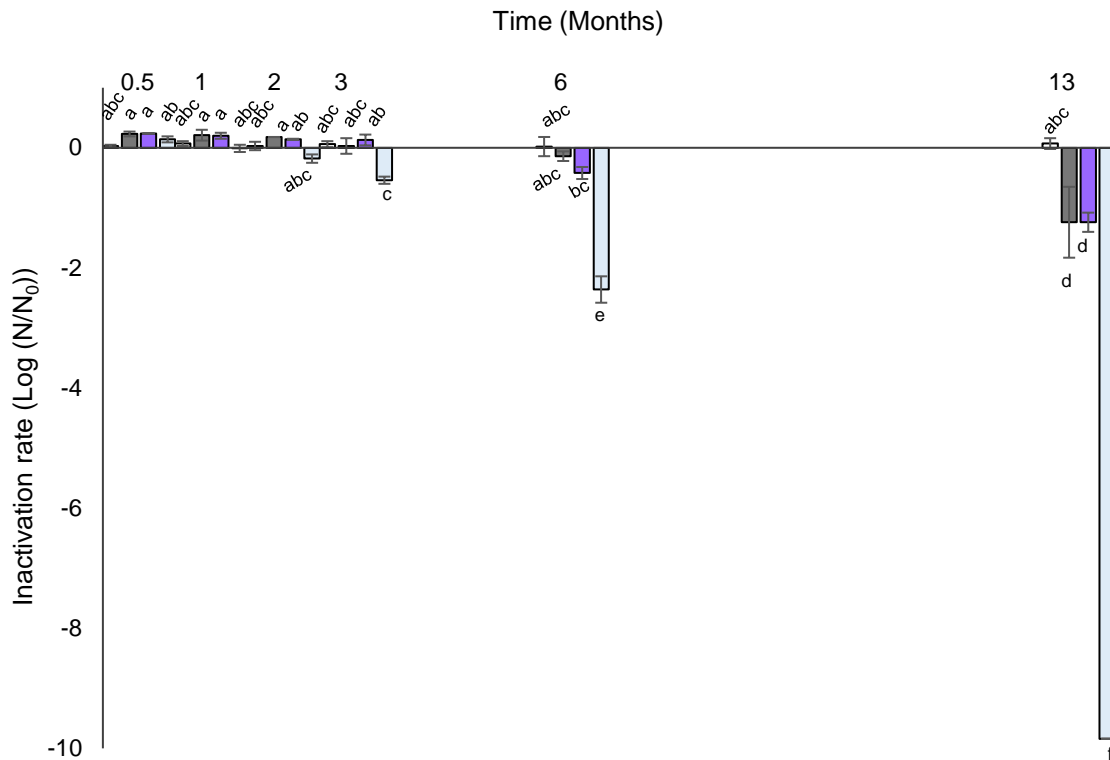


Figure 41. Long-term viability of hydrated yeast at intermediate a_w and 25 °C. Viability of samples $S_{0.12}$ (a_w , 0.12; □), $S_{0.33}$ (a_w , 0.33; ■), $S_{0.55}$ (a_w , 0.55; ■) and $S_{0.75}$ (a_w , 0.75; □) at different time points. Mean values of inactivation rate ($\text{Log}(N/N_0)$) and standard deviations are presented. The letters associated with the conditions studied indicate significant differences ($p < 0.05$) as determined by the Tukey test.

The D values which correspond to the time needed to reduce a population by 90%, were determined from these data. The D values are presented in Table 1 and plotted against a_w in Fig. 42. As the viability of sample $S_{0.12}$ did not decrease during the storage time used in our experiment, the D value was associated with long-term storage (symbolised by $\text{Max}_{\text{survival}}$). Sample $S_{0.33}$, which was stored under conditions corresponding to the onset of the glass transition, had a D value equivalent to the more hydrated sample $S_{0.55}$ (249 and 238 days respectively). The D value associated with sample $S_{0.75}$ which was hydrated to an a_w of 0.75, was 37 days. As shown in Fig. 42, the D values did not decrease linearly with increasing a_w , with maximal value detected under the T_g (sample $S_{0.12}$), a minimal value observed for the most hydrated condition (sample $S_{0.75}$) and an intermediary plateau for an a_w located at the beginning of the glass transition or slightly above (samples $S_{0.33}$ and $S_{0.55}$). These results showed that the exposure of samples at or over the glass transition decreased the survival capacity of yeast compared with to the glassy state. However, the decrease was not abrupt and involved an

f

intermediary phase that occurred in the glass transition and slightly above, where the D value corresponded to a few months.

Table 1. D values determined at 25 °C from data pertaining to the storage of samples $S_{0.12}$ (a_w , 0.12), $S_{0.33}$ (a_w , 0.33), $S_{0.55}$ (a_w , 0.55) and $S_{0.75}$ (a_w , 0.75)

| Sample | a_w | $D_{25\text{ °C}}$ (s) | $D_{25\text{ °C}}$ (day) |
|------------|-------|--------------------------------|--------------------------------|
| $S_{0.12}$ | 0.12 | $\text{Max}_{\text{survival}}$ | $\text{Max}_{\text{survival}}$ |
| $S_{0.33}$ | 0.33 | $2.15 \cdot 10^7$ | 249 |
| $S_{0.55}$ | 0.55 | $2.07 \cdot 10^7$ | 238 |
| $S_{0.75}$ | 0.75 | $3.20 \cdot 10^6$ | 37 |

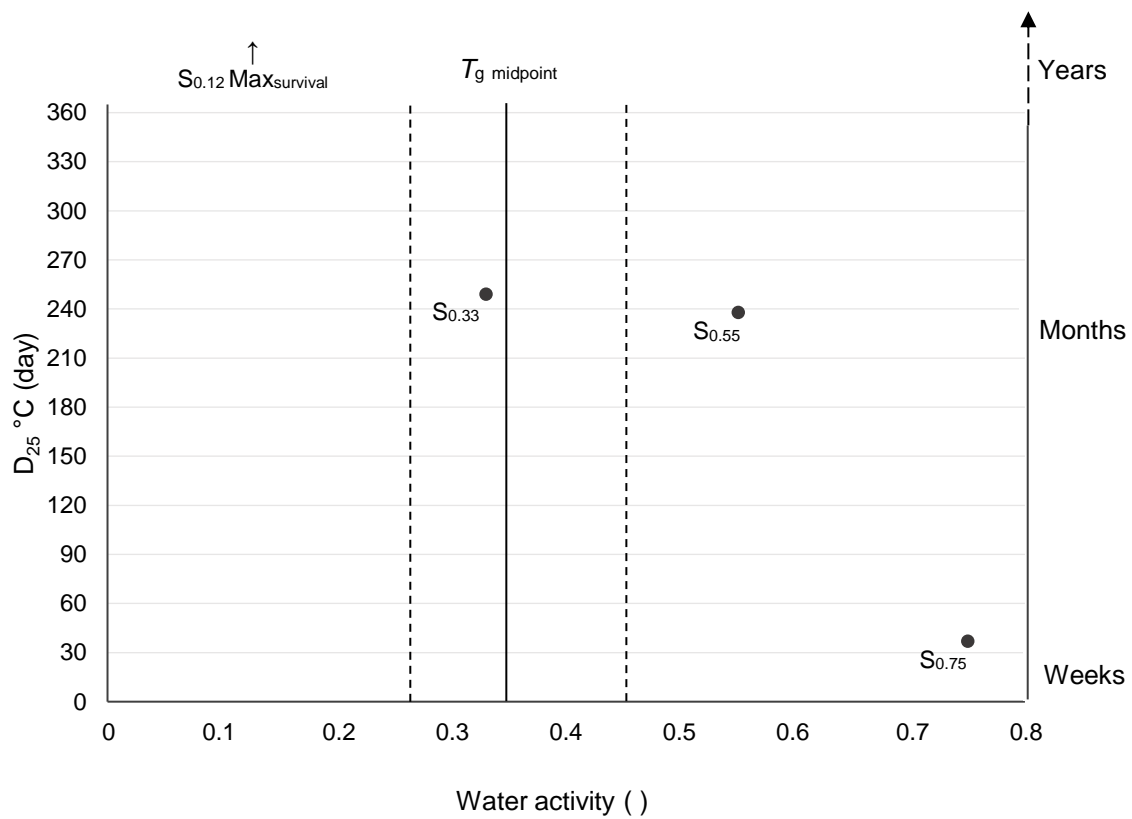


Figure 42. Effect of long storage in the supercooled state on the D value at 25 °C. D values are presented in function of the a_w . The time axis on the right corresponds to the time scales found during conservation at the different a_w . The value D point of sample at an a_w of 0.12 ($S_{0.12}$) could not be represented because the viability of sample $S_{0.12}$ did not decrease during the storage time used in our experiment; therefore, the ‘ $\text{Max}_{\text{survival}}$ ’ was used. The arrow symbolizes that the D value could be several years. The two dashed curves represent the onset and the endset of the glass transition at 25 °C, and the solid line indicates the T_g midpoint of the glass transition of ADYs at 25 °C.

1.3.3. Short transient exposure of yeasts to states ranging from the glassy to the supercooled states via thermal means: ADY resistance to high temperature

In this part of the study, ADYs were exposed to temporary heating over the T_g . The native sample $S_{0.12}$ (a_w , 0.12) was in the glassy state at 25 °C.

Heat treatments at 50 and 75 °C for 10, 30 and 60 min were then applied. The heat treatment at 50 °C did not allow sample $S_{0.12}$ to cross the phase transition curve, whereas at 75 °C, sample $S_{0.12}$ overpassed the glass transition and was therefore in the supercooled state. The loss of viability observed after heat treatment is represented in Fig. 43. The heat treatments had no effect on the viability of samples, regardless of state, even for the longest treatment time of 60 min at 50 and 75 °C. Heat treatment at 100 °C was then applied to sample A for 10, 30 and 60 min. In such conditions, the sample was in the supercooled state. The results showed a thermal resistance in sample $S_{0.12}$ of at least 10 min under the conditions tested. However, yeast viability decreased by 1.92 log CFU/g of product after 30 min of treatment. The entire population was killed after 60 min of this treatment.

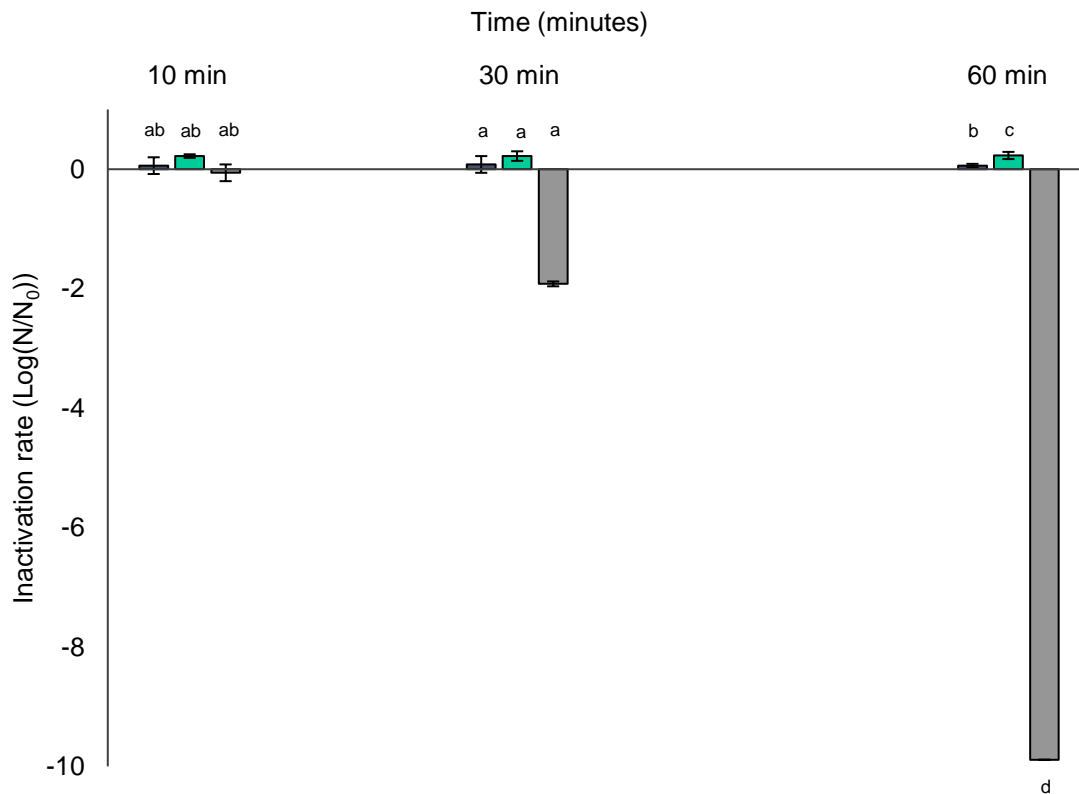
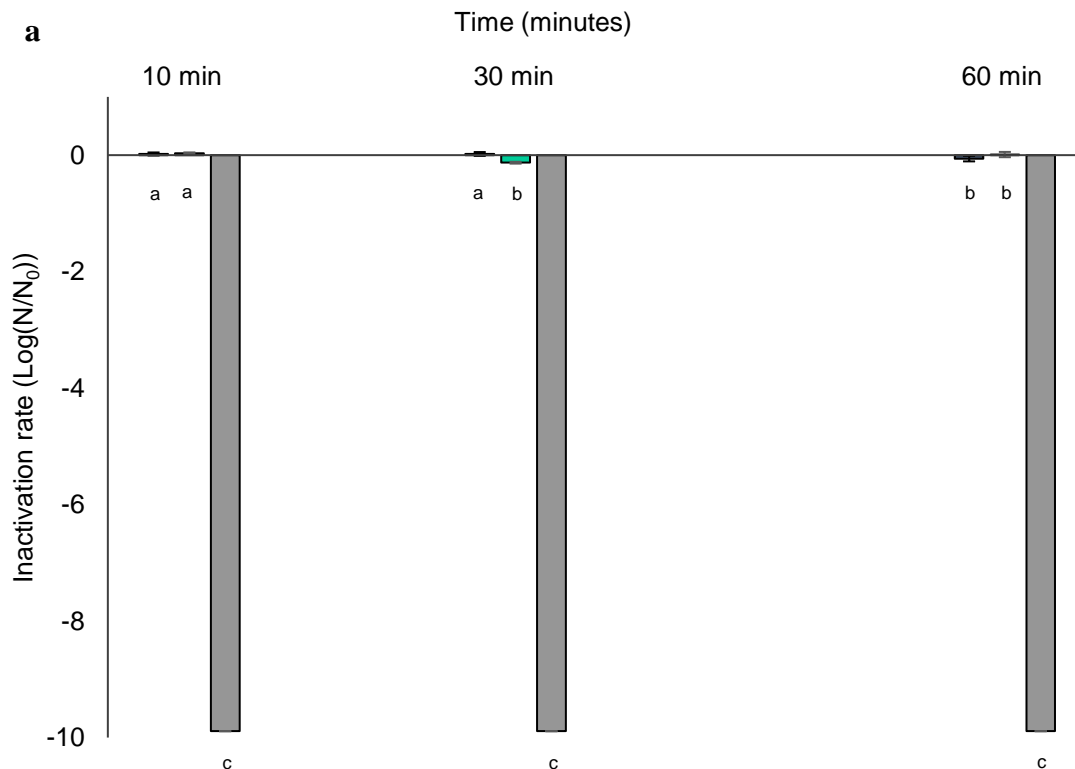


Figure 43. Effects of heat treatments on the viability of sample $S_{0.12}$ (a_w , 0.12). Heat treatments at 50 °C (■), 75 °C (■) and 100 °C (■) were applied for 10, 30 or 60 min. Mean values of inactivation rate ($\text{Log}(N/N_0)$) and standard deviations are presented. The letters associated with the conditions studied indicate significant differences ($p < 0.05$) as determined by the Tukey test.

1.3.4. Thermal resistance of yeasts hydrated at intermediate a_w in the supercooled state

In this experiment, the impact of a change from the glassy state to the supercooled state (hydric devitrification) on the thermal resistance of ADY was studied. Sample $S_{0.12}$ (a_w , 0.12) was rehydrated at intermediate a_w in order to obtain samples $S_{0.33}$ (a_w , 0.33), $S_{0.43}$ (a_w , 0.43) and $S_{0.75}$ (a_w , 0.75). Sample $S_{0.33}$ was in the beginning of the glass transition after the balancing step at 33% RH. Samples $S_{0.43}$ and $S_{0.75}$ entered in the supercooled state after the hydration step.

The effects of 10, 30 or 60 min of heat treatment at 50, 75 and 100 °C on the viability of yeasts are shown in Fig. 44. Heat treatment at 50 °C and 75 °C was not lethal to sample $S_{0.33}$, even after 60 min of treatment, whereas the 10-min heat treatment at 100 °C killed the entire population (Fig. 44a). Heat treatment at 50 °C of samples $S_{0.43}$ and $S_{0.75}$ had no effect on yeast viability, whereas heat treatment at 75 °C and 100 °C had an effect (Fig. 44b and Fig. 44c, respectively). Sample $S_{0.43}$ lost 1.76 log CFU/g of product after 60 min of treatment at 75 °C, whereas sample $S_{0.75}$ lost 3.1 log CFU/g of product after 10 min of treatment at the same temperature. No survival was detected at 100 °C for samples $S_{0.43}$ and $S_{0.75}$.



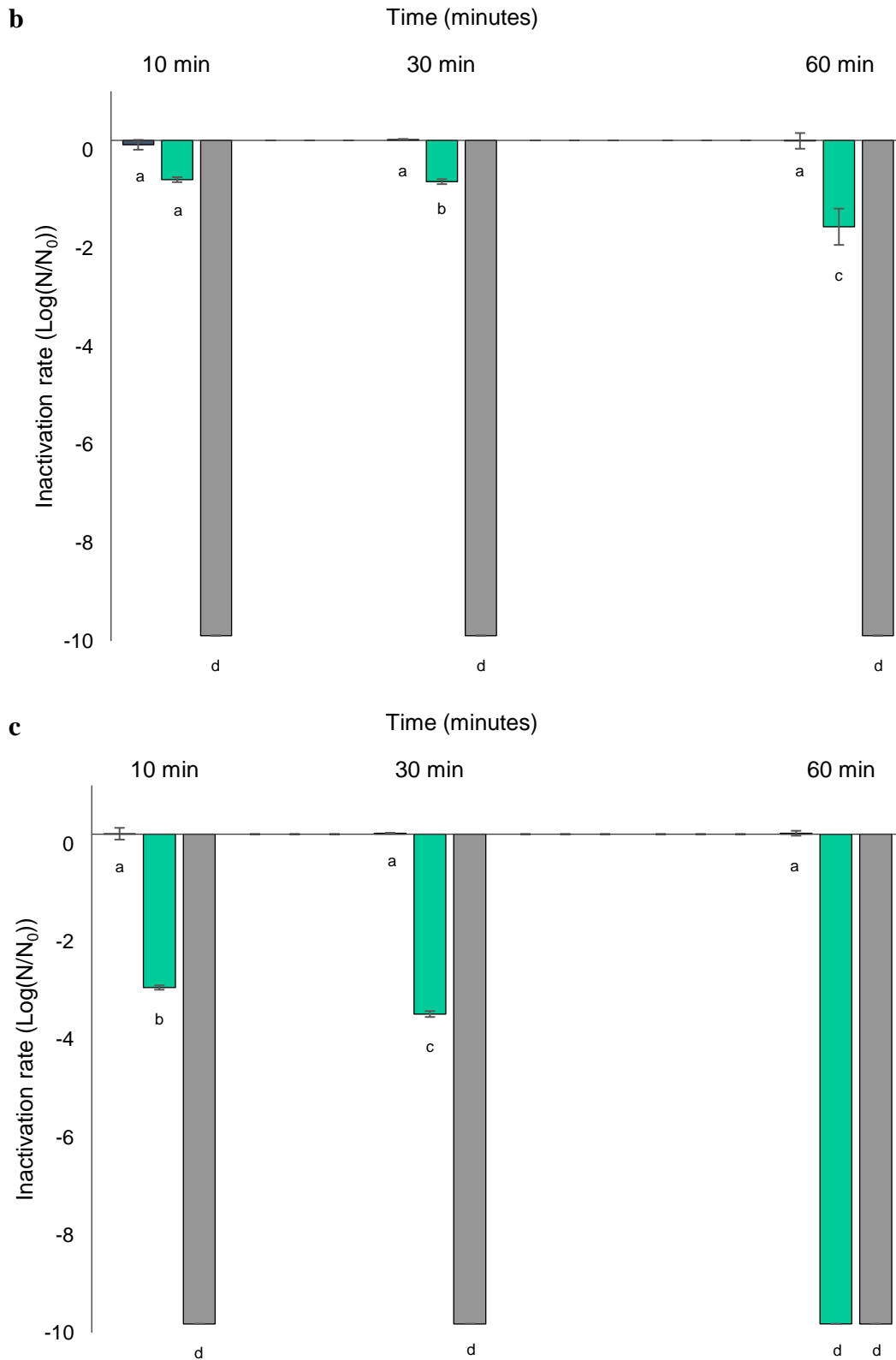


Figure 44. Effects of heat treatments on ADY balanced at different RH values. Sample $S_{0.12}$ (a_w , 0.12) was balanced at different RH values, to obtain samples $S_{0.33}$ (a_w , 0.33), $S_{0.43}$ (a_w , 0.43) and $S_{0.75}$ (a_w , 0.75). Heat treatments at 50 °C (■), 75 °C (■) and 100 °C (■) were applied for 10, 30 or 60 min. Mean values of inactivation rate ($\text{Log}(N/N_0)$) and standard deviations are presented. The letters associated with the conditions studied indicate significant differences ($p < 0.05$) as determined by the Tukey test. (a) Viability of sample $S_{0.33}$ (a_w , 0.33) after heat treatments. (b) Viability of sample $S_{0.43}$ (a_w , 0.43) after heat treatments. (c) Viability of sample $S_{0.75}$ (a_w , 0.75) after heat treatments.

The D values, which were determined from the viability data of the heat-treated samples at a_w of 0.12 ($S_{0.12}$), 0.33 ($S_{0.33}$), 0.43 ($S_{0.43}$) and 0.75 ($S_{0.75}$), are presented in Table 2. At 50 °C, the D values were associated with maximum population survival (noted $Max_{survival}$) for all samples, regardless of a_w and distance to the T_g . This value was calculated on the time scale of our experiment, where no decrease in viability was measured. Above 50 °C, the D value decreased with the increase in the distance to the glass transition curve. At 75 °C, the population of sample $S_{0.43}$ which was hydrated at an a_w of 0.43, lost 90% of its population after 39 min of treatment. The D values were projected onto the ADY glass transition diagram (Fig. 45). The results showed that the thermal resistance was correlated with the hydration level and the exposure temperature.

Table 2 D values determined at 50 °C, 75 °C and 100 °C from data pertaining to the viability of samples $S_{0.12}$ (a_w , 0.12), $S_{0.33}$ (a_w , 0.33), $S_{0.43}$ (a_w , 0.43) and $S_{0.75}$ (a_w , 0.75) after heat treatments

| Sample | a_w | Treatment at 50 °C | | Treatment at 75 °C | | Treatment at 100 °C | |
|------------|-------|------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | | $D_{50\text{ °C}}$ (s) | $D_{50\text{ °C}}$ (min) | $D_{75\text{ °C}}$ (s) | $D_{75\text{ °C}}$ (min) | $D_{100\text{ °C}}$ (s) | $D_{100\text{ °C}}$ (min) |
| $S_{0.12}$ | 0.12 | $Max_{survival}$ | $Max_{survival}$ | $Max_{survival}$ | $Max_{survival}$ | 894 | 14.9 |
| $S_{0.33}$ | 0.33 | $Max_{survival}$ | $Max_{survival}$ | $Max_{survival}$ | $Max_{survival}$ | <60 | <1 |
| $S_{0.43}$ | 0.43 | $Max_{survival}$ | $Max_{survival}$ | 2326 | 38.8 | <60 | <1 |
| $S_{0.75}$ | 0.75 | $Max_{survival}$ | $Max_{survival}$ | 392 | 6.5 | <60 | <1 |

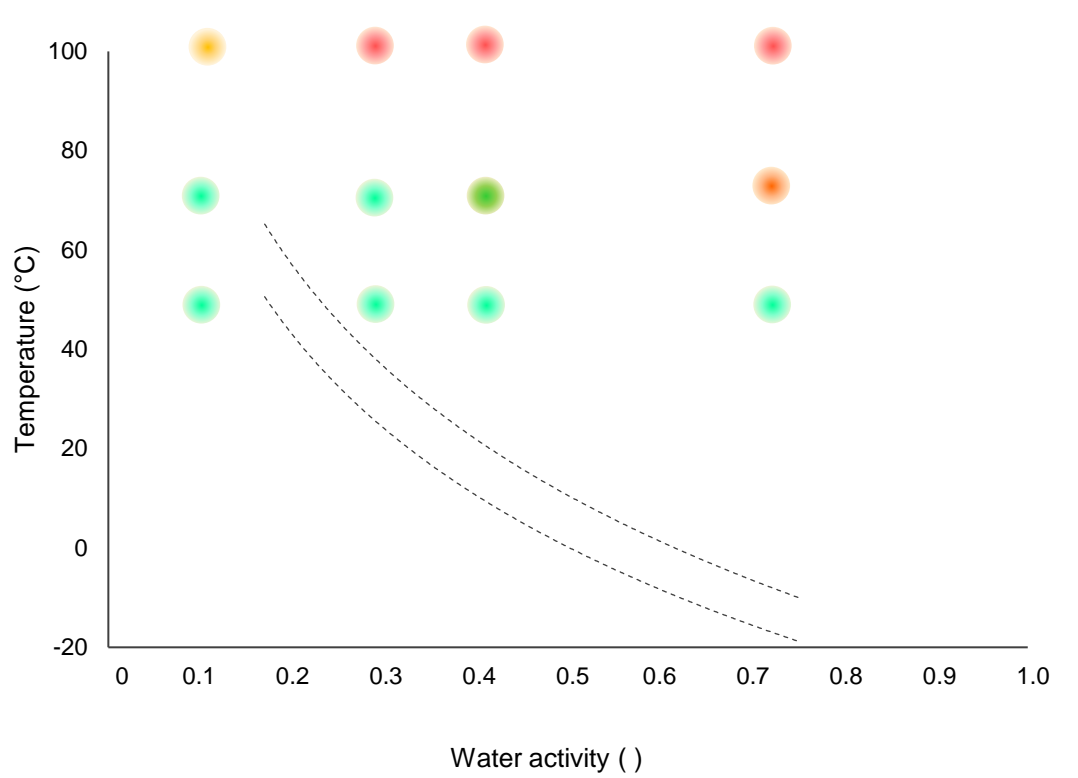


Figure 45. Effect of transient exposure in the supercooled state on D values at 50 °C, 75 °C and 100 °C. D values are projected onto glass transition curves (dashed curves represent the onset and the endset of the ADY glass transition). $D_{\text{max, survival}}$ is indicated by ●; D between 2500 and 2000 s is indicated by ●; D between 1000 and 500 s is indicated by ●; D between 500 and 60 s is indicated by ●; D less than 60 s is indicated by ●.

1.4. Discussion

Our study showed that a_w and temperature govern the physical state of ADY. Depending on the RH/temperature parameters of the environment, yeast can adopt a glassy state or a supercooled one. This phase transition could be explained by the rich trehalose content of yeast, which represents 23% of the weight of the dry matter of ADY. The representation of the T_g curves of ADY (data from this study) and trehalose (curve reconstructed from Cardona et al. (1997) and Chen et al. (2000)) on the same a_w /temperature diagram showed that they have the same shape (Fig. 46), although the T_g curve for ADY is lower than that of trehalose. This shift could be explained by the contribution of yeast components, such as proteins, and intracellular crowding, which affect glass formation (Buitink and Leprince 2004). This shift indicates that the supercooled state exists in an extended range of a_w values at the same temperature in yeast compared with trehalose.

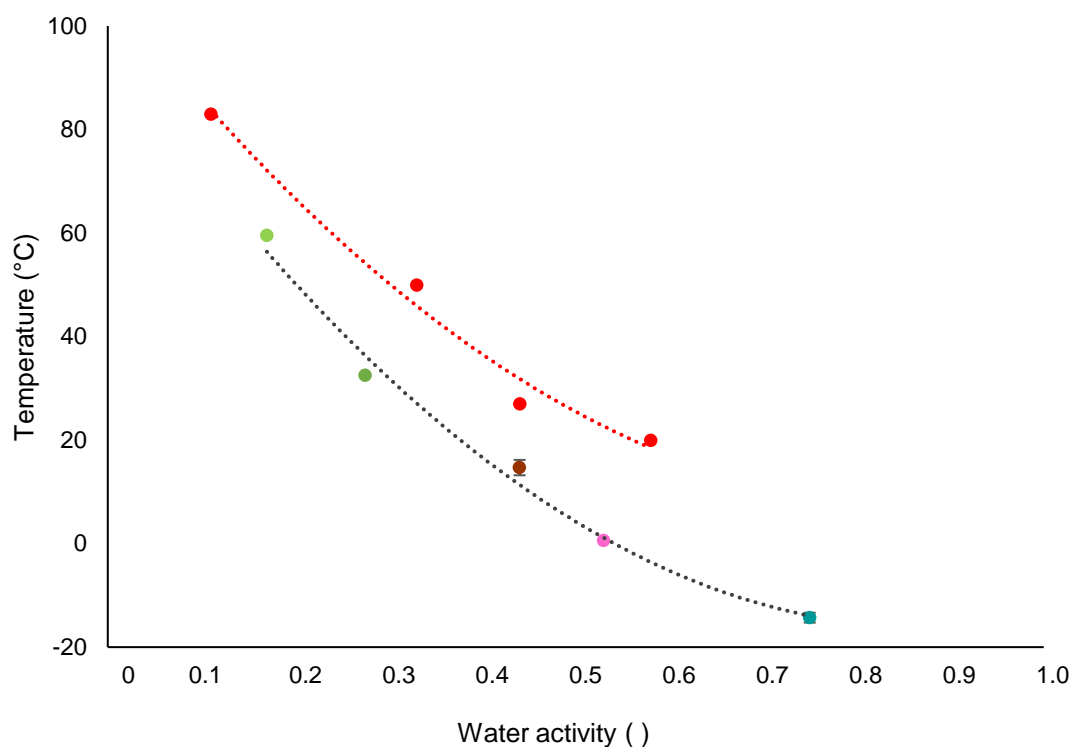


Figure 46. Superposition of the glass transition curve of ADYs on the trehalose glass transition curve. The T_g midpoint mean values of the ADYs at different RH values were projected onto the phase transition diagram. The glass transition curve of trehalose represented by the dotted red curve was reconstructed based on the combination of data extracted from (Chen et al. 2000) and (Cardona et al. 1997).

Our study revealed that the transition from the glassy state to the supercooled state by wetting or heating decreased the survival capacity of yeast compared with glassy ADYs but, did not anneal it. Accordingly, survival for a few months was observed at intermediary RH value (between 33% and 75%) in tempered conditions (25 °C) (Fig. 41), whereas ADYs survived a few minutes at a very elevated temperature (Fig. 43). These results showed that the supercooled state was compatible with yeast survival at significant time scales whereas the internal state of yeast was not vitrified. In such conditions where the internal state of yeast was not vitrified, the survival was remarkable since contact with air during experiments could promote oxidative damages.

Few studies have investigated the stability of microorganisms at intermediary RH value, at which the cells exhibit no growth and no significant metabolic activity. In such intermediary hydric conditions (from 30% to 70%), their dominant structural state is the supercooled one when the temperature is above 25 °C. In most studies, intermediary RH values are considered as being highly lethal for microorganisms. For example, the study of freeze-dried *Lactobacillus salivarius* in skimmed milk showed the total destruction of the population (9 log destruction of cells) after 12 days of storage at 59% RH and ambient temperature (Castro et al. 1995). In

another study, the survival of the pathogen *Listeria monocytogenes* was examined at various RH values and an intermediary RH (68%) was identified as the most lethal for cells (Zoz et al. 2016), with a loss of 3.2 log after 180 min of treatment. However, in these studies, no trehalose or any other sugar accumulated in the cytoplasm. In fact, *L. monocytogenes* was studied in PBS and the freeze-drying medium used for *L. salivarius* was composed of lactose, a reducing disaccharide, used as an extracellular lyoprotectant agent. The accumulation of disaccharide in *Escherichia. coli*, a drying-sensitive bacterium, was increased its survival to different drying methods by 10,000-fold compared to a wild type strain (Billi et al. 2000). Thus, the survival of ADYs at intermediary RH revealed by our study probably relies on the rich intracellular trehalose content of cells. With such trehalose content, the cell components are immersed in a highly viscous hydrated medium under a supercooled state that may explain the relative stability of cell components and the survival at intermediary RH.

In agreement with the published data (Lodato et al. 1999; Schebor et al. 2000), our results showed an increase in the thermal resistance of ADYs with desiccation and revealed that temporary exposure to heat treatment at 75 °C and 33% RH in the supercooled state was not lethal to cells, whereas this temperature was lethal to yeast in fully hydrated conditions (Fig. 6). Laroche and Gervais (2005) observed an optimal thermal resistance of *S. cerevisiae* at an a_w between 0.3 and 0.5 compared with high a_w , whereas a low thermal resistance was observed at an a_w of 0.1. Nevertheless, the heat treatment was performed at 150 °C on unsealed yeast samples. In such conditions, yeast powder may have been subjected to alteration, which was in contrast with the present study, where the maximal heating temperature of 100 °C was applied to sealed yeast samples. Moreover, Laroche and collaborators used yeasts cultivated in the laboratory, probably using a lower amount of trehalose. A decrease in the thermal resistance of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* bacteria in a lactose matrix was also observed upon wetting to intermediate humidity (Higl et al. 2007). It has been shown that a significant amount of trehalose protects cells against thermal disturbance (Hottiger et al. 1989; Van Dijck et al. 1995). The presence of a trehalose extracellular matrix (glassy or supercooled) afforded improved resistance of freeze-dried *S. cerevisiae* to a 100-min heat treatment at 70 °C, compared with other extracellular matrix compositions (Lodato et al. 1999). The fermentative activity of instant active dry yeast (with an accumulation of approximately 20% trehalose) decreased only by 0.8% in the supercooled state after heat treatment at 70 °C (Schebor et al. 2000). Therefore, the thermal resistance observed in the supercooled state is probably related to the presence of a high concentration of intracellular trehalose, which may increase the protection of macromolecules and cellular structures. Thermal disturbances induce mostly

protein denaturation and aggregation (Lepock et al. 1993), as well as a loss of membrane integrity (Gershfeld and Murayama 1988; Bischof et al. 1995), leading to cell death. The thermal resistance of microorganisms depends on their level of hydration and the associated molecular mobility (Laroche et al. 2005). It has been shown that trehalose stabilizes proteins and membranes through the formation of hydrogen bonds (Crowe et al. 1984b). Hence, the presence of trehalose molecules may reduce or even neutralize the effects of thermal perturbations. Furthermore, it has been shown that crowding caused by a high sugar concentration allows the preservation of protein folding under thermal treatment (Oshima and Kinoshita 2013; Shil et al. 2018).

In addition, the viscosity linked to the high concentration of trehalose allowed the stabilization of enzymes, such as plasma membrane H⁺ ATPase, by inhibiting protein unfolding (Sampedro and Uribe 2004). Viscosity is increased by the intermolecular interactions of sugar/sugar and sugar/water. However, the increase of the viscosity depends on the structural characteristics of the sugar. For example, water molecules diffuse twice less quickly in a concentrated trehalose solution than they do in a sucrose solution (Conrad and De Pablo 1999; Ekdawi-Sever et al. 2003). This effect is linked to the ability of trehalose to interact with molecules other than sugars because of the absence of intramolecular hydrogen bonds. In the hydrated state, the high density of macromolecules and transient protein aggregation leads to the molecular crowding of the system, which is correlated with low diffusion (Nawrocki et al. 2017). It has been shown that the high crowding, caused by the accumulation of intrinsically disordered proteins, allows the stabilization of tardigrades (Hengherr et al. 2009; Boothby et al. 2017). Moreover, the dehydration of yeast cells leads to a volume decrease of about 50% (Dupont et al. 2011), which increases the intracellular confinement of molecules. Therefore, the stability of yeast in the supercooled state could be attributed to both the high concentration of trehalose, the internal viscosity and the association between molecular confinement and significant crowding.

This work was based on the study of the consequences of thermal and/or hydric devitrification, on the viability of yeasts via a short or long excursion into the supercooled zone. Our objective was to study the stability of ADYs near the limits of the glass transition. ADYs are products that are elaborated according to industrial know-how. This dehydrated matrix is a system that is ultra-concentrated in proteins and sugars (trehalose). After production in the dried form (a_w , 0.12), ADY can be subjected to hydric and thermal fluctuations. Moreover, in most

geographical areas of the world, environmental conditions would place yeasts above the T_g in the supercooled state.

The results of this study revealed that the transition to the supercooled state is not lethal for yeasts. The trehalose that is present in the supercooled state would allow the persistence of viability at intermediate hydration levels, as well as thermal resistance in yeasts. The role of trehalose in the formation of the glassy state during dehydration is well described in the literature. However, our study highlighted the fact that trehalose may also have advantages regarding the stability of cells in the supercooled state by allowing the persistence of yeasts and in industrial applications where humidity and temperature are not stable. The supercooled state is compatible with storage of yeasts over a time scale of a few weeks to a few months. It can be reached after moderate dehydration at ambient temperature contrary to vitrification that requires drastic drying. This discovery could help to develop innovative preservation strategies with reduced energy costs and short time process. In future works, it would be interesting to study the contribution of both trehalose and different intracellular compounds to the formation of the supercooled state in a crowded context.

1.5. Acknowledgements

This work was supported by grants from the “National Association of Technical Research (ANRT)”, Phileo by Lesaffre, Lesaffre group and the project Probio+ 2019, supported by the Conseil Regional de Bourgogne Franche-Comté and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014-2020 programs.

2. Rôle des constituants cellulaires et du tréhalose dans la vitrification des levures au cours du séchage

Préambule

Le verre étant métastable, au cours du temps, il tend vers l'état cristallin par la réorganisation des molécules afin d'atteindre un état thermodynamique plus stable. La cristallisation d'une matrice peut survenir lorsque la température de conservation est d'environ 20 °C au-dessus de T_g . De plus, la cristallisation totale du tréhalose dihydrate se produit à partir d'une HR de 43 % à température ambiante (Cardona et al. 1997), ce qui correspond à l'état caoutchoutique dans le cas de nos levures (figure 47). Afin d'évaluer un possible phénomène

de cristallisation, les levures A, B et C ont été conservées dans des conditions favorisant la cristallisation (a_w 0,55 et a_w 0,75).

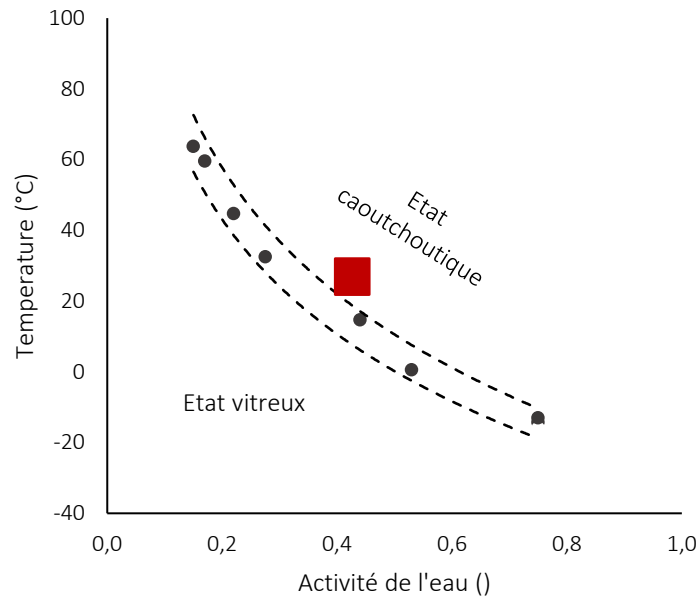


Figure 47. Diagramme de transition vitreuse des levures sèches actives. Le carré rouge représente le point hydratation/température pour laquelle le tréhalose dihydrate cristallise totalement à 25 °C.

Les thermogrammes n'ont pas révélé de pic exothermique caractéristique d'une cristallisation, au cours de l'analyse. En revanche, un pic endothermique important a été observé à 200 °C. Il pourrait correspondre à la fusion de cristaux de tréhalose monohydrate hypothétiquement présents dans la matrice (fusion du tréhalose monohydrate : 203 °C), à la dénaturation d'un composé ou encore à l'évaporation de l'eau à la suite de l'ouverture de la capsule de DSC. Afin de s'orienter vers une de ces hypothèses, des analyses de diffraction en rayons X ont été conduites. Les diffractogrammes ne présentaient pas de pic caractéristique de la présence de cristaux. Les résultats sont donc en faveur de l'absence de cristallisation de la matrice après deux ans de stockage dans des conditions la favorisant. Par conséquent, le pic endothermique observé sur les thermogrammes n'est pas attribué à la fusion de cristaux de tréhalose mais à la dénaturation d'un composé ou à l'évaporation de l'eau contenue dans la matrice à la suite de l'ouverture de la capsule.

L'inhibition de la cristallisation du tréhalose dihydrate par l'ajout d'extrait de levures a été rapportée pour des HR supérieures à 43% (Espinosa et al. 2006). Néanmoins, un ajout de protéines dans des proportions similaires n'induit pas l'inhibition de la cristallisation. Tous ces faits nous ont conduit à étudier l'influence du ratio composés cellulaires/ tréhalose sur la solidification de la matrice et sur la nature de la structure solide engendrée

Cette partie a fait l'objet d'un article scientifique (short communication), en préparation, intitulé « **Impact of molecular crowding on crystallization inhibition and vitrification of trehalose** », par Pauline Ribert^{1,2}, Sébastien Dupont¹, Gaëlle Roudaut¹, Laurent Beney¹

¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

² Phileo by Lesaffre, Marcq en Baroeul, France

Abstract

Anhydrobiotics, like yeast, accumulate a large quantity of trehalose, allowing the vitrification of their cytoplasm during dehydration. Contrary to a trehalose solution, yeasts vitrify spontaneously, without risk of crystallization, during a drying process. In this context, the influence of the ratio of cellular compounds to trehalose on the solid structure generated was studied. Our results show the non-crystallization of trehalose with a ratio of 80% proteins / 20% trehalose. This ratio, close to the cellular context, puts forward an optimal formulation in favor of the vitrification of the matrix.

Keywords Trehalose · Yeast components · Molecular crowding · Crystallisation · Glassy state

Key points

- *The increase of protein ratio allows the trehalose crystallization inhibition*
- *Dehydration leads to the formation of a protein/ trehalose ratio in favor of cell vitrification*

2.1.1. Introduction

Anhydrobiotes can survive intense water disturbances allowing them to temporarily and reversibly suspend their metabolism until favourable conditions return. *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibits this ability thanks to constitutive and inducible cellular mechanisms (Dupont et al. 2014; Rapoport et al. 2019). One of these main mechanisms is the accumulation of large quantities of trehalose, representing more than 20% of their dry weight (Aguilera and Karel 1997). Trehalose, a non-reducing disaccharide, is known to be involved in the stabilization of macromolecules through key mechanisms, such as the water replacement (Clegg et al. 1982; Carpenter and Crowe 1989; Leslie et al. 1994; Crowe et al. 1998a), water entrapment (Belton and Gil 1994) and mechanical entrapment (cytoplasm vitrification)

(Sampedro and Uribe 2004). Trehalose is also involved in glass formation at low temperatures and/or at low hydration level. Compared to other disaccharides such as sucrose or maltose, trehalose exhibits the highest glass transition temperatures, which could explain its ability to stabilize biomolecules (Green and Angell 1989; Crowe et al. 1998a). Glass is a metastable super-viscous liquid with solid like mechanical properties. It is associated with a glass transition temperature (T_g) at which a change in viscosity from glassy to supercooled occurs. This transition is induced by an increase of temperature or hydration. In this case, the molecular mobility increases allowing the molecular reorganization of the system and the achievement of the thermodynamic equilibrium state. A binary water/trehalose solution will spontaneously and completely crystallize above 43% relative humidity (RH) at room temperature (Cardona et al. 1997). Below 43% RH, crystallization of trehalose is partial. The study of trehalose-rich instantaneous active dry yeast (15% w/w dry matter) revealed the absence of crystallization in this multicomponent matrix (Schebor et al. 2000). The work of Espinosa and co-workers (Espinosa et al. 2006) showed that the addition of yeast extract to a trehalose solution (50% w/w) induced the inhibition of trehalose dihydrate crystallization, in contrast to the addition of protein (50% w/w) (Espinosa et al. 2006). The literature has thus revealed the absence of crystallization of trehalose dihydrate under certain conditions, but no mechanistic hypothesis has been proposed.

The objective of this study was to investigate the influence of the amount of yeast protein on trehalose vitrification in simplified models representing the cellular context of active dry yeast. For this reason, the dry matter of the cytoplasmic content was considered according to the major constituents, i.e. peptides/proteins and trehalose. Ratios close to dry matter in the cellular context were studied with the condition 80% yeast components/ 20% trehalose. The formulations were dried and equilibrated at different RH before being studied by differential scanning calorimetry. The crystallinity rate of the formulations equilibrated at different RH was determined. These experiments clarified the effect of proteins and the role of molecular crowding on the inhibition of trehalose dihydrate crystallization.

2.1.2. Material and methods

2.1.2.1. Biological materials

Trehalose (Trehalose dihydrate from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Aldrich) and yeast protein (PaloPro from *Saccharomyces cerevisiae*, Biospringer, France) were used for the realization of the different formulations.

2.1.2.2. Formulations preparation

Yeast protein/ trehalose formulations were performed at ratios of 100/0 (w/w); 50/50 (w/w); 80/20 (w/w); 0/100 (w/w). After cooling for two hours on ice, the systems were dried by vacuum drying at room temperature (hold for 2 hours at 2 °C, ramp 1 °C.min⁻¹, hold for 2 hours at 10 °C, ramp 1 °C.min⁻¹, hold for 2 hours at 20 °C, ramp 1 °C.min⁻¹, hold for 2 hours at 30°C, ramp 1 °C.min⁻¹, hold for 2 hours at 40°C, constant pressure at 1.65mbar) Samples were exposed over P₂O₅ (RH close to 0%), lithium chloride (RH 12%), magnesium nitrate (RH 58%), sodium chloride (RH 75%) during 12 days.

2.1.2.3. Determination of water activity

In order to verify that the different formulations had reached equilibrium with their environment, the water activity (a_w) of each formulation was determined after 12 days of equilibrium. a_w of dried formulations was measured by dew point method at 25 °C, with an Aqualab Series 3TE (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA).

2.1.2.4. Differential scanning calorimetry

The glass transition, exothermal peaks and endothermal peaks of equilibrated formulations was studied using a differential scanning calorimetry (DSC), using Q20 calorimeter (TA instrument, Inc., New Castle, DE, United states) under a nitrogen atmosphere at a flow rate of 25 mL.min⁻¹. Experiments were carried out with approximately 5-10 mg of sample hermetically sealed in a medium-pressure aluminum pan (Tzero pan with Tzero Hermetic Lid; TA Instruments, New Castle, DE, USA). An empty pan was used as a reference. The instrument was calibrated at 10 °C.min⁻¹ for temperature and energy with azobenzol and indium. Samples were scanned at

10 °C.min⁻¹ for both cooling and heating in the temperature range of -40 to 180 °C. Exothermic and endothermic phenomena were studied at first heating.

2.1.2.5. Determination of the rate of crystallization

The enthalpy of the studied mixture, expressed in J/g_{trehalose}, was determined for a considered endothermic peak. The enthalpy of the crystallized trehalose dihydrate was also determined. The rate of crystallization was calculated by the following equation

$$\text{Crystallization rate} = \left(\frac{H_{mix}}{H_{trehalose\ dihydrate}} \right) \times 100$$

with crystallization rate (%); H_{mix} (J/ g_{trehalose}); H_{trehalose dihydrate} (J/g_{trehalose})

2.1.3. Results

The glass transition of active yeasts, as well as that of the yeast proteins and the yeast protein/trehalose formulations were studied by DSC (Fig. 48). Active dry yeasts showed a glass transition (Fig. 48 a) while yeast proteins alone did not (Fig. 48b). So, the addition of trehalose to the formulation allows vitrification of the system (Fig. 48c).

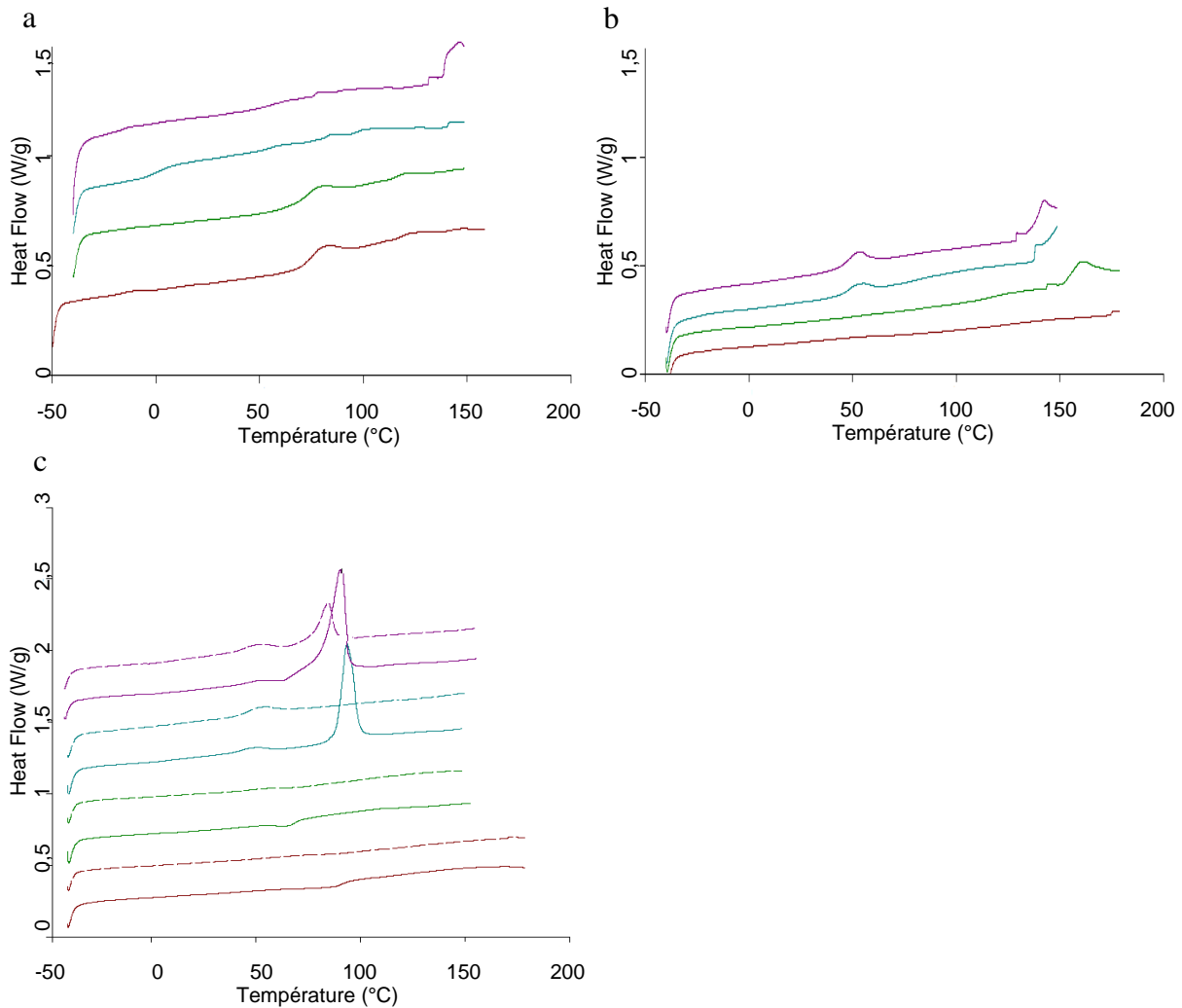


Figure 48. Thermograms of different formulations after storage at different RH. Samples equilibrated at 0% RH were in brown; samples equilibrated at 12% RH were in green; samples equilibrated at 58% RH were in blue and samples equilibrated at 75% RH were in purple. (a) Active dry yeast (b) Yeast protein/ water (c) Yeast protein/ trehalose ratio (50/50) were symbolized by solid curves; Yeast protein/ trehalose ratio (80/20) were symbolized by short dash curves.

DSC data were used to construct the glass transition curves for yeast and the yeast protein/ trehalose formulation shown in Fig. 48. The glass transition curve of trehalose (from (Chen et al. 2000)) and the saturation curve of trehalose (from (Miller et al. 1997)) were also added to Fig. 49. The glass transition curve of the yeast protein/trehalose formulation and that of the yeasts are very close (Fig. 49). Under the relative humidity (RH) conditions tested, the trehalose present in the formulation could crystallize (supersaturated solution zone). The molecular ensemble of cell content and trehalose in optimal quantity forms a system that undergoes a gradual transition from the liquid to the glassy state without risk of crystallization. The concentrated state preceding the glassy state is referred to as the super-cooled state, in reference to trehalose which usually crystallizes in binary solution under these conditions.

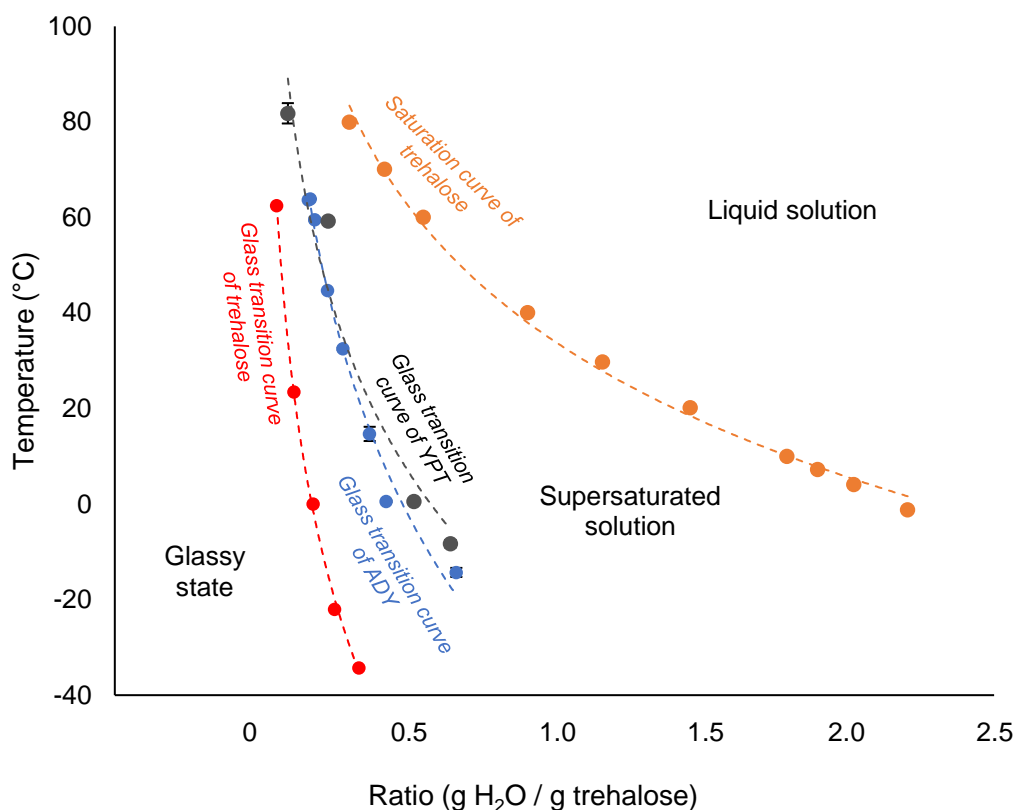


Figure 49. Phase diagram of trehalose. The saturation data for trehalose was taken from (Miller et al. 1997) (shown in orange). The glass transition data for trehalose (shown in red) was taken from (Chen et al. 2000). These two curves allow the definition of the change of state zones. The data shown in blue and dark grey correspond respectively to the phase transition curves for active dry yeast and the yeast protein/trehalose (YPT) formulation. The glass transition temperatures were determined after DSC analysis of the equilibrated samples at different RH.

The crystal rates of yeast protein/trehalose formulations at (100/0); (50/50); (80/20) and (0/100) ratios at different RH were determined. The presence of proteins in an optimal ratio reduces or inhibits the crystallization of trehalose dihydrate. For the hydrated system at 55 and 75% RH, crystallization was total, whereas for systems kept under P₂O₅ and 12% RH the crystallization is partial (Fig. 50). The yeast protein/trehalose samples with a ratio of 50/50 (w/w) and 80/20 (w/w) equilibrated under P₂O₅ or 12% RH did not show any endothermic peak near 100 °C. Yeast protein/trehalose samples at ratio of 50/50 (w/w) equilibrated to 55% and 75% RH revealed an endothermic peak at 100 °C corresponding to melting of trehalose dihydrate. The associated crystallization rate was 21.6% at 55% RH and 35.4% at 75% RH. Note the absence of crystallization with the yeast protein/trehalose sample at ratio of 80/20 (w/w) at 55% RH and the presence of a crystallinity rate of 8.5% at 75% RH. Crystallization of trehalose dihydrate did not occur at 55% RH for a higher protein concentration. Furthermore, the increase in the amount of proteins also decreases the crystallinity rate at 75% RH.

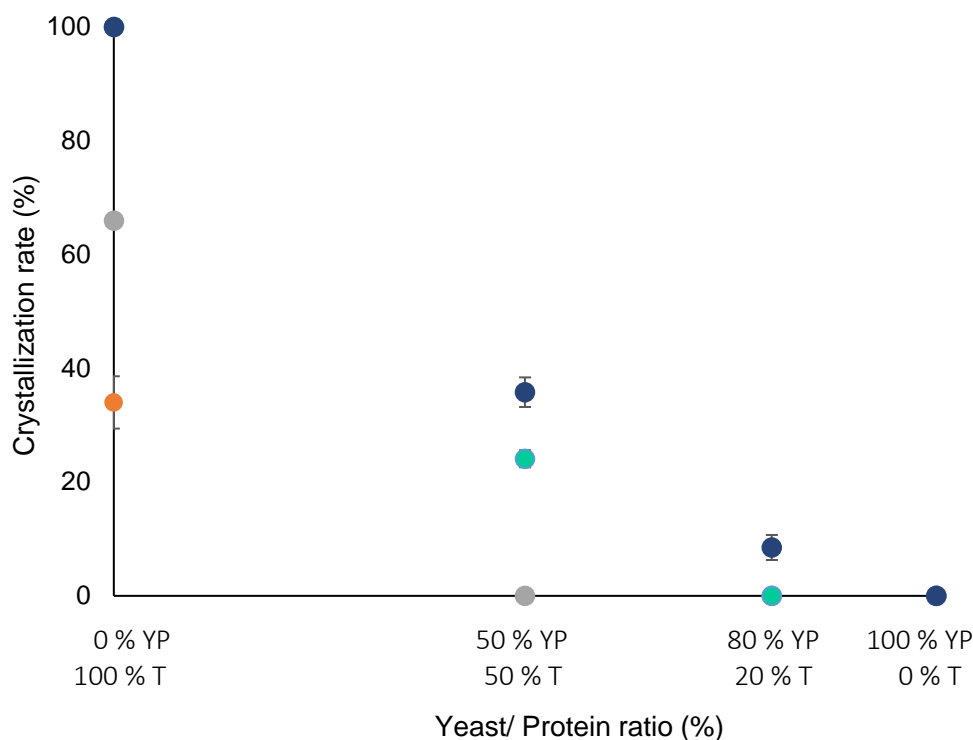


Figure 50. Diagram of the crystal rate in function of the yeast protein/ trehalose ratio and the RH. Formulations are equilibrated under P₂O₅ (●) or at 11%RH (●); 55%RH (●); 75%RH (●) at 25 °C, before being analyzed by DSC.

2.1.4. Discussion

The objective of this study was to investigate the effect of the amount of yeast protein fractions on the vitrification of trehalose dihydrate. A solution of trehalose dihydrate would spontaneously crystallize (Fig. 51a). The addition of proteins to the formulation inhibits the crystallization of trehalose dihydrate (Fig.51b and Fig. 51c). The study by Espinosa and co-workers (2000) revealed the presence of an endothermic peak corresponding to the melting of the dihydrate crystals in the protein/trehalose formulation (50/50 (w/w)). This study also showed that this crystallization was not complete at 55 and 75% RH. Our results confirmed these observations. On the other hand, our results showed that an increase of the protein/ trehalose ratio to 80/20 (w/w), a ratio close to the yeast content, induced the decrease of the crystallization rate for the condition at 75% RH and its inhibition for the condition at 55% RH. The increase in the molecular crowding could therefore favor the vitrification of the system and inhibit the crystallization of trehalose dihydrate. Indeed, the addition of macromolecules such as proteins in the trehalose solution disturbed the organization of the molecules in crystalline structure, which consequently favors the amorphous structure. The study of IADY yeasts does

not report any crystallization of the cytoplasm despite the conditions used to favor it (Schebor et al. 2000). Indeed, in a cellular context, vitrification occurs spontaneously, thanks to the presence of a complex crowding reducing molecular mobility (Buitink and Leprince 2004). Our results support this argument. During the drying of active dry yeast, the elimination of the most part of water molecules leads to a highly concentrated system composed of macromolecules, trehalose, traces of water and low molecular weight compounds. The dehydration, resulting in the concentration of cytoplasmic elements related to the reduction of cell volume by osmosis, induces the increase of molecular crowding. The combination of these biophysical events coupled with an optimal protein/trehalose ratio therefore leads to the inhibition of trehalose dihydrate crystallization (Fig. 51d). Espinosa et al. attribute the inhibition of trehalose dihydrate crystallization to the composition of the matrix. Our hypotheses point to the effect of crowding on the inhibition of crystallization. Cell crowding thus allows a gradual transition between the liquid and glassy states.

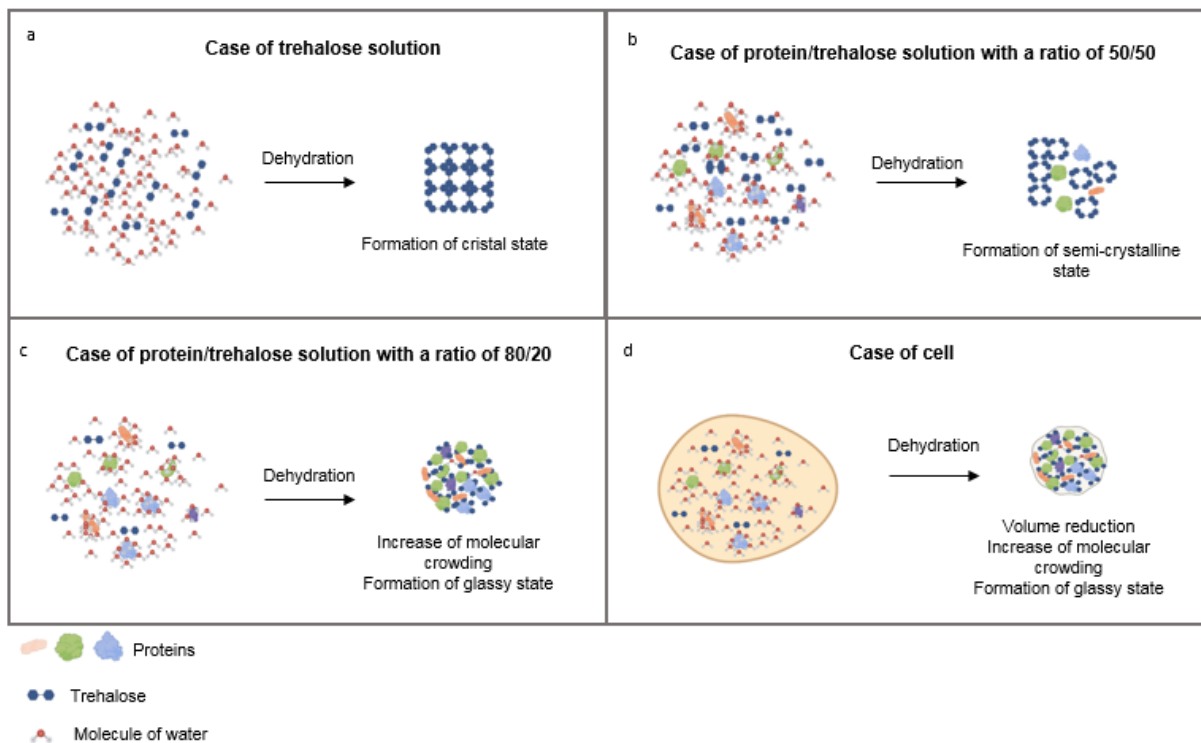


Figure 51. Consequences of dehydration in function of system (a) case of trehalose solution (b) case of protein/trehalose solution with a ratio of 50/50 (c) case of protein/trehalose solution with a ratio of 80/20 (d) case of cell.

Upon drying yeast are subjected to a transition from liquid to solid medium. This study demonstrated that an optimal ratio between the cellular compounds and trehalose leads to vitrification of the system without the risk of crystallization. The elimination of water leads to

the concentration of the system and the decrease of its volume, the optimal ratio is thus reached which allows the vitrification of cells and the success-full preservation of yeast cells.

2.1.5. Acknowledgements

This work was supported by grants from the “National Association of Technical Research (ANRT)”, Phileo by Lesaffre, Lesaffre group and the project Probio+ 2019, supported by the Conseil Regional de Bourgogne Franche-Comté and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014-2020 programs.

3. Discussion

Le procédé de séchage engendre une transition continue entre l'état liquide et l'état vitreux. Lors de cette transition les cellules passent par un « état » intermédiaire concentré, appelé caoutchoutique. De leur production à leur utilisation, les levures sèches actives sont soumises à diverses perturbations pouvant provoquer la dévitrification du système c'est-à-dire le passage de l'état vitreux à l'état caoutchoutique. L'objectif de ce chapitre était d'étudier les effets d'une dévitrification par voie thermique ou hydrique sur la viabilité des levures.

- *Effets de la dévitrification sur la viabilité et la résistance thermique des levures*

Les conditions hydriques et thermiques gouvernent l'établissement de l'état vitreux ou de l'état caoutchoutique. La superposition des courbes de transition vitreuse du tréhalose et des levures étudiées a permis de montrer l'implication forte du tréhalose dans ces états. Ces résultats confirment les observations reportées dans la littérature (Cerrutti et al. 2000; Schebor et al. 2000; Kawai et al. 2021). Dans des conditions environnementales tempérées, l'état caoutchoutique est prédominant chez la levure. Notre étude a révélé, pour la première fois, le potentiel de conservation de plusieurs mois de levures industrielles dans cet état à la suite d'une dévitrification hydrique. Notons que la survie des levures sur des échelles de temps aussi longues à l'état caoutchoutique et pour différentes HR n'avait jamais été montrée. La dévitrification par voie thermique a également permis de souligner la résistance des levures à des hautes températures. La survie observée a été attribuée à la présence d'une forte quantité de tréhalose intracellulaire mais également à l'encombrement moléculaire. En effet, l'accumulation de protéines intrinsèquement désordonnées, conduisant à un encombrement

important, est impliquée dans la stabilisation de certains anhydrobiotes comme les tardigrades (Hengherr et al. 2009; Boothby et al. 2017). Les levures sont principalement composées d'eau, de tréhalose et d'une forte complexité moléculaire, principalement représentée par des macromolécules constitutives ou fonctionnelles, représentant environ 80% de la matière sèche. Le décalage des courbes de transition vitreuse met en avant l'implication de cette complexité moléculaire dans l'état vitreux. Par conséquent, l'hypothèse de l'effet de l'encombrement moléculaire sur la survie aux états vitreux et caoutchoutique est avancée. Il expliquerait la survie remarquable des levures étudiées à différentes humidités intermédiaires et donc à l'état caoutchoutique.

- *La survie des levures aux différentes conditions environnementales peut-elle être expliquée par la distance à T_g ?*

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les levures A, B et C présentent des teneurs en eau différentes conduisant à des T_g différentes. Plaçons les levures A, B et C sur un diagramme a_w / température. A température ambiante, C est le plus éloigné de la transition vitreuse alors que A se situe dans la transition vitreuse (figure 52). La distance à T_g est donc différente pour A, B et C.

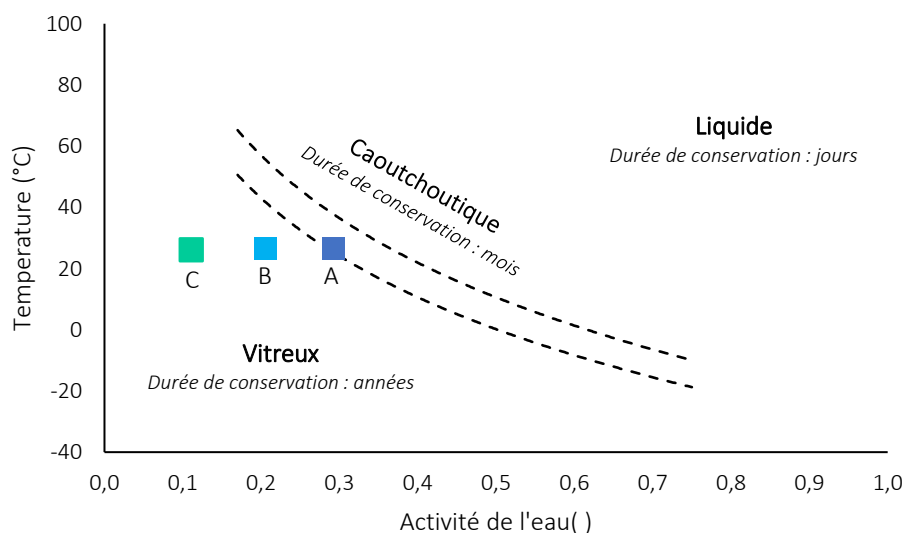


Figure 52. Diagramme de transition vitreuse des levures sèches actives. Les courbes en pointillés représentent le début et la fin du phénomène de transition vitreuse. Les levures A, B et C sont positionnées sur le diagramme à une température de 25 °C.

Un stockage à l'état vitreux permet la préservation de la viabilité durant plusieurs années (Buitink and Leprince 2004). Lorsque l'on franchit le début de la transition vitreuse, la viabilité

décroit rapidement avec l'augmentation du taux d'hydratation. La viabilité des levures A est donc moins stable dans le temps que celle des levures B ou C. Par conséquent, la distance à T_g semble jouer un rôle dans la stabilité au stockage. De même, la résistance thermique est également affectée par la distance initiale à T_g . Une étude proposée par Higl et ses collaborateurs sur la stabilité au stockage de *Lactobacillus paracasei*, lyophilisées dans une matrice de lactose, a montré l'implication de facteurs supplémentaires à celui de la distance à T_g dans la stabilité au stockage. Les auteurs ont notamment montré l'influence de la température de stockage (Higl et al. 2007). Nos résultats ont révélé l'importance de la distance à T_g dans la préservation de la viabilité, néanmoins d'autres paramètres pourraient également être impliqués.

➤ *Que se passe t'il si A devient C ?*

Au cours de cette étude, les levures A ont été équilibrées à l' a_w équivalente aux levures C, nous les appellerons C'. L'objectif était d'étudier les propriétés de résistance des levures C' en comparaison avec celles des levures C (tableau 14).

Tableau 14. Propriétés de résistance des levures C' et C lors de différentes études.

| | C' | C |
|-------------------------------------|--|-----|
| Conservation à température ambiante | ++ (Différence visible après 1 an) | +++ |
| Résistance thermique | ++ (Différence visible après traitement à 100 °C) | +++ |

La viabilité des levures C' dans les conditions les plus challengeantes (conservation supérieure à 1 an ou traitement thermique à 100 °C) est inférieure à la viabilité des levures C. Les T_g des levures C' et des levures C sont identiques. Par conséquent, la distance à T_g ne peut pas expliquer les différences observées. En revanche, elles pourraient être expliquées par la différence de qualité de verre. En effet, la levure C a initialement une teneur en eau plus basse et présente les propriétés de résistance les plus élevées en comparaison avec les levures A et B. Sa qualité de verre dépend de la teneur en eau mais également du barème de séchage utilisé. Le sur-séchage des levures A a été réalisé à 25 °C, par conséquent, la qualité du verre formé est différente. Les barèmes de séchage ont donc une importance sur la qualité du verre.

- *Effets de la dévitrification sur la cristallisation de la matrice de tréhalose*

A la sortie du procédé, les levures A, B et C ne présentaient pas de cristaux. La dévitrification peut avoir pour conséquence la cristallisation du système. Néanmoins, le stockage des levures dans des conditions favorables à la cristallisation n'a pas provoqué celle-ci. La non-cristallisation des levures a été reportée en 2004 par Buitink et ses collaborateurs. Ces auteurs mettaient en avant la complexité moléculaire des levures favorisant la vitrification spontanée du système (Buitink and Leprince 2004). Kawai et ses collaborateurs (Kawai et al. 2021) ont émis l'hypothèse de la présence de biomatériaux chez la levure permettant la prévention de la réduction de la mobilité moléculaire voir l'inhibition de la cristallisation du tréhalose. De plus, d'autres études ont montré que l'ajout de composés comme l'extrait de levures (Espinosa et al. 2006) ou le magnésium (Mazzobre and Del Pilar Buera 1999) inhiberaient la cristallisation du tréhalose dihydrate. Nos études ont montré que l'augmentation de la quantité de protéines dans le système permettait de réduire voire d'inhiber la cristallisation du tréhalose dihydrate. Nos résultats sont donc en faveur des hypothèses posées par Buitink et Kawai.

- *L'encombrement moléculaire en faveur de l'état amorphe*

Les résultats de cette étude ont permis de montrer le rôle de l'encombrement moléculaire sur la préservation de l'état amorphe de la matrice, qu'il soit vitreux ou caoutchoutique au cours du procédé et du stockage. En effet, nous avons montré l'implication de l'encombrement moléculaire dans la protection des cellules à l'état caoutchoutique. De plus, l'augmentation de l'encombrement moléculaire favorise l'état amorphe, par la non-cristallisation du système. A l'état hydraté, les protéines représentent 45% de la matière sèche (Szopa et al. 1992). La déshydratation entraîne une diminution du volume cellulaire importante conduisant ainsi à l'augmentation du confinement et de l'encombrement moléculaire. L'association de ces facteurs et du tréhalose permettent donc la haute préservation des levures au cours du procédé de séchage, ainsi qu'au cours des fluctuations hydriques et thermiques rencontrées lors du stockage et des traitements pouvant avoir lieu après fabrication.

Le procédé de séchage conduit à une transition continue entre les états liquide et vitreux en passant par l'état intermédiaire caoutchoutique. L'état vitreux permet la conservation des cellules sur de très longues durées. Les conditions environnementales tempérées que peuvent rencontrer les levures sèches actives conduisent au passage de l'état amorphe vitreux à l'état amorphe caoutchoutique, ou en d'autres termes à la dévitrification du système. Cet état est compatible avec la survie à courte ou moyenne durée. Les levures A pouvant être transformées en levures C, par modification de l' a_w , prennent les propriétés de conservation des levures C. Il semble donc que la teneur en eau finale après séchage soit un paramètre influençant les propriétés des levures. Toutefois, ce paramètre n'affecte pas la structure macroscopique de la matrice qui est vitreuse pour A, B et C. La principale différence entre A, B et C réside donc dans la teneur en eau du système vitrifié pouvant impacter la mobilité des constituants inclus.

Cette partie de la thèse a également démontré que le ratio tréhalose/ protéines est déterminant pour conduire à la vitrification du système. Ce résultat montre que par la préparation métabolique et la synthèse de tréhalose les cellules de levures vitrifient sans risque de cristallisation du tréhalose au cours du séchage. Ce processus pourrait avoir une signification importante dans le cadre de la compréhension de l'anhydrobiose qu'elle soit organisée industriellement ou induite par des conditions naturelles.

Chapitre 3

Evolution structurale et morphologique des levures au cours du séchage

Depuis quelques dizaines d'années, les travaux de l'équipe Procédés Microbiologique et Biotechnologiques de l'UMR PAM s'inscrivent dans la compréhension des mécanismes conduisant à la mort cellulaire lors des étapes transitoires de déshydratation et de réhydratation. Ces travaux ont permis de montrer que la membrane plasmique est une cible cellulaire privilégiée des perturbations hydriques. En effet, la perte de l'intégrité membranaire est montrée comme l'étape conduisant à la mort cellulaire. La déshydratation est associée à la contraction et à la diminution du volume cellulaire. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, cette diminution peut atteindre 60% (Martinez de Maranon et al. 1996). Les levures ont la particularité de posséder une enveloppe cellulaire composée de la membrane plasmique (MP) et de la paroi cellulaire (PC). La PC, partie la plus externe de la cellule, représente environ 30% du poids sec de *Saccharomyces cerevisiae*. Elle est constituée de 85% de polysaccharides et de 15% de protéines (Lesage and Bussey 2006). La paroi est organisée autour de deux couches majeures. La plus externe est essentiellement constituée de mannoprotéines glycosylées. La couche interne est composée d'un maillage de β -glucanes et de chitine. En condition physiologique, l'épaisseur de la paroi est comprise entre 100 et 200 nm chez *S. cerevisiae*. Son rôle protecteur est attribué à sa propriété élastique unique. La MP est composée d'un réseau de phospholipides organisé en bicouche, dans lequel des protéines sont enchâssées. Elle assure les fonctions de transports passif sélectif et actif. Elle participe également au maintien de la pression osmotique. La membrane est considérée comme une structure inélastique (Beney et al. 1997), de surface incompressible quasi-constante, qui se déforme sous la contrainte. En effet, elle est capable de former des plis de petite taille dans le cas d'une déshydratation rapide ou des plis de taille plus importante (« big pleats ») lors d'une déshydratation ménagante (Dupont et al. 2010).

Au cours de la déshydratation, l'évolution structurale du couple paroi/membrane pourrait représenter un mécanisme d'adaptation. Sous l'effet de l'efflux osmotique entraînant la diminution du volume cellulaire, la membrane subit une contraction qui entraîne la paroi solidaire grâce aux nombreux points d'ancrage. Cette évolution structurale est spécifique puisqu'elle permet d'éviter le décollement de la membrane et de la paroi, contrairement aux cellules végétales ou aux bactéries gram négatives. En raison de leurs différences de propriétés mécaniques, inhérentes à leur nature moléculaire, la membrane se plisse alors que la paroi se contracte et se densifie. Le phénomène pourrait contribuer à la compaction du matériel intracellulaire et à sa protection par l'enveloppe pariétale. Il a été étudié jusqu'ici en milieu modèle de déshydratation liquide. La littérature existante est basée sur l'étude de cellules isolées déshydratées osmotiquement. Notre étude propose d'étudier les conséquences d'une déshydratation industrielle conduisant au séchage de cellules agglomérées, sur les

caractéristiques cellulaires ainsi que sur les caractéristiques de l'enveloppe cellulaire. Pour cela, des levures sèches actives industrielles ont été hydratées, puis observées par microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie de force atomique (AFM). De plus, le séchage industriel des levures sèches actives est basé sur la déshydratation d'une population de cellules concentrées, qui au cours des différentes étapes de fabrication vont être façonnées et agglomérées. Les micro-organismes subissent donc des contraintes liées au procédé de déshydratation mais également celles liées à la concentration de la biomasse.

1. Conséquence de la déshydratation : passage de la sphère au dodécaèdre

Les levures agglomérées constituant les sphérules ont été équilibrées à différentes a_w (0,12, 0,43 et 0,75) avant d'être observées au MEB de la surface au centre de la sphérule. Plusieurs zones d'observation ont été sélectionnées (figure 53a) au sein des sphérules : en surface (figures 53b et 53c), à mi-distance entre la surface et le cœur (figure 53d) et à cœur (figure 53e). Les observations de surface permettent d'identifier des débris cellulaires de surface, sur une couche très fine dont l'épaisseur est de l'ordre du μm , puis immédiatement dessous sont observables les premières cellules de levures (figures 53b et 53c). Au sein des sphérules, les cellules sont réparties de façon homogène entre la surface et le centre de la sphérule. Elles sont jointives et non fusionnées. Des porosités de taille importante ont également été observées (figure 53a), ainsi que des pores beaucoup plus petits entre les cellules (figures 53c, 53d et 53e).

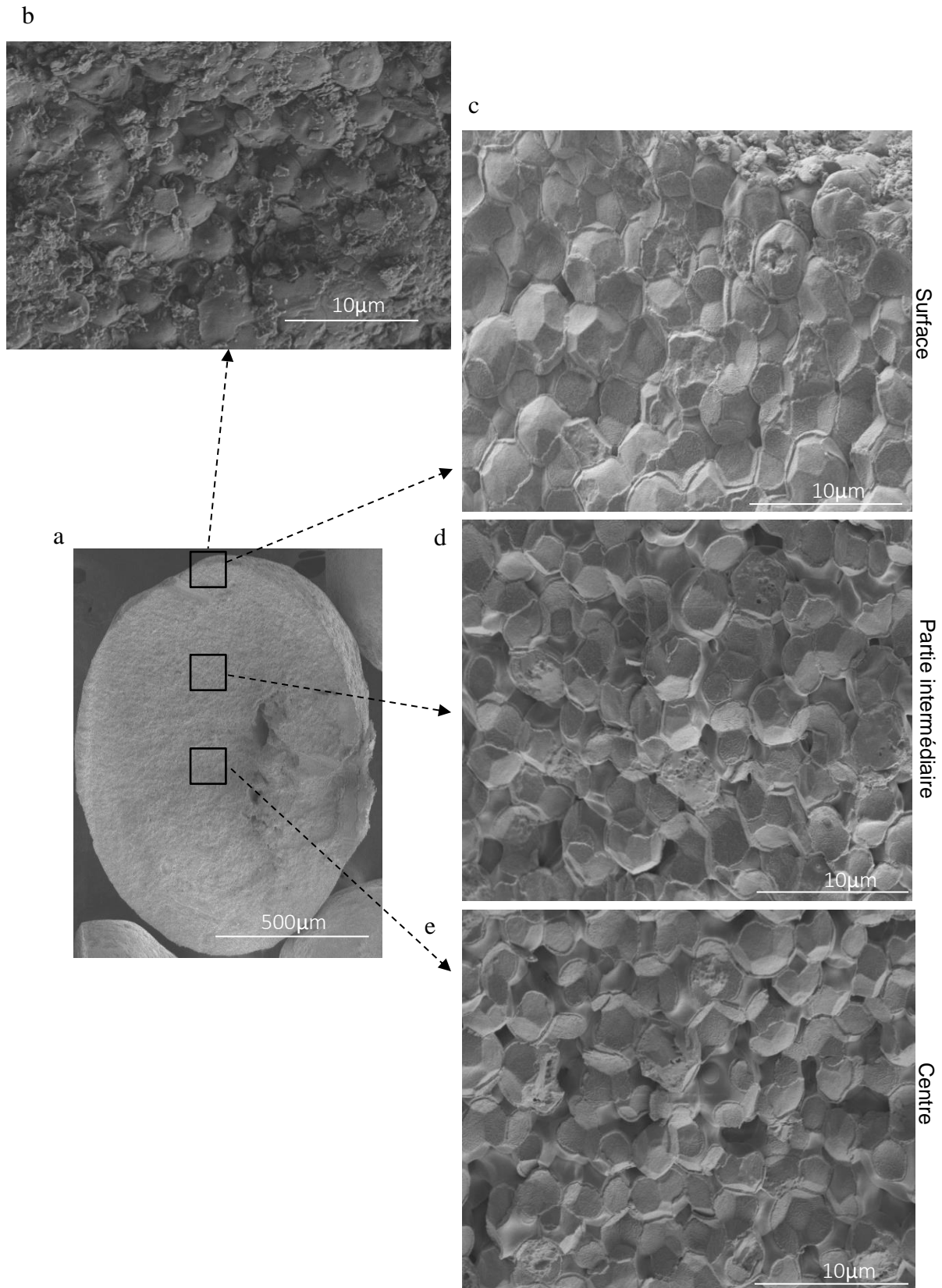


Figure 53. Observation des levures à a_w 0,12 de la surface au centre d'une sphérule. Les observations ont été réalisées au microscope électronique à balayage après fracture de la sphérule. (a) Observation de la sphérule fracturée entière (b) Observation de la surface de la sphérule (vue du dessus) (c) Observation des cellules à la périphérie de la surface (d) Observation des cellules entre la surface et le cœur de la sphérule (e) Observation des cellules au cœur de la sphérule.

Au niveau cellulaire et selon le plan de fracture, différentes morphologies sont observées (figure 54) :

- Des cellules entières (I)
- Des cellules « ouvertes » contenant le cytoplasme (II et III). Des structures pouvant correspondre à la vacuole (II) ou l’empreinte des plissements de l’enveloppe cellulaire sur le cytoplasme (III) sont visibles.
- Des cellules « ouvertes » ne contenant pas le cytoplasme (le contenu cellulaire a été arraché lors de la fracture de la sphérule) (IV). De longs « traits » sont également observables, ils correspondent probablement aux plissements de la paroi et/ou de la membrane induits par la déshydratation (Dupont et al 2011).

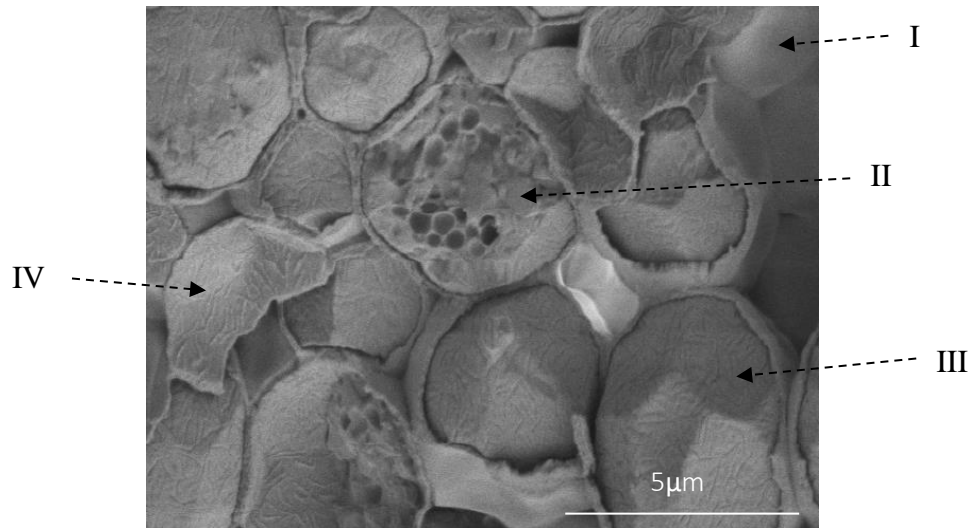


Figure 54. Observation des levures à $a_w 0,12$ au microscope électronique à balayage après fracture de la sphérule.

Les cellules observées à l'état hydraté ($a_w \sim 0,99$) sont de forme sphérique (figure 55). Les levures agglomérées et équilibrées à une a_w de 0,75 montrent également une forme sphérique de la surface au cœur de la sphérule (figure 56). Les levures équilibrées à une a_w de 0,43 (figure 57) et à une a_w de 0,12 (figure 54) présentent des formes dodécaédriques avec des faces concaves sur les champs observés de la surface au cœur de la sphérule. L'observation des cellules à différents niveaux d'hydratation révèle donc un changement de forme corrélé à l'augmentation du taux d'hydratation. Les contraintes engendrées par la déshydratation et l'agglomération induisent le passage d'une forme sphérique à une forme dodécaédrique. Les images des levures aux différentes a_w ont permis de mesurer des dimensions caractéristiques des cellules (diamètre par les a_w auxquelles les levures sont sphériques et longueur des arêtes des dodécaèdres pour les levures aux $a_w 0,43$ et 0,12).

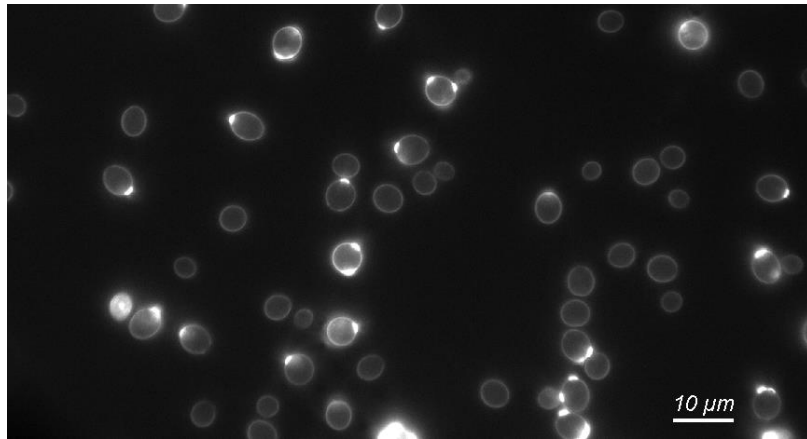


Figure 55. Observation des levures à a_w 0,99 en microscopie confocale après marquage au calcofluor (marquage de la paroi).

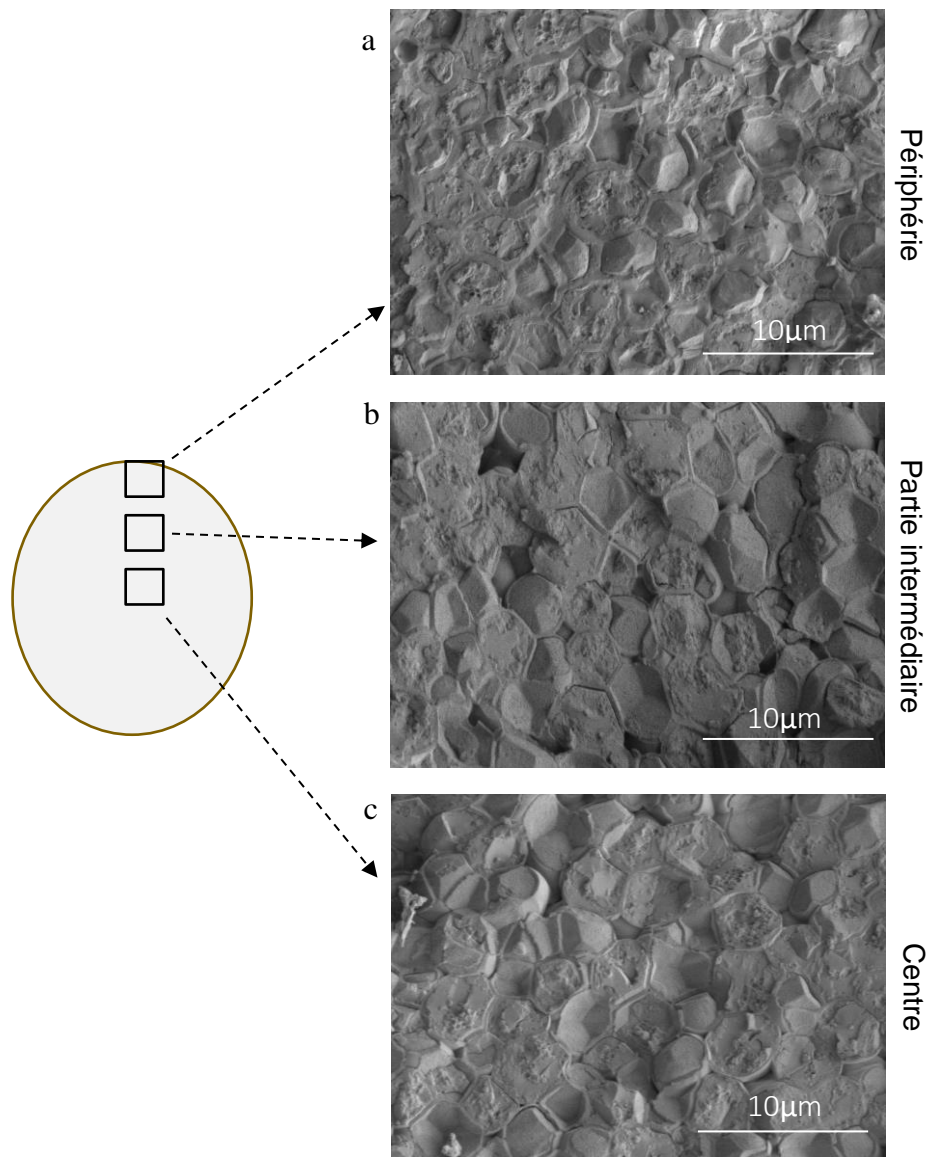


Figure 56. Observation d'un rayon des levures hydratées à a_w 0,75 de la périphérie au centre d'une sphérule. Les observations ont été réalisées au microscope électronique à balayage après fracture de la sphérule. (a) Observation des cellules à la périphérie de la surface (b) Observation des cellules entre la surface et le cœur de la sphérule (c) Observation des cellules au cœur de la sphérule.

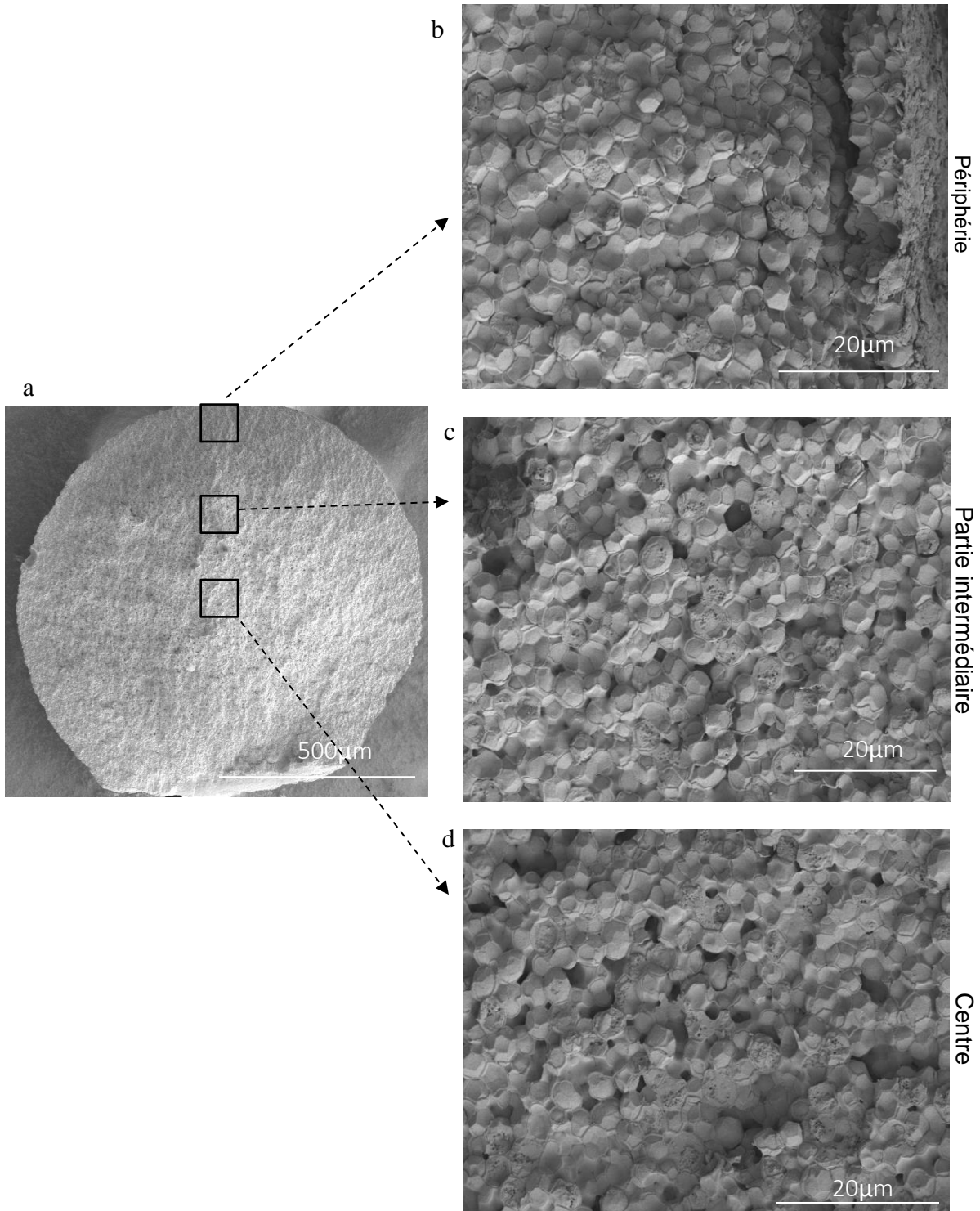


Figure 57. Observation des levures à a_w 0,43 de la périphérie au centre d'une sphérule. Les observations ont été réalisées au microscope électronique à balayage après fracture de la sphérule. (a) Observation de la sphérule fracturée entière (b) Observation des cellules à la périphérie de la surface (c) Observation des cellules entre la surface et le cœur de la sphérule (d) Observation des cellules au cœur de la sphérule.

Au cours du séchage, les levures sont sujettes dans les sphérules à une transition morphologique en passant de la sphère au dodécaèdre. Pour ces deux formes, il est possible de calculer le volume et la surface tels que :

- Volume de la sphère (1) $(1) V_{sphère} = \frac{4}{3}\pi r^3$
- Surface de la sphère (2) $(2) S_{sphère} = 4\pi r^2$
- Volume du dodécaèdre (3) $(3) V_{dodécaèdre} = \frac{15+7\sqrt{5}}{4}a^3$
- Surface du dodécaèdre (4) $(4) S_{dodécaèdre} = 3\sqrt{25 + 10\sqrt{5}}a^2$

avec r le rayon de la sphère (exprimé en m) ; a l'arête du dodécaèdre (exprimée en m) ; V le volume (exprimé en m^3) ; S la surface (exprimée en m^2).

Le volume cellulaire et la surface des levures aux différents niveaux d'hydratation ont été présentés dans le tableau 15 (la forme géométrique de la cellule a été considérée dans l'estimation de ces paramètres).

Tableau 15. Estimation des caractéristiques géométriques des levures agglomérées dans les sphérules en fonction de leur niveau d'hydratation. La valeur moyenne ainsi que l'écart type associé ont été calculés après observation de 100 cellules par échantillon.

| | Forme de la cellule | Volume (μm^3) | Diminution de volume (%) | Surface (μm^2) | Diminution de la surface (%) | Rapport surface/volume (m^{-1}) |
|------------|---------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| a_w 0,99 | Sphérique | 78,8 +/- 0,48 | Isotonique | 88,9 +/- 3,2 | | 1,1 |
| a_w 0,97 | Sphérique | 67,8 +/- 1,21 | 14 | 80,4 +/- 5,5 | 9,6 | 1,2 |
| a_w 0,75 | Sphérique | 36,1 +/- 0,03 | 54,2 | 52,8 +/- 0,5 | 40,6 | 1,5 |
| a_w 0,43 | Dodécaédrique | 21 +/- 0,06 | 73,3 | 40,5 +/- 0,82 | 54,4 | 1,9 |
| a_w 0,12 | Dodécaédrique | 19,7 +/- 0,25 | 75 | 38,7 +/- 2,11 | 56,5 | 2 |

Le volume cellulaire des levures diminue au cours de la déshydratation jusqu'à 75% entre les états hydraté et déshydraté (tableau 15). La surface cellulaire pariétale diminue également au cours de la déshydratation d'environ 55%. Notons, qu'à partir d'une a_w de 0,43, la diminution de la surface reste constante. Le rapport surface/ volume augmente avec l'augmentation de l' a_w . La comparaison des volumes cellulaires de levures déshydratées osmotiquement en milieu

liquide à différentes valeurs d' a_w (données issues de travaux du laboratoire non publiées) et des levures industrielles agglomérées a été réalisée (figure 58). Notons que la déshydratation en milieu liquide très concentré en polyols peut introduire un biais dans l'estimation des mesures réalisées issues d'observations au microscope. La diminution de volume dans le cas des levures déshydratées industriellement est plus importante que celle des levures déshydratées osmotiquement en milieu liquide. Le passage à l'état dodécaédrique pourrait donc conduire à une diminution du volume cellulaire plus importante.

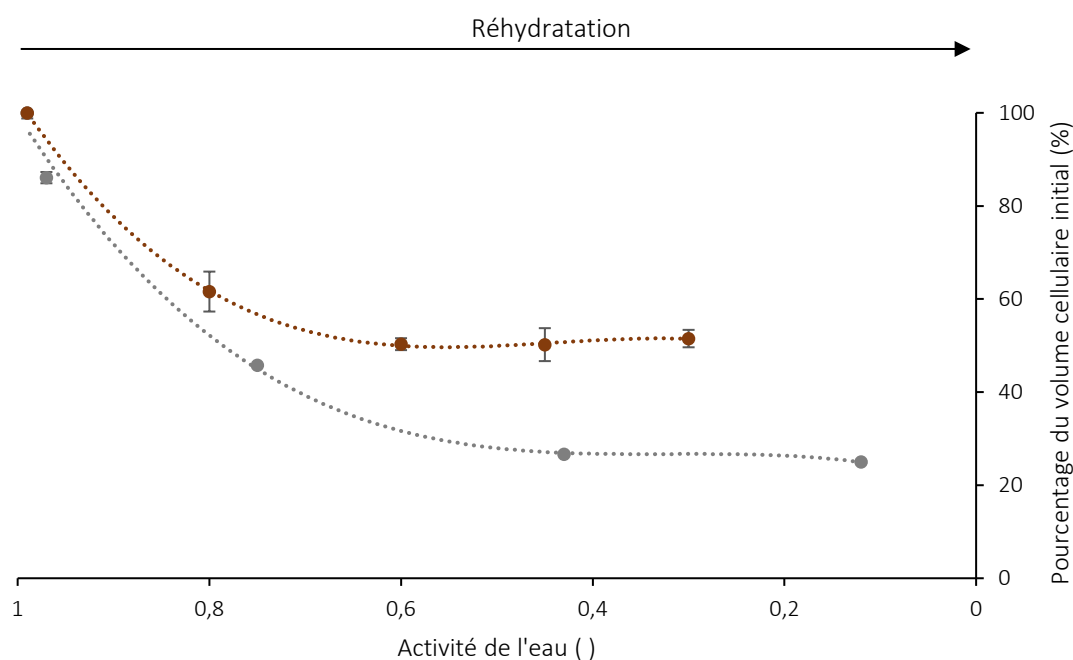


Figure 58. Pourcentage du volume cellulaire initial en fonction de l' a_w , lors de la réhydratation de levures *S.cerevisiae* déshydratée osmotiquement en milieu liquide (●) et de levures industrielles (■). Les valeurs moyennes reportées dans ce graphique ont été estimées après observation de 100 cellules par échantillon.

L'estimation du volume cellulaire des cellules à l'état déshydraté a également permis d'estimer le nombre de levures contenues dans une sphérule. L'étude du volume des levures A, B et C à différents niveaux d'hydratation n'a pas révélé de différence. Les nombres de cellules par sphérule et par gramme de sphérules ont été estimés pour chaque fraction granulométrique, puis pour la fraction totale (tableau 16). Les pores pouvant être présents au sein des sphérules n'ont pas été considérés dans ces estimations.

Tableau 16. Estimations du nombre de cellules par sphérule

| | Sphérule de levures A | Sphérule de levures B | Sphérule de levures C |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Nombre de cellules/ sphérule | 2,0E+07 | 2,2E+07 | 1,7E+07 |
| Nombre de cellules/ g | 4,1E+10 | 3,7E+10 | 3,7E+10 |
| Nombre de cellules/ g MS | 3,8E+10 | 3,5E+10 | 3,5E+10 |

Les nombres de cellules par gramme de sphérules rapportés à la matière sèche sont équivalents pour les sphérules de levures A, B et C. Une sphérule de levures contient environ 20 000 000 cellules compactées. Notons un décalage entre ces estimations et les valeurs déterminées lors de la caractérisation biologique des levures (chapitre 1, page 85). Ce décalage peut être expliqué par la présence d'inclusions gazeuses au sein des sphérules observées en microscopie et non pris en considération dans les estimations. La présence de ces inclusions a deux conséquences directes sur ces estimations : la surestimation du nombre de cellules et la sous-estimation du volume cellulaire des cellules se trouvant à la périphérie de ces pores. En effet, ces cellules ne sont pas contraintes par d'autres cellules sur toutes leurs faces, leur forme ne peut donc pas être modifiée en dodécaèdre.

2. Effets de la déshydratation sur l'enveloppe cellulaire

L'épaisseur de l'enveloppe cellulaire des levures hydratées à différents a_w a été déterminée après observations des sphérules de levures au MEB. Ces données ont été comparées à celles obtenues après observation de levures isolées *S. cerevisiae* déshydratées osmotiquement en milieu liquide (données issues de travaux du laboratoire non publiées) (figure 59).

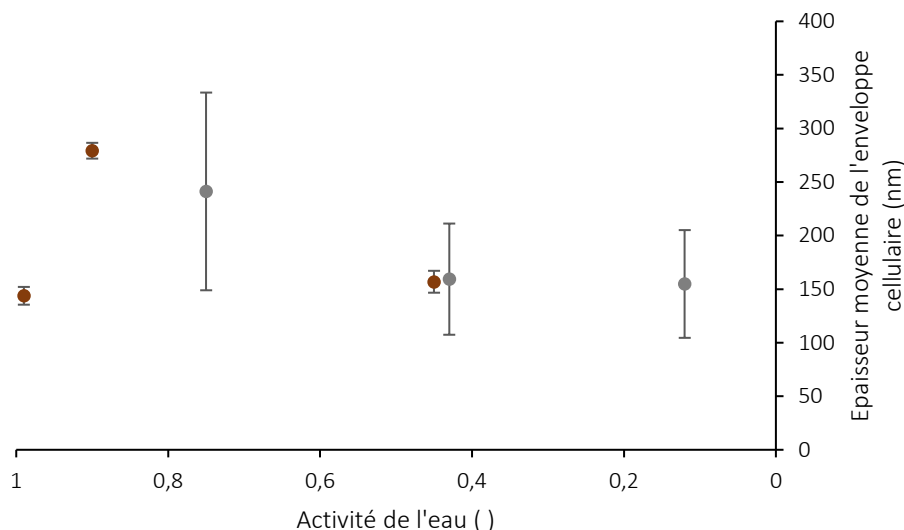


Figure 59. Épaisseur moyenne de l'enveloppe cellulaire en fonction de l' a_w . Les données collectées sur une levure *S.cerevisiae* déshydratée et réhydratée osmotiquement en milieu liquide ont été représentées en marron. Les données issues des observations réalisées sur les levures industrielles ont été représentées en gris. Les valeurs moyennes reportées dans ce graphique ont été essimées après observation de 40 cellules par échantillon.

L'épaisseur moyenne de l'enveloppe cellulaire des levures hydratées à a_w 0,99, c'est-à-dire à leur volume isotonique, est d'environ 144 nm. Lorsque l' a_w est de 0,9, c'est-à-dire à la valeur permettant d'annuler la pression de turgescence, l'enveloppe cellulaire s'épaissit en doublant sa valeur initiale. Au cours de la déshydratation, l'épaisseur de l'enveloppe cellulaire s'affine jusqu'à revenir à son épaisseur initiale à partir d'une a_w de 0,45. Notons que l'épaisseur de l'enveloppe cellulaire des levures déshydratées osmotiquement en milieu liquide ou de façon industrielle est comparable à une a_w de 0,45.

La paroi des levures a également été observée par microscopie de force atomique (AFM) afin d'étudier plus précisément ses caractéristiques aux différents niveaux d'hydratation. La paroi des levures observées à a_w 0,12 présente de nombreux domaines avec une surface vallonée (figure 60a). Les parois des levures hydratées à a_w 0,75 présentent une surface plus lisse (figure 60b). Les résultats précédents ont mis en évidence la forme dodécaédrique des levures à a_w 0,12 qui semblent donc être corrélée avec la contraction de l'enveloppe cellulaire, alors que les levures à a_w 0,75 présentaient une forme sphérique associée à une enveloppe cellulaire non contractée. Ces observations confirment donc des différences de contraction de l'enveloppe cellulaire en fonction du niveau d'hydratation.

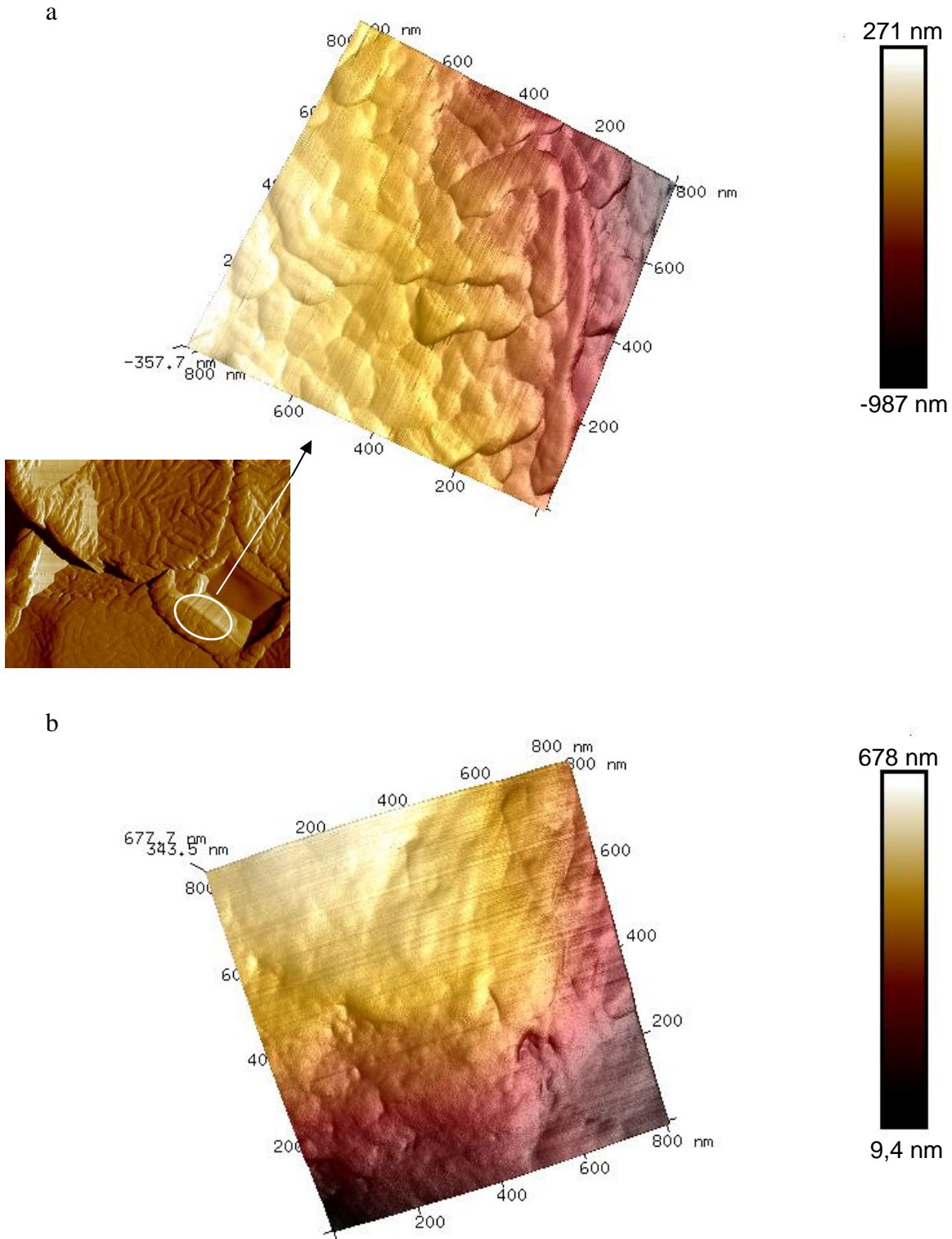


Figure 60. Observation de la topographie de surface d'une paroi de levure par microscopie de force atomique – scan réalisé sur 800 nm (a) Observation de la paroi d'une levure hydratée à a_w 0,12 (b) Observation de la paroi d'une levure hydratée à a_w 0,75.

3. Discussion

Ces travaux sont basés sur l'observation de levures séchées, agglomérées puis équilibrées à différentes a_w , ainsi qu'à leur comparaison avec des levures déshydratées osmotiquement en milieu liquide. Nous posons donc l'hypothèse que les observations réalisées s'inscrivent à la fois dans le cadre d'une réhydratation mais aussi d'une déshydratation.

La transition continue d'une biomasse industrielle de l'état liquide vers l'état solide a pu être approchée durant ces travaux. Durant l'étape de production en bioréacteur, les levures sont de forme sphérique/ovoïde. Leurs caractéristiques morphologiques sont identiques lors des étapes préparatoires à la déshydratation, comme la maturation (accumulation de tréhalose), l'élimination du milieu de culture ou la déshydratation préliminaire (déshydratation par filtration). Bien que les paramètres hydriques soient modifiés à chacune de ces étapes, les cellules sont sphériques et de taille équivalente. Néanmoins, l'eau extracellulaire est éliminée lors de ces étapes, ce qui induit la diminution du volume total occupé par la biomasse et le rapprochement des cellules les unes par rapport aux autres. Par la suite, le procédé de séchage engendre la sortie massive de l'eau du cytoplasme vers le milieu extérieur. Ceci a pour conséquence d'engendrer une forte contrainte mécanique conduisant à la diminution du volume cellulaire et à l'augmentation du rapport surface/ volume. De plus, des contraintes mécaniques supplémentaires contraignent les cellules les unes par rapport aux autres. En effet, considérons la forme initiale des levures hydratées comme des sphères. Dans une population de sphères, chaque sphère est en contact avec 12 autres sphères. D'après le théorème isopérimétrique, la forme sphérique possède le rapport surface/ volume le plus petit. Par conséquent, ces contraintes mécaniques causées par l'agglomération des cellules couplée à la modification du rapport surface/ volume provoquent le passage de la forme sphérique à la forme dodécédrique. Notre étude a révélé une diminution de 75% du volume cellulaire. Les données issues de la bibliographie avaient rapportées une diminution volumique pouvant aller jusqu'à 60% chez *Saccharomyces cerevisiae* (Martinez de Marañon et al. 1996). Ce décalage peut être expliqué par la méthode de déshydratation employée. A partir d'une a_w de 0,43, la surface et le volume de la cellule ne varient plus. De plus, la présence de nombreux plis membranaires a été révélée lors de l'observation des cellules équilibrées à a_w 0,12 et 0,43. Ces faits permettent de poser l'hypothèse de la contraction de la paroi permettant les changements morphologiques de la membrane et donc la diminution de la surface cellulaire. De plus, nos résultats ont révélé un épaississement de l'enveloppe cellulaire pour une a_w de 0,9 ainsi que pour une a_w de 0,75 en comparaison à une cellule hydratée. Lorsque la diminution de l' a_w se poursuit, la paroi s'affine

et retrouve son épaisseur initiale. Smith et ses collaborateurs (Smith et al. 2000) ont montré que le module d'élasticité de la paroi n'est pas affecté par une pression osmotique externe. Peu de littérature est disponible sur l'état de la paroi lors de la déshydratation, nous proposons donc un scénario des modifications morphologiques de l'enveloppe cellulaire en fonction de différents niveaux d'hydratation, basé sur nos observations (figure 61).

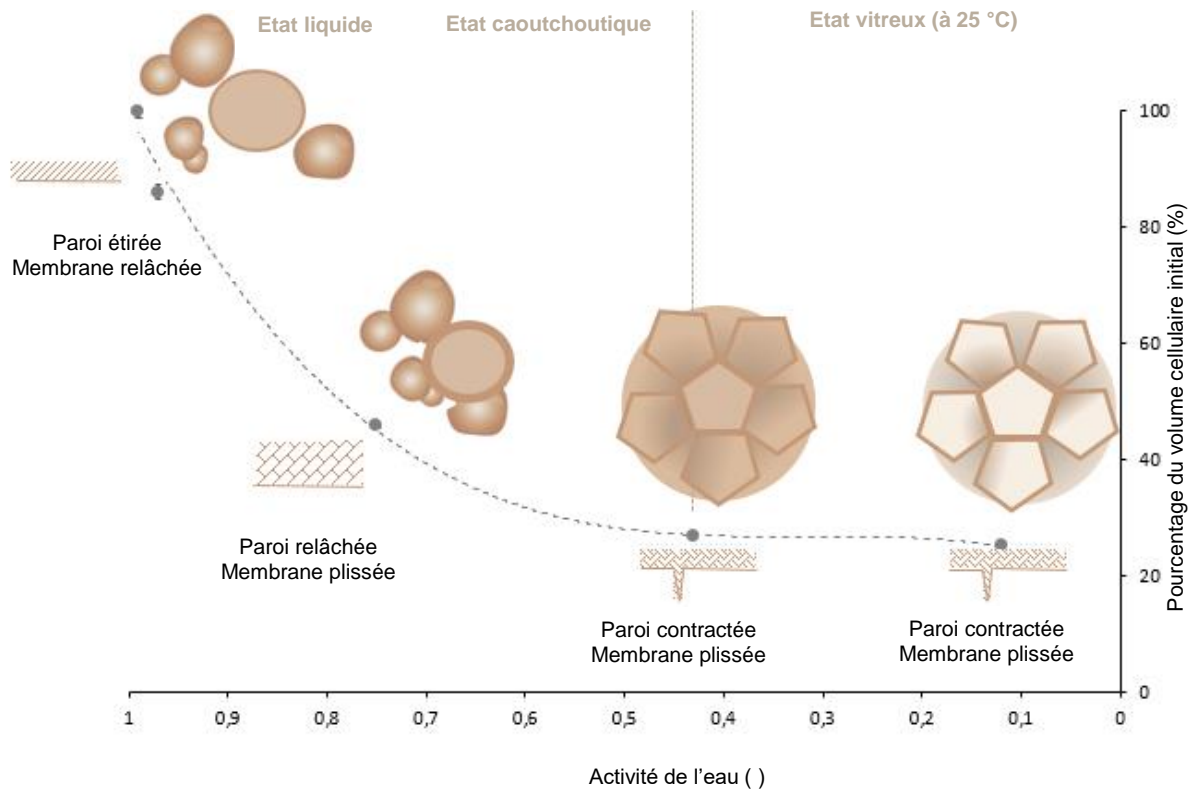


Figure 61. Scénario de la transition morphologique des cellules et de l'enveloppe cellulaire, de la sphère au dodécaèdre, se produit durant le procédé de séchage.

A l'état physiologique, la paroi et la membrane plasmique sont respectivement sous forme étirée et relâchée sous l'effet de la pression de turgescence. La diminution du volume cellulaire, engendrée par celle du niveau d'hydratation, conduit au relâchement de la paroi, ayant pour conséquence son épaissement. A ce stade, la membrane comporte très probablement quelques plis de petite taille. A partir de 43% HR, le volume cellulaire varie peu. Il a quasiment atteint sa diminution maximale. La membrane plasmique, étant un matériau incompressible, est plissée sous l'effet de la réduction volumique. La paroi est ainsi tractée, ce qui conduit à sa contraction. Le retour de la paroi à son épaisseur initiale pourrait être dû à la présence de matériel pariétal dans les invaginations de la membrane couplée à sa contraction. Cette

hypothèse sera vérifiée lors d'une prochaine campagne expérimentale réalisée en microscopie électronique à transmission.

Les procédés de déshydratation appliqués ont conduit à une diminution du volume cellulaire maximale de 75%. Nos résultats mettent également en lumière une contrainte supplémentaire générée par les cellules elles même. Cette dernière, combinée à l'augmentation du rapport surface/ volume, est d'ailleurs la cause de la forme dodécaédrique prise par les levures industrielles au cours du séchage. L'évolution du volume et de la surface cellulaire a permis de poser l'hypothèse de changements structuraux de l'enveloppe cellulaire à différents niveaux d'hydratation. Nous avons d'ailleurs montré un épaississement de la paroi renforçant cette hypothèse. Des campagnes expérimentales supplémentaires doivent être réalisées afin de renforcer ces premiers résultats.

Conclusion générale

La préservation de la viabilité de micro-organismes d'intérêt au cours et après séchage est un véritable challenge pour les industriels. Bien qu'ils aient acquis de solides connaissances par le développement d'une recherche appliquée leur permettant de générer des produits performants, les conditions d'utilisation des levures sèches actives ainsi que l'exigence du marché actuel poussent les industriels dans une amélioration constante de leurs produits. Cette thèse portée par Phileo, business unit dédiée à la nutrition et à la santé animale, s'est inscrite dans les travaux de recherche menés depuis plusieurs années au sein de l'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques de l'UMR PAM. En effet, le laboratoire développe une expertise sur la compréhension des effets de la déshydratation et de la réhydratation sur divers micro-organismes. La collaboration avec Phileo a permis l'étude, pour la première fois, d'une biomasse industrielle séchée et agglomérée, se révélant comme un véritable atout dans la compréhension des mécanismes de survie. Ces travaux de recherche avaient pour objectif de comprendre les mécanismes clés à l'origine de la stabilité des levures probiotiques *Saccharomyces cerevisiae* séchées et agglomérées sous forme de sphérules. Pour cela, il a été nécessaire de comprendre les déterminants physico-chimiques et biologiques de la stabilité des levures sèches actives, qui sont définies par les barèmes de séchage appliqués ainsi que par les conditions environnementales rencontrées. Pour cela, trois produits de levures sèches et agglomérées (A, B et C) ont été étudiés lors de ces travaux de recherche. Ils ont été générés à partir d'une même crème de levures et d'une technologique de séchage identique avec des barèmes de séchage appliqués qui étaient cependant différents.

La transition continue d'une biomasse industrielle de l'état liquide vers l'état solide a pu être approchée pour la première fois durant ces travaux de thèse. Nos résultats ont montré un système solidifié dans un état vitreux. De plus, ce système correspond à un agrégat ultraconcentré de cellules jointives. Le procédé de séchage engendre la sortie massive de l'eau du cytoplasme vers le milieu extérieur. Ceci a pour conséquence d'induire une forte contrainte mécanique conduisant à la diminution du volume cellulaire et à l'augmentation du rapport surface/ volume. L'observation des levures à différents niveaux d'hydratation, par des techniques de microscopie non invasives, a révélé une déformation structurale des cellules au cours de la déshydratation. En effet, les levures sont de forme dodécaédrique à des niveaux de séchage bas. A ce niveau d'hydratation, les cellules possèdent un volume cellulaire minimum et comportent encore quelques pourcents d'eau résiduelle. Au cours de ces travaux de thèse, les conditions permettant la vitrification des levures ont été élucidées. En effet, nous avons montré

que la quantité de tréhalose, accumulée lors de la production de la biomasse, en adéquation avec la quantité de macromolécules est un facteur déterminant pour la réussite de la vitrification. De plus, le retrait de l'eau engendre une diminution de volume cellulaire favorisant probablement la vitrification du cytoplasme au travers de sa concentration. Le rôle du ratio tréhalose/macromolécules s'illustrerait également dans l'importance de compenser le départ de l'eau au sein de la cellule. Crowe et ses collaborateurs ont décrit l'importance du tréhalose lors de l'élimination de l'eau dans la théorie du remplacement de l'eau (water replacement hypothesis). En outre, la présence de tréhalose pourrait également compenser la diminution de volume cellulaire causée par le retrait de l'eau, permettant ainsi de conserver une structure volumique non affaissée. A l'état solidifié vitreux, la mesure de la quantité d'eau présente dans les levures a permis de révéler la principale différence générée par les barèmes de séchage, c'est-à-dire la teneur en eau finale des levures A, B et C. En effet, les levures A présentent la teneur en eau la plus élevée et les levures C la plus faible. La teneur en eau s'est d'ailleurs dévoilée comme un élément central, qui définit les caractéristiques des levures A, B et C. Nos résultats ont mis en valeur l'aptitude élevée des levures les plus sèches à persister dans le temps. Les verres formés comportent de petites quantités d'eau. Par conséquent, une mobilité moléculaire résiduelle, bien que faible, existe au sein de ces systèmes. Sur des temps longs, cette mobilité peut avoir pour conséquences la dénaturation et l'agrégation de macromolécules ou encore la diffusion d'espèces radicalaires pouvant créer des dégâts cellulaires. La quantité d'eau résiduelle piégée au sein du verre semble donc impacter la stabilité du système. Néanmoins, les conséquences d'une absence totale de molécules d'eau au sein de la cellule vitrifiée ne sont pas connues. De plus, d'un point de vue technique il serait compliqué d'éliminer l'eau résiduelle puisque cela demanderait un apport énergétique extrêmement élevé sur des temps très longs.

Les levures sèches actives peuvent être soumises à des fluctuations hydriques provoquant des réhydratations, naturelles ou technologiques, qui ont pour conséquence la diminution de la température de transition vitreuse (T_g). Le passage de l'état amorphe vitreux à l'état amorphe caoutchoutique, appelé dévitrification, est alors possible dans certaines conditions. La survie des levures à une dévitrification thermique ou hydrique a été observée dans ces travaux. Nous avons montré la conservation des levures à l'état caoutchoutique durant plusieurs semaines, ainsi que la résistance thermique des levures après passage à l'état caoutchoutique. La survie des cellules à l'état caoutchoutique a été attribuée à la présence d'une quantité importante de tréhalose mais également à l'encombrement moléculaire. La dévitrification pourrait entraîner la cristallisation du système, c'est-à-dire le passage d'un état amorphe à un état cristallin. La présence de cristaux à la fin du procédé et au cours des deux années de stockage à l'état amorphe

caoutchoutique n'a pas été observée. L'étude des propriétés thermophysiques des levures, ainsi que celles de solutions binaires protéines/ tréhalose et du tréhalose, nous ont permis de poser l'hypothèse de la contribution des macromolécules et de l'encombrement moléculaire dans la survie à l'état caoutchoutique. Nos résultats ont montré l'inhibition de la cristallisation du tréhalose dihydrate par l'augmentation de l'encombrement moléculaire. L'encombrement moléculaire tient donc un rôle central dans la préservation de l'état amorphe. Il favorise l'état amorphe vitreux, considéré comme l'état de préservation optimal, lors de la déshydratation et contribue à la protection des cellules à l'état amorphe caoutchoutique dans le cas d'une réhydratation ou d'une augmentation de température. La survie à l'état déshydraté et aux humidités relatives intermédiaires des levures ne s'expliquerait donc pas seulement par la présence de tréhalose et son implication dans de nombreux mécanismes comme le remplacement de l'eau ou la vitrification. La contribution des macromolécules au travers de l'encombrement moléculaire est à prendre en considération dans la préservation des cellules aux perturbations hydriques intenses.

Une teneur en eau basse permet la conservation des levures sur des temps longs, néanmoins la réhydratation de ces cellules est plus létale. L'amplitude de réhydratation est donc déterminante dans la survie des cellules à la réhydratation. La littérature met en avant l'importance de la température de réhydratation, grâce notamment aux travaux de Crowe et ses collaborateurs. En effet, afin de préserver la viabilité des levures sèches, il est préconisé d'utiliser une température de réhydratation supérieure à la température de transition de phase des membranes cellulaires. En présence de tréhalose, la membrane est maintenue dans un état liquide cristallin. Lors de la réhydratation, le tréhalose quitte la membrane dans des conditions d' a_w basses. Par conséquent, si la température de réhydratation n'est pas suffisamment élevée, la membrane plasmique peut adopter un état cristallin qui peut être létal pour la cellule. Nos travaux apportent de nouveaux éléments sur l'effet de la réhydratation sur la survie cellulaire et mettent en avant l'importance de la cinétique de réhydratation par rapport à la température de réhydratation. En effet, à température ambiante et dans des conditions thermodynamiques qui créent théoriquement une transition de phase, une réhydratation douce en phase vapeur conduit à la survie cellulaire. Par conséquent, la transition de phase se révélerait mortelle dans le cas d'une réhydratation rapide. La cellule peut être considérée comme un objet épais par rapport à la taille des molécules d'eau et à leur vitesse de diffusion dans un système vitrifié. Au cours de la réhydratation, l'eau diffuse donc lentement entre la périphérie et le cœur de la cellule. L'eau arrivant par la périphérie pourrait donc conduire à la réhydratation de la membrane plasmique et de la zone cytoplasmique avoisinante plus rapidement qu'au cœur de la cellule. Ceci engendrerait la non-

dévitrification du cœur de la cellule ainsi qu'un phénomène osmotique qui créerait un gonflement et la rupture de la membrane.

Les connaissances issues de ces travaux de recherche réalisés sur une population conséquente de levures diploïdes cultivées et séchées dans des conditions industrielles ont permis d'apporter des éléments manquants dans la compréhension des phénomènes expliquant la survie des micro-organismes lors de la déshydratation et de la réhydratation. Ces nouveaux éléments permettent donc de compléter le scénario proposé dans la revue « Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* on anhydrobiosis » publié par l'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques en 2014, ainsi que les connaissances acquises jusqu'alors.

D'un point de vue industriel, la combinaison de ces différents éléments nous amène à proposer des pistes d'amélioration et d'innovation des produits. Le contrôle des paramètres biologiques au travers d'indicateurs durant l'étape de production de la biomasse est essentiel pour la prédiction du comportement des micro-organismes lors du séchage. La maîtrise, par le séchage, de la quantité d'eau résiduelle doit être optimisée en fonction de l'application ultérieure. En effet, l'objectif de l'industriel n'est pas nécessairement de conserver ses micro-organismes séchés durant des années, mais quelque fois de faire un compromis afin de proposer un produit qui se réhydrate plus facilement. Ces travaux ont permis de prendre conscience de l'effet de la cinétique de réhydratation aux échelles des cellules et des sphérules. La vitesse de réhydratation, impactant fortement la survie des cellules, conduit à imaginer des stratégies destinées à contrôler la diffusion de l'eau afin de créer des conditions de réhydratation optimales.

Ce projet de recherche était basé sur l'étude de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, micro-organisme trouvé dans un environnement naturel mais également exploité par les industriels pour son potentiel exceptionnel. Ce dernier est défini par la structure de la cellule ainsi que par sa capacité à répondre à l'osmose grâce à sa paroi solide de sa membrane plasmique et capable de se densifier lorsque le volume cellulaire diminue. La levure possède la capacité d'accumuler une forte quantité de tréhalose et de former un solide vitreux naturellement. Nos résultats ont notamment montré l'impossibilité de ce système à cristalliser ainsi que la possibilité d'une survie dans un état d'hydratation intermédiaire, nommé état caoutchoutique. Ainsi, à côté du contexte industriel, l'ensemble de ces connaissances pourrait

également contribuer à expliquer la survie de ce micro-organisme à l'état sauvage dans des environnements tempérés et au cours de périodes saisonnières différents.

Références bibliographiques

- Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, Usall J, Vias I (2001) Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int J Food Microbiol* 65:173–182 . [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00513-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00513-4)
- Adya AK, Canetta E, Walker GM (2006) Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 6:120–128 . <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00003.x>
- Aguilera JM, Karel M (1997) Preservation of biological materials under desiccation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37:287–309 . <https://doi.org/http://doi.org/10.1080/10408399709527776>
- Aguirre-Guzmán G, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE (2002) Survival of agglomerated *Saccharomyces cerevisiae* in pelleted shrimp feeds. *Aquaculture* 208:125–135 . [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00711-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00711-6)
- Arakawa T, Timasheff SN (1982) Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry* 21:6545–6552 . <https://doi.org/10.1021/bi00268a034>
- Assani A, Moundanga S, Beney L, Gervais P (2009) Vesicle formation in the membrane of onion cells (*Allium cepa*) during rapid osmotic dehydration. *Ann Bot* 104:1389–1395 . <https://doi.org/10.1093/aob/mcp256>
- Attfield P V., Raman A, Northcott CJ (1992) Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains that accumulate relatively low concentrations of trehalose, and their application in testing the contribution of the disaccharide to stress tolerance. *FEMS Microbiol Lett* 94:271–276 . [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90642-2](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90642-2)
- Ball P (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem Rev* 108:74–108 . <https://doi.org/10.1021/cr068037a>
- Barbosa J, Borges S, Amorim M, Pereira MJ, Oliveira A, Pintado ME, Teixeira P (2015) Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *J Funct Foods* 17:340–351 . <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.001>
- Bayrock D, Ingledew WM (1997) Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food Res Int* 30:417–425 . [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(97\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(97)00072-0)
- Beker MJ, Rapoport AI (1987) Conservation of Yeasts by Dehydration. *Adv Biochem Eng*

35:

- Belton PS, Gil AM (1994) IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers* 34:957–961 .
<https://doi.org/10.1002/bip.360340713>
- Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL (2001) Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals. *J Biol Chem* 276:24261–24267 . <https://doi.org/10.1074/jbc.M101487200>
- Beney L (2010) Rôle de la membrane plasmique dans la survie des microorganismes à la déshydratation : Contribution à l'optimisation de procédés de conservation des cellules biologiques (HDR)
- Beney L, Gervais P (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:34–42 .
<https://doi.org/10.1007/s002530100754>
- Beney L, Perrier-Cornet JM, Hayert M, Gervais P (1997) Shape modification of phospholipid vesicles induced by high pressure: Influence of bilayer compressibility. *Biophys J* 72:1258–1263 . [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78772-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78772-1)
- Billi D, Wright DJ, Helm RF, Prickett T, Potts M, Crowe JH (2000) Engineering desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66:1680–1684 .
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1680-1684.2000>
- Bischof JC, Padanilam J, Holmes WH, Ezzell RM, Lee RC, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M (1995) Dynamics of cell membrane permeability changes at supraphysiological temperatures. *Biophys J* 68:2608–2614 . [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80445-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80445-5)
- Bodzen A, Iaconelli C, Charriau A, Dupont S, Beney L, Gervais P (2020) Specific gaseous conditions significantly improve *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli* survival to freeze drying and rehydration. *Appl Food Biotechnol* 7:1–9 .
<https://doi.org/10.22037/afb.v7i1.26343>
- Boothby TC, Tapia H, Brozena AH, Piszkiwicz S, Smith AE, Giovannini I, Rebecchi L, Pielak GJ, Koshland D, Goldstein B (2017) Tardigrades use intrinsically disordered proteins to survive desiccation. *Mol Cell* 65:975-984.e5 .
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.018>

- Borovikova D (2016) Anhydrobiosis in yeast: cell wall mannoproteins are important for yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistance to dehydration. 2–5 .
<https://doi.org/10.1002/yea.3164>
- Bosch J, Varliero G, Hallsworth JE, Dallas TD, Hopkins D, Frey B, Kong W, Lebre P, Makhalanyane TP, Cowan DA (2021) Microbial anhydrobiosis. *Environ Microbiol* 00:1–14 . <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15699>
- Broeckx G, Vandenneuvel D, Claes IJJ, Lebeer S, Kiekens F (2016) Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm* 505:303–318 . <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.002>
- Bronshtein V. (2004) Preservation by foam formulation: An alternative to freeze-drying. *Pharm Technol* 28:86–92
- Brovchenko I, Krukau A, Oleinikova A, Mazur AK (2007) Water clustering and percolation in low hydration DNA shells. *J Phys Chem B* 111:3258–3266 .
<https://doi.org/10.1021/jp068776v>
- Buitink J, Leprince O (2004) Glass formation in plant anhydrobiotes: Survival in the dry state. *Cryobiology* 48:215–228 . <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.02.011>
- Burek M, Waskiewicz S, Wandzik I, Kaminska K (2015) Trehalose – properties , biosynthesis and applications. *Chemik* 473–476
- Câmara A de A, Maréchal PA, Tourdot-Maréchal R, Husson F (2019) Oxidative stress resistance during dehydration of three non-*Saccharomyces* wine yeast strains. *Food Res Int* 123:364–372 . <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.059>
- Camara Junior A de A, Nguyen TD, Jossier A, Endrizzi A, Saurel R, Simonin H, Husson F (2018) Improving total glutathione and trehalose contents in *Saccharomyces cerevisiae* cells to enhance their resistance to fluidized bed drying. *Process Biochem*.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.013>
- Cardona S, Schebor C, Buera MP, Karel M, Chirife J (1997) Thermal stability of invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state and trehalose crystallization. *J Food Sci* 62:105–112 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04378.x>
- Carpenter JF, Crowe JH (1989) An infrared spectroscopic study of the interactions of

carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 28:3916–3922

Carpenter JF, Crowe JH, Arakawa T (1990) Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J Dairy Sci* 73:3627–3636 . [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)79065-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)79065-0)

Castro HP, Teixeira PM, Kirby R (1995) Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:172–176 . <https://doi.org/10.1007/BF00164498>

Cerrutti P, Segovia De Huerdo M, Galvagno M, Schebor C, Del Pilar Buera M (2000) Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:575–580 . <https://doi.org/10.1007/s002530000428>

Charreau A, Cavaillé R, Vachet F (1991) Séchage - théorie et calculs. In: *Techniques de l'ingénieur*. pp 1–23

Chen T, Fowler A, Toner M (2000) Literature review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology* 40:277–282 . <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2244>

Clegg JS, Seitz P, Seitz W, Hazlewood CF (1982) Cellular responses to extreme water loss: The water-replacement hypothesis. *Cryobiology* 19:306–316 . [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(82\)90159-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(82)90159-6)

Clementi F, Rossi J (1984) Effect of drying and storage conditions on survival of *Leuconostoc oenos*. *Am J Enol Vitic* 35:183–186

Colavizza DJ, Quipourt-Isnard AD (2009) Novel baker's yeast

Comuzzo P, Zironi R (2013) Biotechnological strategies for controlling wine oxidation. *Food Eng Rev* 5:217–229 . <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9071-6>

Conrad PB, De Pablo JJ (1999) Computer simulation of the cryoprotectant disaccharide α,α -trehalose in aqueous solution. *J Phys Chem A* 103:4049–4055 . <https://doi.org/10.1021/jp984102b>

Conrad PB, Miller DP, Cielenski PR, De Pablo JJ (2000) Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* 41:17–24 .

<https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2260>

Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C (2004) Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J Appl Microbiol* 96:1024–1039 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02219.x>

Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM (1998a) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 60:73–103 . <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73>

Crowe JH, Clegg JS, Crowe LM (1998b) Anhydrobiosis: the water replacement hypothesis. In: Reid DS (ed) *The Properties of Water in Foods ISOPOW 6*. Chapman and Hall, New York, pp 440–455

Crowe JH, Crowe LM, Chapman D (1984a) Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Arch Biochem Biophys* 232:400–407 . [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(84\)90555-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(84)90555-1)

Crowe JH, Crowe LM, Chapman D (1984b) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223:701–703 . <https://doi.org/10.1126/science.223.4637.701>

Crowe JH, Crowe LM, Jackson SA (1983) Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum of dry membranes. *Arch Biochem Biophys* 220:477–484

Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F (2001) The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43:89–105 . <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2353>

Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54:579–99

De Jesus Pereira E, Panek AD, Eleutherio ECA (2003) Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones* 8:120–124 . [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2003\)008<0120:PAODDO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)008<0120:PAODDO>2.0.CO;2)

De Valdez GF, De Giori GS, De Ruiz Holgado AAP, Oliver G (1983) Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol* 45:302–304 . <https://doi.org/10.1128/aem.45.1.302-304.1983>

Desmond C, Ross RP, O’Callaghan E, Fitzgerald G, Stanton C (2002) Improved survival of

- Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J Appl Microbiol* 93:1003–1011 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01782.x>
- Dupont S, Beney L, Ferreira T, Gervais P (2011) Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1808:1520–1528 . <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.11.012>
- Dupont S, Beney L, Ritt JF, Lherminier J, Gervais P (2010) Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1798:975–985 . <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.01.015>
- Dupont S, Fleurat-Lessard P, Cruz RG, Lafarge C, Grangeteau C, Yahou F, Gerbeau-Pissot P, Abrahão Júnior O, Gervais P, Simon-Plas F, Cayot P, Beney L (2021) Antioxidant properties of ergosterol and its role in yeast resistance to oxidation. *Antioxidants* 10: . <https://doi.org/10.3390/antiox10071024>
- Dupont S, Lemetais G, Ferreira T, Cayot P, Gervais P, Beney L (2012) Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution* (N Y) 1–8 . <https://doi.org/10.5061/dryad.pd28pm7n>
- Dupont S, Rapoport A, Gervais P, Beney L (2014) Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8821–8834 . <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6028-5>
- Ekdawi-Sever N, De Pablo JJ, Feick E, Von Meerwall E (2003) Diffusion of sucrose and α,α -trehalose in aqueous solutions. *J Phys Chem A* 107:936–943 . <https://doi.org/10.1021/jp020187b>
- Eleutherio ECA, de Araujo PS, Panek AD (1992) Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 48:249–254 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02551.x>
- Ellis RJ, Minton AP (2003) Join the crowd. *Nat Cell Biol* 8:36–38 . <https://doi.org/10.1080/08940889508602814>
- Espindola ADS, Gomes DS, Panek AD, Eleutherio ECA (2003) The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiology* 47:236–241 . <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.003>
- Espinosa L, Schebor C, Buera P, Moreno S, Chirife J (2006) Inhibition of trehalose

- crystallization by cytoplasmic yeast components. *Cryobiology* 52:157–160 .
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.10.005>
- Fernandes PN, Mannarino SC, Silva CG, Pereira MD, Panek AD, Eleutherio ECA (2007) Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae* . *Redox Rep* 12:236–244 . <https://doi.org/10.1179/135100007x200344>
- Ferrando M, Spiess WEL (2001) Cellular response of plant tissue during the osmotic treatment with sucrose, maltose, and trehalose solutions. *J Food Eng* 49:115–127 .
[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00218-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00218-1)
- França MB, Panek AD, Araujo Eleutherio EC (2005) The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones* 10:167–170 .
<https://doi.org/10.1379/CSC-103R.1>
- França MB, Panek AD, Eleutherio ECA (2007) Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 146:621–631 .
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.030>
- Fu N, Huang S, Xiao J, Chen XD (2018) *Producing Powders Containing Active Dry Probiotics With the Aid of Spray Drying*, 1st edn. Elsevier Inc.
- Fuller W, Forsyth T, Mahendrasingam A, Ball P, Halle B, Kornyshev A (2004) Water-DNA interactions as studied by X-ray and neutron fibre diffraction. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 359:1237–1248 . <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1501>
- Gadd GM, Chalmers K, Reed R. (1987) The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 48:249–254 .
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02551.x>
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcíarrubio A, Covarrubias AA (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem* 275:5668–5674 . <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5668>
- Garner MM, Burg MB (1994) Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *Am J Physiol - Cell Physiol* 266: .
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.4.c877>
- Garre E, Raginel F, Palacios A, Julien A, Matallana E (2010) Oxidative stress responses and

- lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *Int J Food Microbiol* 136:295–303 .
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.018>
- Gélinas P (2019) Active dry yeast: lessons from patents and science. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18:1227–1255 . <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12445>
- Gershfeld NL, Murayama M (1988) Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: Temperature dependence of hemolysis. *J Membr Biol* 101:67–72 .
<https://doi.org/10.1007/BF01872821>
- Golovina EA, Golovin A, Hoekstra FA, Faller R (2010) Water replacement hypothesis in atomic details: Effect of trehalose on the structure of single dehydrated POPC bilayers. *Langmuir* 26:11118–11126 . <https://doi.org/10.1021/la100891x>
- Goyal K, Walton L, Browne J, Ann B, Alan T (2005) Molecular anhydrobiology: Identifying molecules implicated in invertebrate anhydrobiosis. *Integr Comp Biol* 45:702–709 .
<https://doi.org/10.1093/icb/45.5.702>
- Green JL, Angell CA (1989) Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J Phys Chem* 93:2880–2882 . [https://doi.org/0022-3654/89/2093-2880\\$01.50/0 0](https://doi.org/0022-3654/89/2093-2880$01.50/0 0)
- Griffin DM (1981) Water and Microbial Stress. In: *Advances in Microbial Ecology*. pp 91–136
- Grossmann G, Opekarová M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W (2007) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* 26:1–8 . <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601466>
- Hajare A, More H, Pisal S (2009) Vacuum foam drying: a new technology for preserving sensitive biomolecules. *Eur Ind Pharm* 16–18
- Hasenhuettl GL (2008) Overview of food emulsifiers. In: *Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition*. pp 1–9
- Hays LM, Crowe JH, Wolkers W, Rudenko S (2001) Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transitions. *Cryobiology* 42:88–102 . <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2307>
- Hengherr S, Worland MR, Reuner A, Brümmer F, Schill RO (2009) High-temperature tolerance

- in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. *Physiol Biochem Zool* 82:749–755 . <https://doi.org/10.1086/605954>
- Higl B, Ratjen J, Först P, Kulozik U, Kurtmann L, Carlsen CU, Skibsted LH, Risbo J (2007) Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnol Prog* 23:794–800 . <https://doi.org/10.1021/bp070089d>
- Hills BP, Arnould L, Ridge YP (2001) Microstructural factors controlling the survival of food-borne pathogens in porous media. *Int J Food Microbiol* 66:163–173 . [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00520-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00520-1)
- Hoekstra FA, Golovina EA, A.C. VA, Hemminga MA (1999) Imbibitional leakage from anhydrobiotes revisited. *Plant, Cell Environ* 22:1121–1131 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00491.x>
- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300–372 . <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.2.300-372.2002>
- Hottiger T, Boller T, Wiemken A (1989) Correlation of trehalose content and heat resistance in yeast mutants altered in the RAS/adenylate cyclase pathway: is trehalose a thermoprotectant? *FEBS Lett* 255:431–434 . [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81139-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81139-1)
- Huang S, Vignolles ML, Chen XD, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, Jeantet R (2017) Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends Food Sci Technol* 63:1–17 . <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>
- Iaconelli C, Lemetais G, Kechaou N, Chain F, Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Gervais P, Beney L (2015) Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *J Biotechnol* 214:17–26 . <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.08.022>
- Iordachescu M, Imai R (2012) Trehalose and abiotic stress in biological systems. *Abiotic Stress Plants - Mech Adapt*. <https://doi.org/10.5772/22208>
- Jasnin M, Moulin M, Haertlein M, Zaccai G, Tehei M (2008) Down to atomic-scale intracellular water dynamics. *EMBO Rep* 9:543–547 . <https://doi.org/10.1038/embor.2008.50>
- Jules M, Guillou V, François J, Parrou JL (2004) Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 70:2771–

2778 . <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2771-2778.2004>

Kawai K, Sato K, Lee K, Koseki S (2021) Effects of glass transition and hydration on the biological stability of dry yeast. *J Food Sci* 86:1343–1353 . <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15663>

Kulikova-Borovikova D, Khroustalyova G, Chang CR, Daugelavicius R, Yurkiv M, Ruchala J, Sibirny A, Rapoport A (2018) Anhydrobiosis in yeast: Glutathione overproduction improves resistance to dehydration of a recombinant *Ogataea* (*Hansenula*) polymorpha strain. *Process Biochem* 71:41–44 . <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.016>

Kurtmann L, Carlsen CU, Skibsted LH, Risbo J (2009) Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried lactobacillus acidophilus (La-5): Influence of physical state on bacterial survival during storage. *Biotechnol Prog* 25:265–270 . <https://doi.org/10.1002/btpr.96>

Laroche C, Beney L, Marechal PA, Gervais P (2001) The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:249–254 . <https://doi.org/10.1007/s002530000583>

Laroche C, Fine F, Gervais P (2005) Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. *Int J Food Microbiol* 97:307–315 . <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.023>

Le Meste M, Champion D, Roudaut G, Blond G, Simatos D (2002) Glass transition and food technology: A critical appraisal. *J Food Sci* 67:2444–2458 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08758.x>

Leach RH, Scott WJ (1959) The influence of rehydration on the viability of dried microorganisms. *J Gen Microbiol* 21:295–307 . <https://doi.org/10.1099/00221287-21-2-295>

Lemetais G, Dupont S, Beney L, Gervais P (2012) Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl Microbiol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4014-3>

Lepock JR, Frey HE, Ritchie KP (1993) Protein denaturation in intact hepatocytes and isolated cellular organelles during heat shock. *J Cell Biol* 122:1267–1276 . <https://doi.org/10.1083/jcb.122.6.1267>

Lerbret A, Affouard F, Bordat P, Hédoux A, Guinet Y, Descamps M (2011) Slowing down of

- water dynamics in disaccharide aqueous solutions. *J Non Cryst Solids* 357:695–699 .
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrsol.2010.05.092>
- Lesage G, Bussey H (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:317–343 . <https://doi.org/10.1128/membr.00038-05>
- Leslie SB, Teter SA, Crowe LM, Crowe JH (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *BBA - Biomembr* 1192:7–13 . [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90136-8)
- Levine H, Slade L (1992) Glass Transitions in Foods. *Phys Chem Foods* 83–222
- Lewis MJ (1990) Perspectives on the measurement and survival of yeast culture in feed—biotechnology in the feed Industry. In: *Proceeding of Alltec's 7th Annual Symposium*, Washington DC. pp 88–94
- Lievense LC, van't Riet K (1994) Convective drying of bacteria. In: *Food and B.* 51: 71–89
- Lillie SUEH, Pringle JR (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* : Responses to nutrient limitation. 143:1384–1394
- Lodato P, Buera MP, Segovia de Huergo M (1999) Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:215–220 . <https://doi.org/10.1007/s002530051511>
- Martinez de Maranon I, Marechal PA, Gervais P (1996) Passive response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shifts : Cell volume variations depending on the physiological state for steady state conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 523:519–523
- Mazzobre MF, Del Pilar Buera M (1999) Combined effects of trehalose and cations on the thermal resistance of β -galactosidase in freeze-dried systems. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1473:337–344 . [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00207-X)
- Mille Y, Beney L, Gervais P (2002) Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: A plasma membrane implication. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes* 1567:41–48 . [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00565-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00565-5)
- Mille Y, Obert JP, Beney L, Gervais P (2004) New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. *Biotechnol Bioeng* 88:71–76 .
<https://doi.org/10.1002/bit.20211>

- Miller DP, De Pablo JJ, Corti H (1997) Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions. *Pharm Res* 14:578–590
- Millqvist-Fureby A, Malmsten M, Bergenståhl B (2000) An aqueous polymer two-phase system as carrier in the spray-drying of biological material. *J Colloid Interface Sci* 225:54–61 . <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6740>
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G (2006) Preservation of micro-organisms by drying; A review. *J Microbiol Methods* 66:183–193 . <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Mugnier J, Jung G (1985) Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. *Appl Env Microbiol* 50:108–114
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell Environ* 25:239–250 . <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Munro S (2003) Lipid Rafts : Elusive or Illusive ? Review. 115:377–388
- Nawrocki G, Wang PH, Yu I, Sugita Y, Feig M (2017) Slow-down in diffusion in crowded protein solutions correlates with transient cluster formation. *J Phys Chem B* 121:11072–11084 . <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b08785>
- Oshima H, Kinoshita M (2013) Effects of sugars on the thermal stability of a protein. *J Chem Phys* 138:245101 . <https://doi.org/10.1063/1.4811287>
- Passot S, Cenard S, Douania I, Tréléa IC, Fonseca F (2012) Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chem* 132:1699–1705 . <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.012>
- Patist A, Zoerb H (2005) Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 40:107–113 . <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.05.003>
- Pena A, Uribe S, Clemente M, Sanchez N (1992) Rehydration temperature is critical for metabolic competence. *Biochim Biophys Acta* 75–80
- Perez-Torrado R, Gamero E, Gomez-Pastor R, Garre E, Aranda AA, Matallana E, Rocío G, Aranda AA, Matallana E (2015) Yeast biomass , an optimised product with myriad applications in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 46:167–175 . <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.008>

- Plourde-Owobi L, Durner S, Goma G, François J (2000) Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: Phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. *Int J Food Microbiol* 55:33–40 . [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00210-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00210-5)
- Plourde-Owobi L, Durner S, Parrou JL, Wieczorke R, Goma G, François J (1999) AGT1, encoding an α -glucoside transporter involved in uptake and intracellular accumulation of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181:3830–3832 . <https://doi.org/10.1128/jb.181.12.3830-3832.1999>
- Poirier I, Maréchal PA, Richard S, Gervais P (1999) *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *J Appl Microbiol* 86:87–92 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00638.x>
- Pollock G, Holmstrom C (1951) The trehalose content and the quality of active dry yeast. *Cereal Chem* 28:498–505
- Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF (1993) Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys J* 65:661–671 . [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81120-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81120-2)
- Privalov PL, Gill SJ (1988) Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv Protein Chem* 39:191–234 . [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60377-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60377-0)
- Rapoport A, Golovina EA, Gervais P, Dupont S, Beney L (2019) Anhydrobiosis: Inside yeast cells. *Biotechnol Adv* 37:51–67 . <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.003>
- Rapoport A, Turchetti B, Buzzini P (2016) Application of anhydrobiosis and dehydration of yeasts for non-conventional biotechnological goals. *World J. Microbiol. Biotechnol.*
- Rapoport AI, Khroustalyova GM, Camanis GJ, Beker MJ (1995) Yeast anhydrobiosis: permeability of the plasma membrane. *Mikrobiol* 64:275–278
- Rapoport AI, Markovskii AB, Beker ME (1982) Increase in the permeability of intracellular membranes on dehydration and rehydration of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Microbiol* 51:707–710
- Roos Y (1995) Characterization of food polymers using state diagrams. *J Food Eng* 24:339–360 . [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(95\)90050-L](https://doi.org/10.1016/0260-8774(95)90050-L)
- Sales K, Brandt W, Rumbak E, Lindsey G (2000) The LEA-like protein HSP 12 in

- Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1463:267–278 . [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00215-1)
- Sampedro JG, Uribe S (2004) Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem* 256–257:319–327 . <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009878.21929.eb>
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P (2008) Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J Appl Microbiol* 105:1–13 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x>
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol Prog* 23:302–315 . <https://doi.org/10.1021/bp060268f>
- Schebor C, Burin L, Buera MP, Aguilera JM, Chirife J (1997) Glassy state and thermal inactivation of invertase and lactase in dried amorphous matrices. *Biotechnol Prog* 13:857–863 . <https://doi.org/10.1021/bp970093x>
- Schebor C, Galvagno M, Del Pilar Buera M, Chirife J (2000) Glass transition temperatures and fermentative activity of heat-treated commercial active dry yeasts. *Biotechnol Prog* 16:163–168 . <https://doi.org/10.1021/bp990147y>
- Schneider R, Leber A, Lampl M, Athenstaedt K, Hrastnik C, Eder S, Daum G, Paltauf F, Kohlwein SD, Brügger B, Sandhoff R, Wieland FT, Zellnig G (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol* 146:741–754 . <https://doi.org/10.1083/jcb.146.4.741>
- Schuck P, Dolivet A, Méjean S, Hervé C, Jeantet R (2013) Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. *Int Dairy J* 31:12–17 . <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.006>
- Senaratna T, Mckersie BD, Borochoy A (1987) Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. *J Exp Bot* 38:2005–2014 . <https://doi.org/10.1093/jxb/38.12.2005>
- Shil S, Das N, Sengupta B, Sen P (2018) Sucrose-induced stabilization of domain-ii and overall

- human serum albumin against chemical and thermal denaturation. *ACS Omega* 3:16633–16642 . <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01832>
- Simonin H, Beney L, Gervais P (2007a) Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.017>
- Simonin H, Beney L, Gervais P (2007b) Cell death induced by mild physical perturbations could be related to transient plasma membrane modifications. *J Membr Biol* 216:37–47 . <https://doi.org/10.1007/s00232-007-9027-y>
- Singh J, Kumar D, Ramakrishnan N, Singhal V, Jervis J, Garst JF, Slaughter SM, DeSantis AM, Potts M, Helm RF (2005) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *Appl Environ Microbiol* 71:8752–8763 . <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8752-8763.2005>
- Slaninová I, Šesták S, Svoboda A, Farkaš V (2000) Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 173:245–252 . <https://doi.org/10.1007/s002030000136>
- Smith AE, Moxham KE, Middelberg APJ (2000) Wall material properties of yeast cells. Part II. Analysis. *Chem Eng Sci* 55:2043–2053 . [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(99\)00501-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(99)00501-1)
- Sun WQ, Irving TC, Leopold AC (1994) The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiol Plant* 90:621–628 . <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb02516.x>
- Szopa JS, Zwolinski G, Kowal K, Kunicka A (1992) The effect of substrate feeding on the physiological characteristics and the trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae*. *Polish J food Nutr Sci* 1:41–50
- Tanford C (1997) How protein chemists learned about the hydrophobic factor. *Protein Sci* 6:1358–1366 . <https://doi.org/10.1002/pro.5560060627>
- Tapia H, Young L, Fox D, Bertozzi CR, Koshland D (2015) Increasing intracellular trehalose is sufficient to confer desiccation tolerance to *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:6122–6127 . <https://doi.org/10.1073/pnas.1506415112>
- Thomas P, Sekhar AC, Upreti R, Mujawar MM, Pasha SS (2015) Optimization of single plate-

- serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. Elsevier B.V.
- Van Den Berg J, Boersma AJ, Poolman B (2017) Microorganisms maintain crowding homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 15:309–318 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.17>
- Van Dijck P, Colavizza D, Smet P, Thevelein JM (1995) Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Environ Microbiol* 61:109–115 . <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.109-115.1995>
- Van Steveninck J, Ledebøer AM (1974) Phase transitions in the yeast cell membrane the influence of temperature on the reconstitution of active dry yeast. *BBA - Biomembr* 352:64–70 . [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(74\)90179-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(74)90179-5)
- Verlhac P, Vessot-Crastes S, Degobert G, Cogné C, Andrieu J, Beney L, Gervais P (2019) Study and optimization of freeze-drying cycles of a model probiotic strain. 11–14 . <https://doi.org/10.4995/ids2018.2018.7400>
- Vindeløv J, Arneborg N (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces mellis* exhibit different hyperosmotic shock responses. *Yeast* 19:429–439 . <https://doi.org/10.1002/yea.844>
- Walters RH, Bhatnagar B, Tchessalov S, Izutsu KI, Tsumoto K, Ohtake S (2014) Next generation drying technologies for pharmaceutical applications. *J Pharm Sci* 103:2673–2695 . <https://doi.org/10.1002/jps.23998>
- Warner DT (1962) Some possible relationships of carbohydrates and other biological components with the water structure at 37°. *Nature* 196:1055–1058
- Webb SJ (1965) Bound water in biological integrity. *National Agric Libr*
- Wolkers WF, Van Kilsdonk MG, Hoekstra FA (1998) Dehydration-induced conformational changes of poly-L-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1425:127–136 . [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00059-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00059-2)
- Wright JC (2001) Cryptobiosis 300 years on from van Leuwenhoek: What have we learned about tardigrades? *Zool Anz* 240:563–582 . <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00068>
- Zhao G, Zhang G (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media

on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. J Appl Microbiol 99:333–338 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x>

Zoz F, Iaconelli C, Lang E, Iddir H, Guyot S, Grandvalet C, Gervais P, Beney L (2016) Control of relative air humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: A preliminary approach with *Listeria monocytogenes*. PLoS One 11:1–14 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148418>

Annexe

Liste des communications

- *Communications écrites*

P. Ribert, S. Dupont, G. Roudaut, L. Beney (2021) Effect of devitrification on the survival and resistance of dried *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Appl Microbiol Biotechnol doi.org/10.1007/s00253-021-11451-3

P. Ribert, S. Dupont, G. Roudaut, L. Beney “Impact of molecular crowding on crystallization inhibition and vitrification of trehalose” *en cours de finalisation*

- *Communication orale*

International Conference on Yeast Biotechnology and Biology (ICYBB) (Février 2021)

P. Ribert, L. Beney, G. Roudaut, S. Dupont “Understanding the thermal resistance of ADY by differential scanning calorimetry approach” – **Prix de la meilleure communication.**

Colloque, groupe Lesaffre (mars 2019)

Colloque R&D meeting, Phileo by Lesaffre (octobre 2019)

Colloque, groupe Lesaffre (décembre 2020)

Colloque R&D meeting, Phileo by Lesaffre (juin 2021)

Compréhension de la stabilité des levures sèches actives au travers des phénomènes de déshydratation et de réhydratation par des approches biophysiques et microbiologiques

La préservation de la viabilité de micro-organismes d'intérêt au cours du procédé de séchage ainsi que durant les étapes de stockage sont de véritables challenges industriels. En effet, les levures sèches actives sont soumises à différentes perturbations (hydrique, thermique ou encore mécanique) de leur production à leur utilisation finale ayant pour conséquence de diminuer le nombre de cellules revivifiables des produits. La compréhension des mécanismes clés à l'origine de la stabilité des levures sèches actives est donc essentielle pour l'amélioration de la survie des levures. Au cours de ces travaux, le lien entre les paramètres des procédés de production et les caractéristiques biologiques, biochimiques et physiques des levures agglomérées a été étudié. Ces travaux ont permis d'approcher, pour la première fois, la transition continue d'une biomasse industrielle entre l'état liquide et l'état solide. Nos résultats ont montré la vitrification du cytoplasme des levures, résultant de la combinaison de la déshydratation et d'une forte concentration en tréhalose intracellulaire, accumulée par les levures. Néanmoins, dans un environnement tempéré, les conditions hydriques et/ou thermiques peuvent provoquer une dévitrification du système et donc le passage à l'état caoutchoutique. Nos résultats ont montré la préservation de la viabilité des levures aux états vitreux, mais également caoutchoutique. Des mécanismes liés à cette stabilité ont été élucidés. La survie des cellules à l'état caoutchoutique a notamment été attribuée à la présence d'une quantité importante de tréhalose et à l'encombrement moléculaire de la cellule. Le rôle de l'encombrement moléculaire s'est révélé central dans la préservation de l'état amorphe. Les résultats de ce projet ont également mis en lumière une dualité entre stabilité et aptitude à la réhydratation engendrée par le procédé de production. La combinaison des connaissances générées dans ce projet de recherche ont permis la proposition de pistes d'innovation industrielle mais également d'apporter des éléments complémentaires dans la compréhension des phénomènes expliquant la survie des micro-organismes à l'état déshydraté et lors des phases de déshydratation et de réhydratation.

Mots clés : Levure sèche active, déshydratation, réhydratation, tréhalose, état caoutchoutique

Understanding the stability of active dry yeast through the phenomena of dehydration and rehydration by biophysical and microbiological approaches

The preservation of the viability of micro-organisms of interest during the drying process as well as during the storage is a real industrial challenge. Indeed, active dry yeasts encounter various disturbances (hydric, thermal or mechanical) from their production to their final use, resulting in a decrease in the number of revivable cells in the products. The understanding of the key mechanisms at the origin of the stability of active dry yeasts is therefore essential for the improvement of yeast survival. In this work, the link between production process parameters and biological, biochemical and physical characteristics of agglomerated cells was studied. This work has allowed us to characterize, for the first time, the continuous transition of an industrial biomass from the liquid to the solid state. Our results showed the vitrification of the yeast cytoplasm, resulting from the combination of dehydration and a high concentration of intracellular trehalose, accumulated by the yeast. However, in a temperate environment, hydric and/or thermal conditions can cause devitrification of the system and thus the transition to the rubbery state. Our results showed the preservation of the viability of the yeast in the glassy, but also in the rubbery state. Mechanisms related to this stability were elucidated. The survival of the cells in the rubbery state was attributed to the presence of a significant amount of trehalose and to the molecular crowding of the cell. The role of molecular crowding was found to be central to the preservation of the amorphous state. The results of this project also highlighted a duality between stability and rehydratability caused by the production process. The combination of knowledge generated in this research project has allowed the proposal of industrial innovations but also to provide additional elements in the understanding of the phenomena explaining the survival of micro-organisms in the dried state and after dehydration and rehydration steps.

Keywords: Active dry yeast, dehydration, rehydration, trehalose, supercooled state